UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Alimentos

**Desenvolvimento de alimento probiótico
à base de soja com polpa de fruta**

Natalia Silva Matias

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

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

São Paulo
2011

NATALIA SILVA MATIAS

Desenvolvimento de alimento probiótico
à base de soja com polpa de fruta

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Tecnologia de
Alimentos

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

São Paulo
2011

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

Ficha Catalográfica

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

Matias, Natalia Silva

M425d Desenvolvimento de alimento probiótico à base de soja com
polpa de fruta / Natalia Silva Matias. -- São Paulo, 2011.
78p.

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

Orientador: Saad, Susana Marta Isay

1. Tecnologia de alimentos 2. Soja : Tecnologia de alimentos
3. Microbiologia de alimentos I. T. II. Saad, Susana Marta Isay,
orientador.

664 CDD

MATIAS, N. S. **Desenvolvimento de alimento probiótico à base de soja com polpa de fruta.** Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 21 de outubro de 2011.

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Helena Maria Andre Bolini

Instituição: Universidade Estadual de Campinas

Julgamento: Aprovado

Assinatura: _____

Prof.^a Dr.^a Sueli Rodrigues

Instituição: Universidade Federal do Ceará

Julgamento: Aprovado

Assinatura: _____

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

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado

Assinatura: _____

*Dedico este trabalho a Deus,
aos meus pais, Maurício e Marlene,
aos meus irmãos, Maurício e Gabriel,
ao meu noivo, Rogério,
única razão para eu não desistir.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que por sua graça permitiu que eu pudesse chegar até aqui, suportando todas as adversidades e palavras de oposição lançadas em meu caminho. Nele está a minha força!

Aos meus pais, por acreditarem em mim e pelas palavras de carinho, incentivo e orações.

Aos meus irmãos, pelo imenso amor e carinho.

Ao meu noivo, pelo carinho, dedicação, ajuda, compreensão na angústia e suporte nas horas mais difíceis.

À Prof.^a Dr.^a Susana Marta Isay Saad, por me orientar, auxiliar e confiar em mim e no meu trabalho.

À Cínthia Hoch, pela ajuda desde o início das atividades do mestrado e pela amizade!

À Raquel Bedani, pela amizade e por toda ajuda durante a realização do meu trabalho!

Aos companheiros de laboratório, Daniel, Bruno, Regina, Cris, Grazi, Martha, Marina Campos, Carol, Clara, Diogo, Marina Padilha e Mayra.

À Prof.^a Dr.^a Inar Alves de Castro pela colaboração na realização das análises sensoriais e estatísticas

Aos colegas do departamento pela convivência.

Ao Alexandre Mariani, pelo auxílio na realização de análises, pela prontidão em ajudar, pelos momentos de descontração, conversas e risadas do dia a dia.

Aos funcionários do departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Mirian, Elza, Juarez, Nilton, Gledson, Alexandre e Ivani. Aos secretários da pós-graduação Jorge e Elaine. Aos funcionários da informática, pelo suporte técnico.

À FAPESP, pelo apoio financeiro (Bolsa e Auxílio à Pesquisa, processos nº 2009/05006-1 e 09/51169-0).

À CAPES e CNPq.

Às empresas Salute, SL Alimentos, Danisco e Citroaroma pelo fornecimento de parte dos ingredientes utilizados neste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a finalização deste trabalho.

RESUMO

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

Alterações favoráveis na composição da microbiota intestinal podem ser observadas com o consumo regular de alimentos funcionais contendo probióticos. Os probióticos são micro-organismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro, quando administrados em quantidades adequadas. Tradicionalmente, são incorporados aos leites fermentados e a outros produtos lácteos fermentados. Atualmente, a idéia de redução dos componentes lácteos como veículos para agentes probióticos tem sido promovida, em razão da alta proporção de indivíduos que apresentam intolerância à lactose, além da busca por alternativas vegetarianas. Nesse contexto, a soja aparece como um substituto ideal para o consumo, promovendo a saúde através de características nutricionais intrínsecas. O presente trabalho visou desenvolver um produto semelhante ao queijo *petit-suisse*, mas à base de soja, com polpa de fruta, e adicionado de micro-organismos probióticos, bem como avaliar a aceitabilidade do produto sob o ponto de vista sensorial e suas características físico-químicas, microbiológicas e de textura instrumental durante o seu armazenamento a 4 ± 1 °C por até 28 dias. Três formulações foram produzidas (com três repetições cada): F1- formulação de queijo *petit-suisse* probiótico elaborado com massa-base de queijo quark, como controle (produto lácteo); F2 - formulação com “queijo” de soja e com creme de leite (produto misto à base de soja e de leite); F3 - formulação com “queijo” de soja e com creme de soja (produto de soja). Em todas as formulações, foi empregada a cultura probiótica ABT-4, constituída dos micro-organismos comprovadamente probióticos *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e da cultura *starter* *Streptococcus thermophilus*. Os produtos foram armazenados a 4 ± 1 °C e avaliados sensorialmente (teste de aceitabilidade, utilizando escala hedônica estruturada), após 7, 14 e 21 dias, por 50 consumidores em cada período. Adicionalmente, foram analisados semanalmente durante o seu armazenamento por até 28 dias quanto à viabilidade dos probióticos e da cultura *starter* e quanto ao seu pH e o seu perfil instrumental de textura (teste de dupla compressão de amostras, em analisador de textura TA-XT2). Paralelamente, foi realizado um monitoramento microbiológico das amostras quanto à presença de contaminantes e a partir de amostras mantidas congeladas, foi determinada a composição centesimal dos produtos. A viabilidade de La-5 mostrou-se satisfatória até o 28º dia de armazenamento das formulações F1 e F2, com populações variando de 8,29 a 7,56 log ufc/g e de 8,17 a 6,49 log ufc/g, respectivamente. Entretanto, para F3, as populações de La-5 mostraram-se satisfatórias até o 21º dia (8,18 a 6,84 log ufc/g), não atingindo o mínimo recomendado na última semana. Por outro lado, a viabilidade de Bb-12 manteve-se acima de 8 log ufc/g até o 28º dia de armazenamento de F1, F2 e F3. A cultura *starter* apresentou populações sempre entre 9,73 e 8,86 log ufc/g. O pH manteve-se estável para todas as formulações, mas foi significativamente menor ($p<0,05$) para F2, em relação a F1 e F3. Nos parâmetros dureza e gomosidade, F1 apresentou comportamento antagônico em relação ao de F2 e F3. Todos os parâmetros de textura de F1 diferiram significativamente de F2 e F3 ($p<0,05$). Não houve diferença significativa ($p>0,05$) na análise sensorial de uma mesma formulação entre os períodos de armazenamento. No entanto, na comparação entre as formulações, foram observados escores médios superiores ($p<0,05$) para F3 aos 21 dias (6,4), quando comparada a F2 (4,6). Os alimentos à base de soja, F2 e F3, mostraram-se bons veículos para os micro-organismos probióticos, com populações adequadas para caracterizá-los como probióticos, sendo que F3 mostrou uma tendência a um melhor desempenho sensorial após 14 e 21 dias de armazenamento.

Palavras-chave: Soja, probióticos, *petit-suisse*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis*.

ABSTRACT

MATIAS, N. S. **Development of probiotic soy food with fruit pulp.** 2011, 78p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Favorable changes in the composition of the intestinal microbiota can be observed with the regular consumption of functional foods containing probiotics. Probiotics are live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host. They are traditionally incorporated into fermented milks and other fermented milk products. Currently, the idea of reducing milk components as vehicles for probiotic agents has been promoted due to the high proportion of people who have lactose intolerance, and the search for vegetarian alternatives. In this context, soy appears as an ideal replacement for consumption, promoting health through intrinsic nutritional characteristics. This work aimed to develop a product similar to *petit-suisse* cheese, but soy based, with fruit pulp, and with probiotic micro-organisms, as well as evaluating the acceptability of the product from the point of view of its sensory and physico-chemical characteristics, microbiological and instrumental texture profile during storage at 4 ± 1 °C for up to 28 days. Three formulations were produced (in triplicates): F1 - formulation of probiotic *petit-suisse* cheese prepared with quark cheese, as control (milk product) F2 - formulation with soy "cheese" and milk cream (mixed product with soy and milk), F3 - formulation with soy "cheese" and soy cream (soy product). The three formulations were produced with the probiotic ABT-4 culture, consisting of the probiotic microorganisms *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, *Lactobacillus acidophilus* La-5 and the *starter* culture *Streptococcus thermophilus*. The products were stored at 4 ± 1 °C and subjected to sensory evaluation (acceptability test, using an hedonic scale), after 7, 14, and 21 days, by 50 consumers in each period. Additionally, the products were monitored weekly during storage for up to 28 days regarding the viability of the probiotics and *starter* culture and their pH profile and the instrumental texture (double compression of samples test, using a TA-XT2 texture analyzer). Also, samples were monitored for the presence of contaminants, and, the chemical composition of the products was determined from samples kept frozen. The viability of the La-5 was satisfactory until the 28th day of storage for F1 and F2, with populations ranging from 8.29 to 7.56 log cfu/g and from 8.17 to 6.49 log cfu/g respectively. However, for F3, the population of La-5 proved to be satisfactory until the 21st day (8.18 to 6.84 log cfu/g), not reaching the minimum recommended in the last week. On the other hand, Bb-12 viability remained above 8 log cfu/g throughout the 28 days of storage for F1, F2, and F3. The *starter* culture populations were always between 9.73 and 8.86 log cfu/g. The pH remained stable for all formulations, but was significantly lower ($p < 0.05$) for F2, compared to F1 and F3. As for the texture parameters hardness and gumminess, F1 showed antagonistic behavior in relation to F2 and F3. All texture parameters evaluated differed significantly for F1, F2, and F3 ($p < 0.05$). There was no significant difference ($p > 0.05$) in the sensory scores obtained for the same formulation, when different storage periods were compared. However, when the 3 formulations were compared, higher average scores ($p < 0.05$) were obtained on day 21 for F3 (6.4) than for F2 (4.6). The soy-based foods, F2 and F3, proved to be good vehicles for probiotic microorganisms, with appropriate populations to characterize them as probiotics, and F3 showed a trend towards a better performance in sensory evaluation on days 14 and 21 days of storage.

Keywords: Soy, probiotics, *petit-suisse*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis*.

Lista de tabelas

Tabela 1. Proporção dos ingredientes utilizados na produção das formulações estudadas.....	27
Tabela 2. Composição centesimal (média $\pm$ desvio padrão) das formulações F1, F2 e F3, obtida das amostras congeladas no primeiro dia de armazenamento.	38
Tabela 3. Valores de pH (média $\pm$ desvio padrão) obtidos para F1, F2 e F3 armazenadas sob refrigeração (4 ± 1 °C) por até 28 dias.....	40
Tabela 4. Populações de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 (média $\pm$ desvio padrão) obtidas para as formulações F1, F2 e F3, armazenados sob refrigeração (4 ± 1 °C) por até 28 dias.....	41
Tabela 5. Populações de <i>Bifidobacterium animalis</i> Bb-12 (média $\pm$ desvio padrão) obtidas para as formulações F1, F2 e F3, armazenadas sob refrigeração (4 ± 1 °C) por até 28 dias.....	43
Tabela 6. Populações de <i>Streptococcus thermophilus</i> (média $\pm$ desvio padrão) obtidas para as formulações F1, F2 e F3, armazenadas sob refrigeração (4 ± 1 °C) por até 28 dias.....	44
Tabela 7. Contagens de coliformes totais obtidas para as formulações F1, F2 e F3 durante o armazenamento refrigerado (4 ± 1 °C) por até 28 dias.	45
Tabela 8. Contagens de bolores e leveduras obtidas para as formulações F1, F2 e F3 durante o armazenamento refrigerado (4 ± 1 °C) por até 28 dias.	46
Tabela 9. Determinação de micro-organismos indicadores de contaminação nas formulações F1, F2 e F3 no 1º e no 21º dias de armazenamento.....	47
Tabela 10. Perfil de textura instrumental das formulações (média $\pm$ desvio padrão) após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento sob refrigeração a 4 ± 1 °C.	49

Lista de figuras

Figura 1. Fluxograma de obtenção do queijo quark.	28
Figura 2. Fluxograma da produção do extrato hidrossolúvel de soja e do “queijo” de soja..	30
Figura 3. Fluxograma do processamento para a obtenção do queijo <i>petit-suisse</i> e do alimento à base de soja.	31
Figura 4. Representação gráfica do perfil de textura de <i>petit-suisse</i> . Dureza = H; Adesividade = A3; Elasticidade = $T2/T1$; Coesividade = $A2/A1$ e Gomosidade = $H \times (A2/A1) \times 100$	36
Figura 5. Escore sensorial atribuído pelos consumidores aos três tratamentos durante os períodos de análise. Pontos representam os valores médios (n=50), com duas unidades de desvio padrão (2DP).	52
Figura 6. Distribuição dos escores obtidos na análise sensorial realizada após 7 dias de armazenamento refrigerado (4 ± 1 °C) das formulações F1, F2 e F3.	54
Figura 7. Distribuição dos escores obtidos na análise sensorial realizada após 14 dias de armazenamento refrigerado (4 ± 1 °C) das formulações F1, F2 e F3.	55
Figura 8. Distribuição dos escores obtidos na análise sensorial realizada após 21 dias de armazenamento refrigerado (4 ± 1 °C) das formulações F1, F2 e F3.	56
Figura 9. Escore sensorial atribuído pelos provadores às formulações F1, F2 e F3 após 21 dias, comparado ao produto comercial. Barras representam os valores médios (n=50), com duas unidades de desvio padrão (2DP).	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Alimentos funcionais	13
1.2	A microbiota gastrintestinal	14
1.3	Probióticos e prebióticos	15
1.3.1	Os alimentos funcionais probióticos.....	17
1.4	Soja: produção, mercado e características econômicas	19
1.5	A soja sem lipoxigenase.....	20
1.6	A soja como alimento funcional.....	20
1.6.1	A soja e sua utilização em alimentos probióticos.....	21
1.7	Queijo <i>petit-suisse</i>	23
2	OBJETIVOS.....	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	Fabricação do queijo <i>petit-suisse</i> e do “queijo” de soja.....	25
3.2	Fabricação do queijo quark	27
3.3	Fabricação do “queijo” de soja	29
3.4	Armazenamento e períodos de amostragem	31
3.5	Determinação do pH	32
3.6	Determinação da composição centesimal do alimento	32
3.7	Determinação dos parâmetros microbiológicos	32
3.7.1	Determinação da viabilidade dos micro-organismos probióticos e da cultura <i>starter</i>	32
3.7.2	Determinação dos parâmetros microbiológicos sanitários.....	33
3.8	Determinação do perfil de textura instrumental.....	35
3.9	Análise sensorial	36
3.10	Delineamento experimental e análise estatística	37

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1	Parâmetros físico-químicos	38
4.1.1	Composição centesimal	38
4.1.2	Valores de pH.....	39
4.2	Parâmetros microbiológicos.....	40
4.2.1	Populações de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5	40
4.2.2	Populações de <i>Bifidobacterium animalis</i> Bb-12.....	42
4.2.3	Populações de <i>Streptococcus thermophilus</i>	43
4.2.4	Micro-organismos indicadores de contaminação.....	44
4.3	Perfil de textura instrumental	48
4.4	Análise Sensorial	51
5	CONCLUSÃO.....	59
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 Alimentos funcionais

O interesse na modulação da dieta para melhorar a saúde do ser humano, sob o ponto de vista da ciência dos alimentos, é crescente (GIBSON, 2004). Visto que os consumidores tornam-se mais interessados em uma vida saudável e estão adquirindo conhecimentos referentes às ciências da nutrição, diversos alimentos funcionais já foram introduzidos no mercado (KWAK & JUKES, 2001a) e a pesquisa e o desenvolvimento de novas categorias de produtos têm sido estimulados na indústria de alimentos de todo o mundo (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002).

Estudos mostram que até 93% dos consumidores acreditam que certos alimentos apresentam efeitos benéficos à saúde e podem reduzir o risco de doenças (CLYDESDALE, 2005). Isto criou uma forte demanda por alimentos funcionais, isto é, alimentos para os quais pode ser satisfatoriamente demonstrado que afetam benéficamente uma ou mais funções do organismo, além de garantirem efeitos nutricionais adequados, de modo relevante para um estado melhorado de saúde e bem-estar e/ou redução do risco de doenças, tais como diarreia, câncer e doenças cardiovasculares (EUROPEAN COMMISSION CONCERTED ACTION ON FUNCTIONAL FOOD SCIENCE IN EUROPE, 1999; STANTON et al., 2005; ROBERFROID, 2005; HÄNNINEN & SEN, 2008; CHAMPAGNE et al., 2009).

O termo “alimentos funcionais” propriamente dito nasceu no Japão, nos anos 80, para produtos alimentícios fortalecidos com constituintes especiais que possuem efeitos fisiológicos vantajosos (KWAK & JUKES, 2001b; STANTON et al., 2005;). O conceito de alimento funcional foi promovido em 1984 por cientistas japoneses que estudavam as relações entre nutrição, satisfação sensorial, adição de vitaminas aos alimentos e modulação do sistema fisiológico (LUGASI et al., 2008). O governo, entretanto, proibiu o uso do termo alimentos funcionais, porque a palavra poderia sugerir efeitos semelhantes ao de drogas, o que poderia iludir os consumidores com expectativas de prevenção ou mesmo de cura (MORIYAMA, OHAMA & IKEDA, 2008). Em 1991, o Ministério da Saúde introduziu regras para a aprovação de uma categoria específica de alimentos relacionados à saúde chamada FOSHU - *Food for Specified Health Uses*, que incluía o estabelecimento

de regras específicas para este tipo de alimento (KWAK & JUKES, 2001b; MENRAD, 2003; BURDOCK, CARABIN & GRIFITHS, 2006).

Os alimentos funcionais abrangem um mercado global em amplo crescimento, movimentando cerca de 50 bilhões de dólares anualmente (STANTON et al., 2005). Dentro da classe dos alimentos funcionais, destacam-se os alimentos contendo culturas vivas de micro-organismos probióticos.

Segundo GARDINER et al. (1999), estudos de mercado revelam uma demanda global crescente por alimentos funcionais probióticos. O mercado global de probióticos aumentou de 14,9 bilhões de dólares em 2007 para estimados 15,9 bilhões no final de 2008, podendo alcançar 19,6 bilhões em 2013, o que representa uma taxa de crescimento anual de 4,3%. Os alimentos probióticos têm a maior quota do mercado, cujo valor é estimado em 13,8 bilhões de dólares em 2008 e 17,0 bilhões em 2013 (AGHEYISI, 2008). Como consequência de seus benefícios à saúde, bactérias probióticas são um componente importante da indústria de alimentos lácteos e funcionais, contribuindo para um mercado de bilhões de dólares (O'FLAHERTY & KLAENHAMMER, 2010). Assim, o número de produtos alimentícios contendo esses micro-organismos “promotores de saúde” encontra-se em expansão.

1.2 A microbiota gastrintestinal

A microbiota humana é um ecossistema complexo e usualmente estável, muito importante para o hospedeiro, no sentido de possibilitar a ocorrência de várias funções metabólicas e resistência a infecções bacterianas. A composição desse ecossistema bacteriano é dinâmica e passível às mudanças impulsionadas por fatores dietéticos e por diversas condições de doenças. Portanto, componentes da microbiota intestinal ou micro-organismos estabelecidos no intestino podem ter tanto efeitos nocivos como benéficos à saúde humana (ISOLAURI & SALMINEN, 2006; LAPARRA & SANZ, 2010).

O trato gastrintestinal dos recém-nascidos é rapidamente colonizado por bactérias nos primeiros dias de vida, principalmente através do leite materno (GUARNER & MALAGELADA, 2003; JAQUET et al., 2009; MARTÍN et al., 2009; MARQUES et al., 2010). A microbiota do recém-nascido mostra inicialmente baixa diversidade e instabilidade, mas evolui para uma microbiota semelhante à do adulto durante os primeiros 24 meses de vida (LAPARRA & SANZ, 2010). No adulto, embora o intestino abrigue uma

combinação de espécies predominantes, a composição da microbiota intestinal pode se alterar com o estilo de vida, com a dieta e a idade (O'HARA & SHANAHAN, 2007).

A administração de agentes antimicrobianos pode romper a microbiota normal, levando à diminuição da colonização de resistência e alterações nas atividades metabólicas das bactérias intestinais. Desse modo, a terapia antimicrobiana pode, também, ser acompanhada por distúrbios gastrintestinais e pela redução ou eliminação de lactobacilos na microbiota intestinal (HÄNNINEN & SEN, 2008). Por isso, torna-se interessante o consumo de alimentos que contenham culturas de bactérias probióticas ou ingredientes que estimulem a multiplicação desses micro-organismos, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro – os prebióticos (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002). Esse consumo é particularmente interessante, uma vez que vários estudos têm indicado um efeito protetor dos lactobacilos contra patógenos potenciais no trato gastrintestinal (HÄNNINEN & SEN, 2008). Adicionalmente, algumas evidências sugerem que modificações na composição da microbiota podem gerar efeitos benéficos na prevenção de algumas doenças (SOETERS, 2008; REID, 2008) ou impedir que micro-organismos potencialmente patogênicos nela presentes exerçam os seus efeitos (SAAD, 2006).

1.3 Probióticos e prebióticos

FULLER (1989) definiu probióticos como suplementos alimentares à base de micro-organismos vivos, que afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o balanço de sua microbiota intestinal. Atualmente, a definição aceita internacionalmente é que os probióticos são micro-organismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro, quando administrados em quantidades adequadas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION – FAO/WHO, 2001).

O termo probiótico significa “para a vida” e é utilizado para designar a presença de bactérias associadas a efeitos benéficos em alimentos para o organismo humano. Por volta de 1907, Henry Tissier, um pediatra francês, observou que crianças com diarreia tinham, em suas fezes, um baixo número de bactérias caracterizadas por uma morfologia peculiar – as bifidobactérias, as quais eram abundantes em crianças saudáveis. Ele sugeriu que estas bactérias poderiam ser administradas em pacientes com diarreia, para

ajudar a restaurar a microbiota intestinal saudável (FAO/WHO, 2001; STANTON et al., 2005).

A maioria dos probióticos e os mais estudados pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (O'FLAHERTY & KLAENHAMMER, 2010; ROSS et al., 2010). Os lactobacilos são, há muito tempo, associados à produção de alimentos fermentados, especialmente de produtos lácteos, mas a adição de bifidobactérias a alimentos é mais recente. Esses micro-organismos são geralmente resistentes à bile e a ácidos porque muitas das espécies são encontradas naturalmente no trato gastrointestinal (TGI) como parte da microbiota normal (O'FLAHERTY & KLAENHAMMER, 2010).

Os prebióticos, por sua vez, são atualmente definidos como 'ingredientes seletivamente fermentáveis que permitem modificações específicas na composição e/ou na atividade da microbiota gastrointestinal que resultam em benefícios ao bem estar e à saúde do hospedeiro' (GIBSON et al., 2004; ROBERFROID, 2007; WELLS, SAULNIER & GIBSON, 2008). Os prebióticos podem ser adicionados a alimentos industrializados e serem combinados com probióticos para a produção de um alimento simbiótico (HAMILTON-MILLER, 2004).

Para que os efeitos benéficos sejam verificados, um número suficiente de micro-organismos viáveis deve estar presente durante toda a vida de prateleira do produto. Além disso, candidatos a cepas probióticas podem possuir traços positivos bem caracterizados, tais como a resistência à acidez gástrica e à toxicidade da bile, a capacidade de colonizar transitoriamente o trato gastrointestinal, a capacidade de inibir patógenos intestinais ou a capacidade de modular o sistema imunológico (SÁNCHEZ et al., 2009).

Alterações favoráveis na composição da microbiota intestinal foram observadas com doses de 100 g de produto alimentício contendo 10^9 unidades formadoras de colônias (ufc) de micro-organismos probióticos (10^7 ufc/g de produto). Assim sendo, para serem de importância fisiológica ao consumidor, os probióticos devem alcançar populações acima de 10^6 a 10^7 ufc/g ou mL de bio produto (SANDERS, 2003; SAAD, 2006; SENDRA et al., 2008).

É importante ressaltar que a maior disponibilidade de dados sobre as concentrações bacterianas efetivas indica que a concentração de micro-organismos probióticos necessária varia em função da cepa e do efeito desejado sobre a saúde (CHAMPAGNE,

GARDNER & ROY, 2005). Desse modo, os fatores que podem ser importantes na manutenção da eficácia de probióticos são a melhor multiplicação e sobrevivência dos micro-organismos durante a fabricação e armazenamento dos alimentos, bem como no trato gastrointestinal, a proteção contra ácidos, bile e enzimas gastrintestinais, a adesão ao epitélio intestinal, propriedades antimicrobianas e resistência a antibióticos. No entanto, a viabilidade do probiótico é, sem dúvida, o fator mais importante uma vez que pode afetar todos os outros parâmetros (RANADHEERA, BAINES & ADAMS, 2010).

1.3.1 Os alimentos funcionais probióticos

SANDERS (1998) enumerou seis causas para o aumento da procura por alimentos funcionais, a saber: os consumidores optam por prevenir, ao invés de curar doenças; há um considerável aumento dos custos médicos; os consumidores estão mais bem informados sobre a relação entre a saúde e a nutrição; a tentativa de se retardar o envelhecimento; a tentativa de se combater os males causados pela poluição, por micro-organismos e agentes químicos no ar, na água e nos alimentos e o aumento das evidências científicas sobre a sua eficácia.

Alguns critérios básicos de alimentos probióticos são: manter a estabilidade durante a vida de prateleira pretendida do produto; conter uma população adequada de células viáveis para conferir benefício à saúde; serem compatíveis com a formulação do produto para manter desejadas propriedades sensoriais; serem rotulados de uma forma informativa verdadeira para o consumidor (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2007).

No Brasil, a Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, instituída junto à Câmara Técnica de Alimentos (Brasil, 1999), tem avaliado os produtos com alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde aprovados no país. Anteriormente, a referida Comissão recomendou que um alimento funcional probiótico devesse apresentar uma concentração mínima de 10^6 ufc/g dentro do prazo de validade do produto (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001). Atualmente, a recomendação é com base na porção diária de micro-organismos viáveis que devem ser ingeridos para efeitos terapêuticos, sendo o mínimo estipulado de 10^8 a 10^9 ufc/dia, sendo que valores menores que esses podem ser aceitos desde que o fabricante comprove sua eficácia (AGÊNCIA NACIONAL DE

VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008). É necessário destacar que no período em que as recomendações para alimentos probióticos foram revistas pela Comissão, houve um aumento do número de produtos probióticos disponíveis no mercado brasileiro. Dessa forma, também seria fundamental considerar a somatória dos micro-organismos viáveis ingeridos nos diversos produtos probióticos consumidos ao longo do dia (KOMATSU, BURITI & SAAD et al., 2008). Entretanto, é importante, ainda, ressaltar que a maior disponibilidade de dados sobre as concentrações bacterianas efetivas indica, claramente, que a concentração probiótica necessária varia em função da cepa e do efeito desejado sobre a saúde (CHAMPAGNE, GARDNER, ROY & 2005).

As bactérias probióticas não devem ser patogênicas, tóxicas, mutagênicas ou carcinogênicas ao organismo, aos seus produtos de fermentação ou componentes celulares. Devem ser geneticamente estáveis, sem mecanismo de transferência de plasmídios, devem sobreviver às condições ácidas da parte superior do trato gastrointestinal, ser resistentes aos sais biliares e colonizar o intestino, mesmo que temporariamente, por meio da adesão ao epitélio intestinal, onde deverão influenciar o metabolismo e o equilíbrio da microbiota intestinal (GIBSON & ZIEMER, 1998; MINELLI et al., 2004).

Os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas que mais se destacam são: controle da microbiota intestinal; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos; diminuição da população de patógenos, através da produção de ácidos acético e lático, de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes a esse açúcar, devido à produção de β -galactosidase; estimulação do sistema imune; alívio da constipação; prevenção de diarreia; aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas (FOOKS, FULLER & GIBSON, 1999; ROBERFROID, 2000; SAAD, 2006; HEKMAT, SOLTANI & REID, 2008; SANDERS & DOUGLAS, 2008; NEISH, 2009).

A capacidade de diferentes micro-organismos adicionados em produtos lácteos em melhorar a absorção de lactose em pessoas que sofrem de intolerância à lactose, tem sido amplamente relatada. Dois possíveis mecanismos estão envolvidos neste efeito benéfico: a redução do teor de lactose no produto antes do consumo e a hidrólise

intestinal de lactose pela β -galactosidase (EC 3.2.1.23) bacteriana (ZÁRATE, CHAIA & OLIVER, 2002).

Neste contexto, DROUAULT, ANBA & CORTIER (2002) demonstraram que *Streptococcus thermophilus* produziu β -galactosidase, capaz de hidrolisar a lactose no trato gastrointestinal de ratos e que esta produção foi reforçada quando a lactose foi adicionada à dieta. De acordo com SANDERS & KLAENHAMMER (2001), foram apresentados alguns estudos sobre a capacidade de lactobacilos probióticos em melhorarem a digestão da lactose ou seus sintomas em indivíduos deficientes em lactase. Adicionalmente, segundo VASILJEVIC & SHAH (2008), *B. animalis* Bb-12 (Chr. Hansen) é um dos micro-organismos probióticos mais investigados com dados estabelecidos de eficácia à saúde humana contra má absorção de lactose, diarreia rotaviral e diarreia associada a antibióticos.

1.4 Soja: produção, mercado e características econômicas

A soja (*Glycinemax*) chegou ao Brasil trazida dos Estados Unidos, em 1882. Entretanto, foi somente a partir dos anos 40 que ela adquiriu alguma importância econômica, merecendo o primeiro registro estatístico nacional em 1941, no Anuário Agrícola do RS: área cultivada de 640 ha, produção de 450t e rendimento de 700 kg/ha (EMBRAPA SOJA, 2004).

A soja se consolidou como a principal cultura do agronegócio brasileiro, passando de 1,5 milhão de toneladas (1970) para mais de 15 milhões de toneladas (1979). Esse crescimento se deu, não apenas devido ao aumento da área cultivada (1,3 para 8,8 milhões de hectares), mas, também, devido ao expressivo incremento da produtividade (1140 para 1730 kg/ha), graças às novas tecnologias disponibilizadas aos produtores pela pesquisa brasileira (EMBRAPA SOJA, 2004).

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja. A produção estimada da safra 2010/2011 é de 75,31 milhões de toneladas. Nesse período a produtividade média da soja brasileira foi de 2.627kg/ha (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2011).

Nos últimos anos, atendendo à demanda por produtos com maior valor agregado, têm sido lançadas cultivares de soja com características especiais para o consumo *in natura* e para a indústria de alimentos. Para essa linha de produtos, são

consideradas diversas características, tais como: sementes graúdas com alto teor de proteína, coloração clara do hilo, ausência das enzimas lipoxigenases, entre outras características (EMBRAPA SOJA, 2004).

1.5 A soja sem lipoxigenase

No Brasil e em alguns países ocidentais, o consumo humano de produtos derivados da soja é limitado por causa de seu sabor. Assim, novas cultivares livres de lipoxigenase estão sendo desenvolvidas com melhoria no sabor, com o objetivo de superar os problemas de oxidação e de instabilidade de ácidos graxos (ESTEVES et al., 2010).

O sabor e aroma desagradáveis dos derivados da soja, particularmente do extrato hidrossolúvel (“leite” de soja), são obstáculos a sua aceitação pelos ocidentais que o consideram desagradável. A origem desse sabor está na oxidação de ácidos graxos, catalisada pelas isoenzimas lipoxigenases, quando os tecidos dos grãos sofrem danos na presença de umidade (EVANGELISTA & REGITANO-d’ARCE, 1997, MARTINS et al., 2002; CIABOTTI et al., 2006).

A BRS 257 é uma cultivar de soja convencional indicada para o cultivo orgânico e para alimentação humana, que não apresenta as três enzimas lipoxigenases, podendo, então, prevenir o desenvolvimento do sabor desagradável nos alimentos à base de soja. Essa cultivar disponibiliza matéria prima de excelente qualidade e sabor superior, com teor de proteína em torno de 41% e de lipídios próximo a 22% (EMBRAPA, 2010).

1.6 A soja como alimento funcional

A soja é uma das plantas mais cultivadas no mundo e é uma boa fonte de proteínas e aminoácidos essenciais (LIU, HAN & ZHOU, 2011). Em média, a composição da soja é de 40% de proteína, 20% de lipídios, 30% de carboidratos, 5% de fibras e 5% de cinzas (ROSSI et al., 2011). Tal composição é influenciada pelas condições de cultivo e por interações com o genótipo (KUMAR et al., 2006). A soja também é importante fonte de outros compostos, tais como fibras, oligossacarídeos com potencial prebiótico (rafinose e estaquiose), vitaminas e minerais, como o cálcio

(FUCHS et al., 2005; AHMAD et al., 2008; ZULKURNAIN et al., 2008; TSENG & XIONG, 2009).

A soja tem sido considerada há algum tempo como um alimento funcional, com uma ampla gama de propriedades (BUCKLEY et al., 2011). As concentrações relativamente elevadas de compostos bioativos existentes na soja, tais como as isoflavonas e saponinas, contribuem para a alegação de que a soja é um alimento saudável (BEHRENS & SILVA, 2004; TSENG & XIONG, 2009). Entretanto, de acordo com a ANVISA (2008), os dizeres de rotulagem e o material publicitário dos produtos à base de soja não podem veicular qualquer alegação em função das isoflavonas, seja de conteúdo (“contém”), funcional, de saúde e terapêutica (prevenção, tratamento e cura de doenças).

Além da qualidade de sua proteína, estudos mostram que a soja pode contribuir para a redução do risco de doenças cardiovasculares, câncer e sintomas da menopausa (SETCHELL & CASSIDY, 1999). Entre os componentes bioativos presentes na soja responsáveis por esses efeitos, os de maior interesse, atualmente, são as isoflavonas (BEDANI & ROSSI, 2005; CAVALLINI et al., 2009). Segundo a ANVISA (2008) o consumo diário de no mínimo 25 g de proteína de soja, associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis, pode ajudar a reduzir o colesterol.

1.6.1 A soja e sua utilização em alimentos probióticos

O alimento como substrato para os probióticos é um dos principais fatores na regulação da colonização do trato gastrointestinal por tais micro-organismos (RANADHEERA, BAINES & ADAMS, 2010). Tradicionalmente, probióticos são adicionados ao iogurte e a outros produtos lácteos fermentados (SHAH, 2007; CARDARELLI et al., 2007). No entanto, outros veículos, como matérias-primas não lácteas, podem ser utilizados para veicular as bactérias lácticas benéficas e outros micro-organismos (PRADO et al., 2008).

A demanda por alternativas ao leite está crescendo, devido ao desejo por alternativas vegetarianas, à intolerância a produtos lácteos, a qual afeta negativamente algumas pessoas, entre outros motivos (FARNWORTH et al., 2007; PRADO et al., 2008; RIVERA-ESPINOZA & GALLARDO-NAVARRO, 2010). Após o desmame, quando a lactose não é mais um requerimento essencial da dieta dos mamíferos, ocorre uma

redução geneticamente programada e irreversível da atividade da lactase na maioria (cerca de 70%) da população humana mundial (SWALLOW, 2003; CASTIGLIONE et al., 2008; VASILJEVIC & SHAH, 2008).

Nesse contexto, a soja aparece como um substituto ideal para o consumo, promovendo a saúde, através de características nutricionais intrínsecas. Entretanto, para que um produto exerça um papel sobre a saúde, não basta que ele possua características nutricionais vantajosas. É preciso que ele chegue até o consumidor, o que, por sua vez, depende do alimento apresentar um sabor favorável e, de maneira geral, propriedades atrativas (BEHRENS, ROIG & SILVA, 2004; HEENAN et al., 2004). Uma maneira de se melhorar a qualidade sensorial do extrato hidrossolúvel de soja e também mascarar compostos indesejáveis é através da fermentação láctica, que pode ser aliada à suplementação com sacarose, glicose e lactose (BEHRENS, ROIG & SILVA, 2004; CRUZ et al., 2009).

O processo tecnológico da fermentação é conhecido por aumentar o valor nutricional e, ao mesmo tempo, melhorar a aceitabilidade dos produtos derivados da soja. A utilização de fungos para a fermentação já é bastante aplicada. Entretanto, existe, ainda, a possibilidade de se usar bactérias probióticas como culturas *starter* (ROSSI et al., 1999). Segundo LEROY e De VUYST (2004), uma cultura *starter* pode ser definida como “uma preparação microbiana contendo um grande número de células de pelo menos um micro-organismo a ser adicionado à matéria-prima para produzir um alimento fermentado”.

Há poucas décadas, a soja (*Glycine Max*) recebeu atenção dos pesquisadores, em virtude de sua qualidade protéica. Em razão de suas propriedades funcionais, ela tem um grande potencial de aplicação na indústria alimentícia, especialmente devido à sua influência benéfica à saúde humana. Diversos trabalhos demonstram que o extrato hidrossolúvel de soja é apropriado para a multiplicação de bactérias lácticas e de bifidobactérias (KAMALY, 1998; WEI, CHEN & CHEN, 2007; AHMAD et al., 2008; PRADO et al., 2008).

Um primeiro benefício da fermentação de bebidas de soja é a redução do seu sabor característico. A fermentação por probióticos também tem o potencial de reduzir os níveis de alguns carboidratos que podem ser responsáveis pela produção de gases

no trato intestinal e de aumentar os níveis de isoflavonas livres (CHAMPAGNE et al., 2009, MONDRAGÓN-BERNAL et al., 2010).

Lactobacilos e bifidobactérias foram utilizados com sucesso em diversos trabalhos para o desenvolvimento de extrato hidrossolúvel de soja fermentado (WEI, CHEN & CHEN, 2007), “iogurte” de soja (FARNWORTH et al., 2007; KAUR, MISHRA & KUMAR, 2009), sobremesa vegetariana congelada (HEENAN et al., 2004) e “queijo” de soja tipo *cream cheese* (LIU et al., 2006).

É interessante ressaltar que a aparência física, textura, composição e a tecnologia básica do processamento de “queijo” de soja são relativamente semelhantes às do queijo em muitos aspectos. A principal diferença entre o leite e o extrato hidrossolúvel de soja é que este não contém lactose e caseína, mas isso não afeta a fabricação do “queijo” de soja, porque os açúcares da soja podem suprir o papel da lactose, enquanto as proteínas do extrato hidrossolúvel de soja têm o mesmo papel das proteínas do leite, isto é, os aminoácidos da “coalhada” de soja são utilizados pelas bactérias lácticas para produzir compostos aromáticos (AHMAD et al., 2008).

1.7 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. O queijo quark 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).

O queijo *petit-suisse* é um queijo de muita alta umidade, a ser consumido fresco, de acordo com a classificação estabelecida no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo *Petit-suisse* (BRASIL, 2000). Quando em sua elaboração tenham sido adicionados ingredientes opcionais não lácteos, até o máximo de 30% m/m, classifica-se o produto como queijo *petit-suisse* com adições. No caso em que os ingredientes opcionais sejam, exclusivamente, açúcares e/ou se adicionem substâncias aromatizantes/saborizantes, classifica-se como queijo *petit-suisse* com açúcar e/ou

aromatizados/saborizados. O queijo *petit-suisse* deve ser envasado em embalagens de materiais adequados às condições de armazenamento, de forma a conferir uma proteção adequada ao produto. Deve ser conservado e comercializado em temperaturas não superiores a 10 °C.

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa com queijos *petit-suisse* probióticos e simbióticos (suplementados com culturas probióticas e com ingredientes prebióticos) mostraram-se bastante promissores, tendo resultado, inclusive, no depósito de uma patente em co-autoria com a FAPESP (SAAD et al., 2007). Esses queijos foram produzidos com massa-base de queijo quark, contendo o *starter* *S. thermophilus* e os probióticos *L. acidophilus* e *Bifidobacterium*. MARUYAMA et al. (2006) verificaram que as populações de probióticos mantiveram-se acima de 6,40 log ufc/g para *L. acidophilus* Lac4 e de 7,30 log ufc/g para *B. animalis* subsp. *lactis*BL04 (anteriormente classificada como *B. longum*), em diferentes formulações de queijo *petit-suisse* contendo combinações das gomas xantana, guar, carragena e pectina. Trabalhando com as mesmas cepas, CARDARELLI et al. (2008) observaram, em queijos *petit-suisse* simbióticos contendo os prebióticos inulina, oligofrutose e/ou mel, que *L. acidophilus* e *B. animalis* subsp. *Lactis*BL04 estiveram sempre superiores a 6 log ufc/g e a 7 ufc/g, respectivamente, com o melhor desempenho apresentado por *Bifidobacterium*BL04 durante todo o armazenamento (28 dias). Adicionalmente, a presença dos ingredientes prebióticos inulina e oligofrutose resultaram na promoção das taxas de multiplicação de bifidobactérias e lactobacilos, além de terem resultado em um aumento da produção de lactato e de ácidos graxos de cadeia curta em queijos *petit-suisse* suplementados com esses micro-organismos e submetidos à fermentação em batelada de culturas com fezes humanas (CARDARELLI et al., 2007).

Foi demonstrado, portanto, que o queijo *petit-suisse* apresentou boas condições de manutenção da viabilidade dos probióticos e características bastante peculiares e promissoras para um alimento funcional. Entretanto, a intolerância à lactose afeta negativamente uma boa parte da população, comprometendo o consumo de leite e de produtos lácteos por parte das pessoas intolerantes. Uma alternativa bastante interessante como matéria-prima não láctea para veicular culturas probióticas é a soja, cujo conteúdo, isento de lactose, é composto por outros açúcares e por aminoácidos

que podem ser utilizados pelas bactérias lácticas para produzir compostos aromáticos (AHMAD et al., 2008).

Com base no exposto, a viabilidade em se elaborar um produto semelhante ao queijo *petit-suisse* probiótico desenvolvido anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (CARDARELLI et al., 2008), mas com a substituição parcial ou total dos ingredientes lácteos da formulação por ingredientes à base de soja, apresenta-se bastante interessante e com boas perspectivas de mercado, particularmente visando suprir, além de outros potenciais consumidores, aqueles com intolerância à lactose, em menor ou maior grau.

2 OBJETIVOS

a) Desenvolver um produto semelhante ao queijo *petit-suisse*, mas à base de soja, com polpa de fruta, com a adição dos micro-organismos comprovadamente probióticos *Bifidobacterium animalis* Bb-12, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e da cultura starter *Streptococcus thermophilus* (cultura ABT-4);

b) Acompanhar a viabilidade dos micro-organismos probióticos ao longo do armazenamento dos produtos a 4 ± 1 °C, por até 28 dias;

c) Avaliar a aceitabilidade do produto sob o ponto de vista sensorial e suas características físico-químicas, microbiológicas e de textura instrumental durante o seu armazenamento a 4 ± 1 °C por até 28 dias;

d) Comparar o produto à base de soja (com a substituição da massa-base de queijo quark por uma massa-base de “queijo” de soja), elaborado com creme de leite ou com creme de soja ao queijo *petit-suisse* probiótico de base láctea.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Fabricação do queijo *petit-suisse* e do “queijo” de soja

Para a elaboração do queijo *petit-suisse* probiótico de base láctea (F1) foi utilizada a formulação desenvolvida experimentalmente no Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP/SP por CARDARELLI et al. (2008), porém com modificações na proporção entre os ingredientes. As três formulações (F1, F2 e F3)

foram elaboradas com a combinação de gomas empregada por MARUYAMA et al. (2006) e PEREIRA et al. (2010).

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo *Petit-suisse* (BRASIL, 2000) o leite é um ingrediente obrigatório nesse tipo de produto. Portanto, o produto desenvolvido neste trabalho, elaborado com “queijo” de soja, foi denominado de “alimento à base de soja” semelhante ao queijo *petit-suisse*. A definição da porção do produto foi baseada na legislação para queijos tipo *petit-suisse*, que estabelece a porção de 50 g (ANVISA, 2003).

Para a produção do queijo *petit-suisse*, foram utilizados creme de leite tradicional esterilizado (Nestlé do Brasil Ltda., Araçatuba, Brasil), creme de soja (Batavo, Brasil Foods S.A.) polpa de morango integral congelada sem conservantes (Icefruit Maísa, Mossoró, Brasil), açúcar cristal União (Coopersucar-União, Limeira, Brasil), corante natural carmim de cochonilha CA08076 (Citroaroma, Torrinha, Brasil), aroma Morango iogurte CA08069 (Citroaroma, Torrinha, Brasil), goma Grindsted® Guar 250 (Danisco, Cotia, Brasil), goma Grindsted® Carrageenan CY 500 (Danisco, Cotia, Brasil), goma Grindsted® Xanthan 80 (Danisco, Cotia, Brasil).

Foram empregadas as seguintes formulações na fabricação do queijo *petit-suisse* e do alimento à base de soja:

- **Formulação 1 (F1 - controle):** queijo *petit-suisse* probiótico (MARUYAMA et al. 2006; CARDARELLI et al., 2008; PEREIRA et al., 2010) - de base láctea;
- **Formulação 2 (F2):** “queijo” de soja probiótico, com creme de leite de origem láctea – base láctea parcialmente substituída por soja;
- **Formulação 3 (F3):** “queijo” de soja probiótico, com creme de soja – base láctea totalmente substituída por soja.

Em todas as formulações foi empregada a cultura probiótica ABT-4 (constituída dos micro-organismos comprovadamente probióticos *Bifidobacterium animalis* Bb-12 e *Lactobacillus acidophilus* La-5 e da cultura starter *Streptococcus thermophilus*. Os demais ingredientes utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Proporção dos ingredientes utilizados na produção das formulações estudadas.

Ingredientes	Proporção adicionada (%)		
	F1	F2	F3
Massa-base de queijo quark	61,98	-	-
Creme de leite (25% lipídios)	13,72	13,72	-
Massa-base de “queijo” de soja	-	61,98	61,98
Creme de soja (20% lipídios)	-	-	13,72
Sacarose	12,00	12,00	12,00
Polpa de morango	11,50	11,50	11,50
Goma Guar	0,30	0,30	0,30
Goma Carragena	0,19	0,19	0,19
Goma Xantana	0,19	0,19	0,19
Corante	0,08	0,08	0,08
Aroma	0,05	0,05	0,05
TOTAL	100	100	100

3.2 Fabricação do queijo quark

Para a produção do queijo quark, o leite pasteurizado (HTST) desnatado (Salute, Descalvado, Brasil) foi aquecido em banho de água até a temperatura de 37 °C e transferido para caixas térmicas (Invicta, Pouso Alegre, Brasil), onde foram adicionados 0,025% de cloreto de cálcio e 0,1% de cultura ABT-4, constituída dos micro-organismos comprovadamente probióticos *Bifidobacterium animalis* Bb-12 e *Lactobacillus acidophilus* La-5 e da cultura starter *Streptococcus thermophilus* (cultura liofilizada DVS ABT-4, Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca).

Após homogeneização da mistura, aguardou-se aproximadamente 1 h até o leite atingir pH 6,3 e adicionou-se 0,003% de coagulante em pó Ha-la (Christian Hansen, Valinhos, Brasil), previamente diluído em 40 mL de água. Aguardou-se cerca de 30 minutos para coagulação até atingir pH 5,8. Assim, a coalhada foi cortada com o auxílio de uma lira e foi mantida em repouso por 15 minutos para dessoragem. A seguir, a massa foi transferida para sacos de algodão esterilizados e mantida em câmara (BOD)

a 15°C. Após aproximadamente 16h de dessoragem, o queijo foi pesado e transferido para o misturador Geiger UMMSK-12 (Geiger, Pinhais, Brasil) com os demais ingredientes da Tabela 1, conforme o fluxograma da Figura 1.

Figura 1. Fluxograma de obtenção do queijo quark.

3.3 Fabricação do “queijo” de soja

Para a fabricação das formulações F2 e F3, o primeiro passo foi a obtenção do “queijo” de soja, o qual teve a função de substituir o queijo quark da formulação F1. As etapas de produção da massa-base de “queijo” de soja encontram-se esquematizadas no fluxograma da Figura 2.

O extrato hidrossolúvel de soja foi obtido a partir de adaptações de metodologias utilizadas para esse fim. A soja *in natura* variedade BRS-257 (cedida por SL Alimentos Ltda.) permaneceu de molho por 16 h (TANG, 2007) e foi drenada para ser triturada em liquidificador com água (proporção de 31% de soja drenada), durante 10 minutos (YASIR et al., 2007). A mistura obtida foi transferida para um filtro de algodão medindo 48 cm x 77 cm (Itatex, Itaporanga, Brasil) esterilizado em autoclave, para separar o bagaço do extrato hidrossolúvel de soja. O extrato hidrossolúvel foi pasteurizado em fogo brando e permaneceu a 95 °C, durante 10 minutos. A seguir, foi resfriado a 37 °C em banho de gelo e transferido para caixa térmica, quando foi adicionada a cultura ABT-4. Após a homogeneização completa da cultura, a mistura ficou em repouso e a fermentação prosseguiu até ser atingido o pH 4,8 para o corte do “queijo” e para a dessoragem em repouso por 15 minutos. O “queijo” foi transferido para um filtro de algodão, o qual foi colocado em câmara (BOD) a 15 °C para completar a dessoragem. Após 16h de dessoragem, o “queijo” foi pesado e transferido para o misturador Geiger UMMSK-12 com os demais ingredientes da Tabela 1, conforme o fluxograma da Figura 3. É importante salientar que as gomas foram misturadas à polpa de morango (previamente pasteurizada a 80 °C durante 20 minutos) em liquidificador Arno, Mod. MAGD (Arno, São Paulo, Brasil).

Figura 2. Fluxograma da produção do extrato hidrossolúvel de soja e do “queijo” de soja.

Após o processo de mistura, o produto foi embalado em recipientes plásticos de polipropileno brancos com 68 mm de diâmetro, 32 mm de altura e volume útil de 55 ml, próprios para alimentos, selados com selo aluminizado (alumínio + polietileno), em seladora Delgo nº 1968 (Delgo Metalúrgica, Cotia, Brasil) e armazenado a 4 ± 1 °C durante 28 dias.

Figura 3. Fluxograma do processamento para a obtenção do queijo *petit-suisse* e do alimento à base de soja.

3.4 Armazenamento e períodos de amostragem

Os produtos foram armazenados sob refrigeração (4 ± 1 °C). As determinações dos parâmetros microbiológicos e físico-químicos das amostras provenientes de cada uma das 3 repetições de cada uma das formulações (F1, F2 e F3) foram realizadas em duplicata e a determinação do perfil instrumental de textura em quintuplicata, no dia seguinte à fabricação do produto final (1 dia) e após 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento. As análises sensoriais foram realizadas após 7, 14 e 21 dias de

armazenamento, tendo em vista a estabilização dos componentes da formulação e a segurança dos provadores. A determinação da composição centesimal do alimento foi feita em triplicata, a partir de amostras mantidas congeladas.

3.5 Determinação do pH

Decorridos os tempos de armazenamento sob refrigeração, descritos no item 3.4, foram realizadas as determinações de pH, em medidor de pH Orion modelo Three Stars (Analyser Comércio e Indústria Ltda., São Paulo, Brasil). O pH também foi monitorado ao longo da elaboração dos produtos.

3.6 Determinação da composição centesimal do alimento

As determinações foram realizadas segundo o INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2008).

1. Umidade - a partir de 5 g de amostra, em estufa a vácuo a 70 °C, até obtenção do peso constante, obtido por pesagem em balança analítica;
2. Cinzas - por incineração de 2 g de amostra a 550 °C;
3. Gordura - utilizando extrator de Soxhlet e éter de petróleo;
4. Proteínas - através do método de micro-kjeldahl;
5. Carboidratos - calculado por diferença para se obter 100% da composição total.

3.7 Determinação dos parâmetros microbiológicos

3.7.1 Determinação da viabilidade dos micro-organismos probióticos e da cultura *starter*

Decorridos os tempos de armazenamento descritos no item 3.4, porções de 25 g do produto (retirados de 2 embalagens diferentes, em condições de assepsia) foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}), utilizando-se um *Bag Mixer* (Interscience, St. Nom, França). Diluições decimais subseqüentes foram preparadas utilizando o mesmo diluente.

Foram efetuadas contagens das populações dos micro-organismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* Bb-12 e de *Streptococcus thermophilus* ao longo do armazenamento dos produtos, para todas as formulações

estudadas.

Lactobacillus acidophilus La-5 foi enumerado, utilizando a técnica da semeadura em profundidade (*pourplate*) de 1 mL de cada diluição em ágar MRS (de man, Rogosa, Sharpe) formulado com a substituição de glicose por maltose como principal fonte de carboidratos, conforme descrito pela INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF Standard 306, 1995), após 72 h de incubação em aerobiose a 37 °C, de acordo com DAVE & SHAH (1996), VINDEROLA & REINHEIMER (1999) e SHAH (2000).

Bifidobacterium animalis Bb-12 foi enumerado, utilizando-se a técnica da semeadura em profundidade (*pourplate*) de 1 mL de cada diluição em ágar MRS (Oxoid), suplementado com propionato de sódio (0,3 g/100 mL) e cloreto de lítio (0,2 g/100 mL) – ágar MRS-LP (LAPIERRE et al., 1992), após 72 h de incubação em anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) a 37 °C, conforme descrito por VINDEROLA e REINHEIMER (1999).

Para a contagem de *Streptococcus thermophilus*, alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas de Petri estéreis. Em seguida, foi adicionado ágar M17 (Oxoid Inc., Ogdensburg, NY, EUA), contendo 50 mL/L de solução estéril de lactose (Oxoid) a 10% (p/v), fundido e resfriado a cerca de 45 °C. Após homogeneização e solidificação do ágar, as placas foram incubadas em aerobiose a 37 °C por 48 horas (RICHTER&VEDAMUTHU, 2001).

3.7.2 Determinação dos parâmetros microbiológicos sanitários

Para a contagem de micro-organismos indicadores de contaminação, alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas PetrifilmTMEC (3M Microbiology, St. Paul, MN, EUA), para a determinação de coliformes e de *Escherichia coli*, e para placas PetrifilmTMYM (3M Microbiology), para a determinação de bolores e leveduras. As placas PetrifilmTMEC foram incubadas a 37°C por 24 horas e as placas PetrifilmTMYM, a 25°C por 5 dias.

Adicionalmente, amostras congeladas das formulações F1, F2 e F3 em diferentes dias de armazenamento (1 e 21 dias) foram submetidas à investigação da presença de coliformes termo tolerantes, *Bacillus cereus*, estafilococos coagulase positiva, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp., de acordo com as exigências das legislação para produtos à base de soja, a qual estabelece os limites permitidos para cada grupo

de micro-organismos (ANVISA, 2001). Essas análises foram realizadas com a consultoria do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, seguindo a metodologia descrita por DOWNES & ITO (2001).

Para pesquisa de coliformes termo tolerantes foi utilizado o teste presuntivo, no qual alíquotas de 1 mL de cada diluição foram transferidas para tubos contendo caldo lauril sulfato triptose (LST) (Oxoid) e incubados a 37 °C por 48 horas. Após a incubação, alíquotas dos tubos positivos (com turvação e com gás no interior dos tubos de Durham) foram transferidas para caldo EC (Oxoid) e incubadas a 45 °C por 24 horas (DOWNES & ITO, 2001).

Para pesquisa de *Bacillus cereus*, alíquotas de 0,1 mL de cada diluição das amostras foram semeadas na superfície de placas contendo base para ágar *Bacillus cereus* (Oxoid) adicionado de emulsão 1:1 de gema de ovo em solução de NaCl 0,85% (50 mL de emulsão/1 L de meio) e sulfato de polimixina (Polymyxin B supplement, Oxoid, 4 mL/1 L de meio) e incubadas a 30 °C por 24 horas (DOWNES & ITO, 2001).

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

Para pesquisa de *Salmonella* spp., porções de 25 g de produto, retiradas em condições de assepsia, foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada tamponada 2% (pH 7,0 ± 0,2 a 25 °C) e incubadas a 35-37 °C durante 24 horas, para etapa de pré-enriquecimento. Alíquotas de 0,1 mL e 1 mL das diluições pré-enriquecidas foram transferidas para tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) (Oxoid) e 10 mL de caldo tetracionato (TT), respectivamente, e incubadas a 42 °C (RV) e a 35 °C (TT) por 24 horas, para a etapa de enriquecimento. Alçadas de cada cultura de enriquecimento foram semeadas em placas contendo ágar sulfito de bismuto (SBA) (Oxoid), ágar Hektoen-Enteric (HE) (Oxoid) e ágar Rambach (RAM) (Merck) a 35-37 °C por 24 horas. Quando necessário, as colônias típicas de

Salmonella spp. foram submetidas a testes bioquímicos e sorológicos para identificação (DOWNES & ITO, 2001).

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

3.8 Determinação do perfil de textura instrumental

Decorridos os tempos de armazenamento sob refrigeração, descritos no item 3.4, o perfil de textura foi determinado, através de teste de dupla penetração em 50g de amostra armazenada em recipientes plásticos de polipropileno (descritos no item 3.3), realizado imediatamente após retirar a amostra da refrigeração, utilizando cilindro de acrílico P/25P com 25 mm de diâmetro, distância e velocidade de 10 mm e de 1 mm/s, respectivamente, em analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro System, Haslemere, Inglaterra). Os dados foram coletados através do programa “Texture Expert for Windows” (Stable Micro Systems) e foram analisados os atributos dureza, coesividade, adesividade, elasticidade e gomosidade, em quintuplicata para cada período (1, 7, 14, 21 e 28 dias).

Utilizando-se texturômetro determina-se o perfil de textura (TPA- Texture Profile Analysis). Os testes instrumentais de textura são geralmente baseados em força de compressão, nos quais a amostra é submetida a duas “mordidas” ou corridas com a função de simular a mastigação entre os dentes molares. Quando o pistão deforma a amostra, o movimento do suporte é detectado e uma curva de força-compressão é traçada. A partir dessa curva, obtêm-se os parâmetros primários (dureza, coesividade, adesividade, elasticidade) e secundários (gomosidade), que compõem as características mecânicas dos queijos. Na avaliação pelo texturômetro, a amostra deve ser submetida a dois ciclos de compressão, a resposta desse teste é gráfica (Figura 4) e a partir da análise desta curva são determinados os seguintes parâmetros (FOX et al., 2000):

1. Dureza TPA- força necessária para atingir uma determinada deformação;
2. Adesividade TPA - força requerida para remover o queijo que adere à boca durante

o processo de mastigação;

3. Elasticidade TPA - grau de reparação após ser retirada a força deformante;
4. Coesividade TPA - a extensão que um queijo pode ser deformado até que haja ruptura da sua estrutura;
5. Gomosidade TPA - energia requerida para se desintegrar um alimento semi-sólido ao ponto de ser engolido.

Figura 4. Representação gráfica do perfil de textura de *petit-suisse*. Dureza = H; Adesividade = A3; Elasticidade = $T2/T1$; Coesividade = $A2/A1$ e Gomosidade = $H \times (A2/A1) \times 100$.

3.9 Análise sensorial

A avaliação sensorial dos produtos desenvolvidos no presente trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas

da Universidade de São Paulo, conforme consta no Ofício CEP/FCF/72/2009 (Anexo I). Nos Anexos II e III estão inclusos, respectivamente, o modelo da ficha para o teste de aceitação e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovados e utilizados.

A avaliação sensorial dos produtos estudados foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, de acordo com os tempos e as condições de armazenamento descritos no item 3.4, através de teste de aceitabilidade, utilizando escala hedônica de 9 pontos, com variação de desgostei muitíssimo (1 ponto) à gostei muitíssimo (9 pontos).

Participaram deste estudo 288 voluntários adultos (consumidores não treinados), de ambos os sexos. Esses voluntários saudáveis eram alunos de graduação e de pós-graduação, docentes e funcionários da Universidade de São Paulo ou outros voluntários saudáveis interessados em participar do estudo. Para a triagem dos provadores, foi aplicado o critério de inclusão, a saber: possuir entre 18 e 60 anos, de ambos os sexos. Já os critérios de exclusão adotados incluíram: possuir histórico de manifestação de alergia, intolerância a alimentos ou doença crônica (como diabetes, hipotireoidismo, hipertireoidismo, hipertensão ou outras); estar fazendo tratamento médico; estar gripado, resfriado ou indisposto; ter entrado em contato, há menos de 1 hora, com materiais, alimentos ou cosméticos de cheiro forte.

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

Para a avaliação sensorial, amostras de aproximadamente 20 g das diferentes formulações (F1, F2 e F3), codificadas com 3 algarismos, aleatoriamente, foram oferecidas aos provadores monadicamente em um total de 9 sessões. As amostras foram servidas em potes devidamente higienizados, em 3 períodos distintos (7, 14 e 21 dias). Cada formulação foi apresentada a 50 provadores não treinados em cada período (LAWLESS & HEYMANN, 1999).

3.10 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando-se 3 tratamentos [queijo *petit-suisse* probiótico de base láctea (F1); alimento à base de soja

de base láctea parcialmente substituída por soja (F2); alimento à base de soja de base láctea totalmente substituída por soja (F3)] e 5 tempos (1, 7, 14, 21 e 28 dias após o processamento), com 3 repetições.

Nos casos em que foi constatada uma distribuição normal dos dados, a comparação de resultados entre as diferentes formulações para cada período de armazenamento e entre os diferentes períodos de armazenamento para cada formulação foi feita através de análise de variância (ANOVA), com utilização do teste de Tukey, considerando-se um nível de significância $p < 0,05$ (CALLEGARI-JACQUES, 2003). Nos casos em que essa distribuição normal não foi constatada, foram empregados testes não paramétricos adequados.

Os resultados da análise sensorial obtidos em cada um dos períodos de avaliação (após 7, 14 e 21 dias) foram inicialmente submetidos ao teste de Hartley, para verificar a homogeneidade das variâncias e à MANOVA (provedores, período do teste e tratamentos). A seguir os dados foram tratados por ANOVA para Medidas Repetidas, e teste de Tukey HSD para identificar os contrastes significativos. Um valor alfa de 0,05 foi adotado para rejeitar a hipótese de nulidade. Cálculos e gráficos foram realizados através do software Statistica v.9 (Statsoft Inc., Tulsa, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros físico-químicos

4.1.1 Composição centesimal

A composição centesimal obtida para as três formulações estudadas é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Composição centesimal (média $\pm$ desvio padrão) das formulações F1, F2 e F3, obtida das amostras congeladas no primeiro dia de armazenamento.

Análises	Composição centesimal (%)		
	F1	F2	F3
Umidade	63,90 $\pm$ 0,11	67,25 $\pm$ 0,03	66,69 $\pm$ 0,07
Proteínas	17,10 $\pm$ 0,09	10,75 $\pm$ 0,08	11,39 $\pm$ 0,11
Carboidratos	15,48 $\pm$ 0,32	14,78 $\pm$ 0,09	15,40 $\pm$ 0,14
Gorduras	2,43 $\pm$ 0,15	6,74 $\pm$ 0,05	6,05 $\pm$ 0,06
Cinzas	1,095 $\pm$ 0,009	0,484 $\pm$ 0,013	0,473 $\pm$ 0,005

F1 - queijo *petit-suisse* probiótico de base láctea - controle; F2 - alimento probiótico parcialmente à base de soja, com creme de leite; F3 - alimento probiótico à base de soja, com creme de soja.

Conforme esperado, foram obtidos valores elevados de umidade nos produtos, uma vez que o *petit-suisse* é classificado como queijo de muita alta umidade (superior a 55%), de acordo com a legislação (BRASIL, 2000; ANVISA, 2001).

As formulações com soja (F2 e F3) apresentaram menor teor de proteína e de cinzas, quando comparadas à formulação controle F1 (queijo *petit-suisse*). Quanto às gorduras, as formulações à base de soja apresentaram os maiores teores, uma vez que a soja possui aproximadamente 20% de gorduras e que F1 foi preparada com leite desnatado, e em quantidade de açúcares as três formulações foram semelhantes.

4.1.2 Valores de pH

Os valores médios de pH (Tabela 3), foram semelhantes aos descritos por CARDARELLI et al. (2008) em queijos *petit-suisse*, isto é, se mantiveram próximos ao intervalo de pH obtido por tais autores. Os resultados obtidos também se assemelham aos encontrados por VEIGA et al. (2000) em amostras comerciais de queijos *petit-suisse*, nos quais o pH variou de 4,42 a 4,52.

Não houve diferenças significativas nos valores de pH ao longo do período de armazenamento das formulações que continham soja (F2 e F3), ao contrário do que ocorreu na sobremesa simbiótica à base de arroz contendo ABT-4 que foi desenvolvida por nosso grupo de pesquisa (KAKINOKI, 2010). No entanto, assim como nos queijos *petit-suisse* desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa (MARUYAMA et al., 2006; PEREIRA et al., 2010), a formulação F1, queijo *petit-suisse* controle, apresentou redução discreta, embora significativa ($p < 0,05$), de pH (Tabela 2).

O pH da formulação F2 (abaixo de 4,4) foi inferior ao de F1 e F3 (superiores a 4,4) com $p < 0,05$, mas não houve diferenças significativas entre as formulações F1 (controle) e F3 (à base de soja), exceto no primeiro dia de armazenamento (Tabela 2), demonstrando o potencial fermentativo destes micro-organismos tanto sobre o leite quanto sobre o extrato hidrossolúvel de soja.

A redução nos valores de pH é comum em queijos e em outros produtos lácteos e não-lácteos fermentados, o que reflete a produção contínua de ácido lático e de outros ácidos orgânicos durante a fermentação da lactose pelas culturas *starter* e probióticas (BURITI et al. 2005a; BURITI et al. 2005b; GONCU & ALPKEN, 2005, FARNWORTH et al., 2007; WANG et al., 2009).

Tabela 3. Valores de pH (média $\pm$ desvio padrão) obtidos para F1, F2 e F3 armazenadas sob refrigeração (4 ± 1 °C) por até 28 dias.

Período (dias)	Formulações		
	F1 ^(np)	F2	F3
1	4,58 $\pm$ 0,09 ^{Aa}	4,39 $\pm$ 0,08 ^{Ba}	4,45 $\pm$ 0,04 ^{Ba}
7	4,47 $\pm$ 0,04 ^{Aab}	4,36 $\pm$ 0,08 ^{Ba}	4,46 $\pm$ 0,01 ^{Aa}
14	4,42 $\pm$ 0,04 ^{Ab}	4,30 $\pm$ 0,01 ^{Ba}	4,39 $\pm$ 0,04 ^{Aa}
21	4,43 $\pm$ 0,02 ^{Ab}	4,30 $\pm$ 0,08 ^{Ba}	4,39 $\pm$ 0,03 ^{Aa}
28	4,43 $\pm$ 0,08 ^{Ab}	4,28 $\pm$ 0,07 ^{Ba}	4,42 $\pm$ 0,05 ^{Aa}

F1 - queijo *petit-suisse* probiótico de base láctea - controle; F2 - alimento probiótico parcialmente à base de soja, com creme de leite; F3 - alimento probiótico à base de soja, com creme de soja.

A, B, distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) para um mesmo dia entre as formulações.

a, b, distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias para a mesma formulação.

^(np) teste não paramétrico utilizado em F1.

Os valores de pH de F2 foram inferiores ($p < 0,05$) aos valores de F1 e F3 para os diferentes dias de armazenamento. Ainda assim, os valores de pH (4,6 a 4,3) estão dentro de uma faixa que confere homeostase aos lactobacilos e bifidobactérias, além de combater micro-organismos patogênicos, tais como clostrídios, salmonelas e bactérias deteriorantes, limitando a sua proliferação (LIU et al., 2006). Desse modo, a redução do pH se constitui em um fator importante para a conservação do produto desenvolvido neste trabalho, uma vez que este não é adicionado de conservantes.

4.2 Parâmetros microbiológicos

4.2.1 Populações de *Lactobacillus acidophilus* La-5

As populações de *L. acidophilus* La-5 diminuíram significativamente ($p < 0,05$) nas três formulações estudadas (Tabela 4). Em F1 e F2, as populações foram superiores às populações mínimas que um alimento funcional probiótico deve apresentar durante o seu período de validade, particularmente quando se leva em consideração que a porção de queijo *petit-suisse* estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é de 50g (ANVISA, 2003). Para o queijo *petit-suisse*, isto implica uma quantidade mínima de 6,3 log ufc/g de produto para que a porção apresente a quantidade mínima de probióticos exigida pela ANVISA, segundo a qual um produto alimentício deve conter 10^8 a 10^9 ufc em uma porção diária para exercer seus efeitos

benéficos à saúde (ANVISA, 2008). Essas populações também são sugeridas por alguns pesquisadores como as mínimas aceitáveis para produzirem efeitos benéficos à saúde (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001a; LIU et al., 2006; AURELI et al., 2010; RANADHEERA, BAINES & ADAMS, 2010).

Tabela 4. Populações de *Lactobacillus acidophilus* La-5 (média $\pm$ desvio padrão) obtidas para as formulações F1, F2 e F3, armazenados sob refrigeração (4 ± 1 °C) por até 28 dias.

Período (dias)	Populações de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 (log ufc/g)		
	F1	F2	F3
1	8,29 $\pm$ 0,20 ^{Aa}	8,17 $\pm$ 0,42 ^{Aa}	8,18 $\pm$ 0,30 ^{Aa}
7	8,09 $\pm$ 0,06 ^{Aab}	7,87 $\pm$ 0,64 ^{Aab}	7,90 $\pm$ 0,31 ^{Aab}
14	7,89 $\pm$ 0,08 ^{Aab}	7,57 $\pm$ 0,57 ^{Aabc}	7,44 $\pm$ 0,40 ^{Aabc}
21	7,58 $\pm$ 0,39 ^{Ab}	6,76 $\pm$ 0,28 ^{Bbc}	6,84 $\pm$ 0,13 ^{Bbc}
28	7,56 $\pm$ 0,41 ^{Ab}	6,49 $\pm$ 0,73 ^{Bc}	5,75 $\pm$ 0,47 ^{Bc}

F1 - queijo *petit-suisse* probiótico de base láctea - controle; F2 - alimento probiótico parcialmente à base de soja, com creme de leite; F3- alimento probiótico à base de soja, com creme de soja.

A, B na mesma linha indicam diferenças significativas ($p<0,05$) para um mesmo dia entre as formulações.

a, b na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre os dias para a mesma formulação.

Foi utilizado o teste não paramétrico de Friedman

As três formulações não diferiram significativamente entre si ($p>0,05$) quanto às populações de La-5 até o 14º dia de armazenamento (Tabela 4). Porém, a partir dos 21 dias, a viabilidade nas formulações à base de soja F2 e F3 apresentou-se menor do que em F1. Isso pode sugerir que a presença da soja na matriz alimentícia contribuiu para a redução da viabilidade de La-5 no produto.

O queijo *petit-suisse* (F1) apresentou populações de *L. acidophilus* La-5 superiores às obtidas por CARDARELLI et al. (2008) e por MARUYAMA et al. (2006) com a cepa LAC4. Os autores obtiveram populações inferiores a 7 log ufc/g e em declínio durante o armazenamento. Por outro lado, PEREIRA et al. (2010) observaram populações acima de 7 log ufc/g, utilizando La-5, sem diferença significativa na viabilidade ao longo do período de armazenamento, ao contrário do que ocorreu para as três formulações aqui estudadas, onde $p<0,05$ (Tabela 3).

Apesar do declínio observado, as populações de *L. acidophilus* La-5 se mantiveram em níveis desejados nas formulações durante o período de armazenamento

refrigerado, com exceção da formulação F3 na última semana de armazenamento, a qual apresentou 5,75 log ufc/g, abaixo da quantidade exigida pela legislação. Apesar disso, a presença de Bb-12 contribuiu para que o alimento seja caracterizado como probiótico, uma vez que está em níveis superiores a 8 log ufc/g após 28 dias de armazenamento (Tabela 5). A presença de grande quantidade de Bb-12 pode estar relacionada a um nível ótimo inoculado, visto que a viabilidade de bactérias probióticas depende, dentre outros fatores, da quantidade inoculada (TAMINE, 1988).

Resultados semelhantes foram obtidos por WANG et al., (2009) com leite bovino e leite de soja fermentados por *L. casei*, cuja viabilidade se manteve acima de 8 log ufc/g durante 28 dias de armazenamento a 4 °C.

4.2.2 Populações de *Bifidobacterium animalis* Bb-12

As populações de Bb-12 nas formulações durante o armazenamento refrigerado encontram-se na Tabela 5. As três formulações apresentaram populações acima de 8 log ufc/g, com viabilidade maior nas formulações F2 e F3 ($p < 0,05$), demonstrando que Bb-12 sobreviveu ainda melhor nas formulações à base de soja (Tabela 5).

As populações de Bb-12 foram mais estáveis do que as populações de *L. acidophilus* La-5, sem variação significativa durante o período de armazenamento ($p > 0,05$) e mantiveram-se superiores às de La-5 (Tabelas 4 e 5). Semelhantemente, MARUYAMA et al. (2006) e PEREIRA et al. (2010) relataram que as populações de bifidobactérias foram sempre superiores às populações de lactobacilos. No entanto, este não é um resultado muito comum, uma vez que as bifidobactérias são descritas como mais sensíveis a variações de pH (LOURENS-HATTINGH e VILJOEN, 2001b; OZCAN et al., 2010).

Os resultados obtidos por OZCAN et al. (2010) mostraram que as populações de Bb-12 foram superiores às de La-5 em pudim de arroz de base láctea. Entretanto, a viabilidade de La-5 foi menos afetada do que de Bb-12, durante 21 dias de armazenamento. Esse comportamento foi distinto do ocorrido com as formulações F1 a F3 do presente trabalho, para as quais a viabilidade de Bb-12 foi menos afetada, enquanto La-5 apresentou uma diminuição muito mais acentuada ao longo do armazenamento, diminuindo em mais de 2 ciclos logarítmicos (Tabelas 4 e 5).

No presente estudo, os resultados obtidos mostram que as populações de *L.*

acidophilus La-5 e de *B. Animalis* Bb-12 ao longo do armazenamento das formulações F1 a F3 estiveram de acordo com o exigido pela legislação brasileira durante os 28 dias de armazenamento.

Tabela 5. Populações de *Bifidobacterium animalis* Bb-12 (média $\pm$ desvio padrão) obtidas para as formulações F1, F2 e F3, armazenadas sob refrigeração (4 ± 1 °C) por até 28 dias.

Período (dias)	Populações de <i>Bifidobacterium animalis</i> Bb-12 (log ufc/g)		
	F1	F2	F3
1	8,51 $\pm$ 0,28 ^{Ba}	8,82 $\pm$ 0,07 ^{Aa}	8,82 $\pm$ 0,12 ^{Aa}
7	8,34 $\pm$ 0,27 ^{Ba}	8,65 $\pm$ 0,06 ^{Aa}	8,74 $\pm$ 0,06 ^{Aa}
14	8,30 $\pm$ 0,29 ^{Ba}	8,54 $\pm$ 0,06 ^{ABa}	8,68 $\pm$ 0,09 ^{Aa}
21	8,29 $\pm$ 0,38 ^{Aa}	8,44 $\pm$ 0,13 ^{Aa}	8,67 $\pm$ 0,17 ^{Aa}
28	8,21 $\pm$ 0,29 ^{Ba}	8,42 $\pm$ 0,06 ^{ABa}	8,59 $\pm$ 0,15 ^{Aa}

F1 - queijo *petit-suisse* probiótico de base láctea - controle; F2 - alimento probiótico parcialmente à base de soja, com creme de leite; F3- alimento probiótico à base de soja, com creme de soja.

A, B distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p<0,05$) para um mesmo dia entre as formulações.

a, b distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre os dias para a mesma formulação.

4.2.3 Populações de *Streptococcus thermophilus*

As populações de *S. thermophilus* durante o armazenamento dos produtos encontram-se na Tabela 6. Os resultados obtidos mostraram populações de 9 log ufc/g, o que também foi observado por CARDARELLI et al. (2008) e por PEREIRA et al. (2010). A viabilidade de *S. thermophilus* na formulação F1 foi superior às formulações F2 e F3 em todos os dias de avaliação ($p<0,05$). Na formulação F3, a população foi superior à F2 apenas no dia 28 (Tabela 6). Apesar dessa diferença estatística, as populações variaram menos de 1 log ufc/g, o que pode ser considerado pouco significativo do ponto de vista biológico.

Nos ensaios realizados por PEREIRA et al. (2010), a adição das culturas probióticas em co-cultura com *S. thermophilus* no queijo *petit-suisse* resultou em alta viabilidade dos probióticos durante o armazenamento e excelente aceitação sensorial.

As populações de *S. thermophilus* obtidas por BURITI et al. (2007a) e PEREIRA et al. (2010) mantiveram-se acima de 9 log ufc/g durante armazenamento refrigerado de queijo fresco cremoso e *petit-suisse*, respectivamente.

Tabela 6. Populações de *Streptococcus thermophilus* (média $\pm$ desvio padrão) obtidas para as formulações F1, F2 e F3, armazenadas sob refrigeração (4 ± 1 °C) por até 28 dias.

Período (dias)	Populações de <i>Streptococcus thermophilus</i> (log ufc/g)		
	F1	F2	F3
1	9,73 $\pm$ 0,10 ^{Aa}	9,44 $\pm$ 0,21 ^{Ba}	9,43 $\pm$ 0,14 ^{Ba}
7	9,66 $\pm$ 0,09 ^{Aa}	9,30 $\pm$ 0,14 ^{Ba}	9,34 $\pm$ 0,06 ^{Ba}
14	9,62 $\pm$ 0,10 ^{Aa}	9,20 $\pm$ 0,10 ^{Ba}	9,35 $\pm$ 0,12 ^{Ba}
21	9,67 $\pm$ 0,08 ^{Aa}	9,04 $\pm$ 0,17 ^{Ba}	9,16 $\pm$ 0,12 ^{Ba}
28	9,64 $\pm$ 0,10 ^{Aa}	8,86 $\pm$ 0,25 ^{Ca}	8,94 $\pm$ 0,20 ^{Ba}

F1 - queijo *petit-suisse* probiótico de base láctea - controle;

F2 - alimento probiótico parcialmente à base de soja, com creme de leite;

F3- alimento probiótico à base de soja, com creme de soja.

A, B distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) para um mesmo dia entre as formulações.

a, b distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias para a mesma formulação.

Segundo SVENSSON (1999), a incorporação de *S. thermophilus* pode ser útil em tornar o ambiente do queijo mais anaeróbio, uma vez que esse micro-organismo tem alta capacidade de utilização de oxigênio dissolvido no meio. Esse efeito poderia ser vantajoso, já que bifidobactérias são anaeróbias e lactobacilos são anaeróbios facultativos. Sendo assim, a cultura *starter* tornaria o ambiente mais propício para a multiplicação das culturas probióticas. No entanto, embora não tenha sido testada formulação sem a cultura *starter*, apresença de *S. thermophilus* nas três formulações não parece ter influenciado a viabilidade de La-5 e de Bb-12. Por outro lado, pode ter havido uma influência da matriz alimentícia sobre a viabilidade de tais micro-organismos.

Por não ser capaz de colonizar o intestino, *S. thermophilus* não é considerado probiótico, mas é capaz de liberar lactase no intestino delgado, favorecendo a digestão da lactose (DROUAULT, ANBA & CORTHIER, 2002; SANDERS, 2003).

4.2.4 Micro-organismos indicadores de contaminação

A Tabela 7 mostra a variação das contagens de coliformes totais nas formulações F1, F2 e F3 durante o armazenamento refrigerado (4 ± 1 °C) por até 28

dias. As contagens de coliformes totais foram inferiores ao limite máximo estabelecido pela legislação (ANVISA, 2001) em todos os ensaios dos queijos T1, T2 e T3.

As contagens de bolores e leveduras analisados durante o armazenamento das formulações F1, F2 e F3 são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 7. Contagens de coliformes totais obtidas para as formulações F1, F2 e F3 durante o armazenamento refrigerado (4 ± 1 °C) por até 28 dias.

Período (dias)	Populações de coliformes totais (log ufc/g)*		
	F1	F2	F3
1	<1-2,32	<1	<1
7	<1-1,30	<1	<1
14	<1-1,30	<1	<1
21	<1	<1	<1
28	<1	<1	<1

F1 - queijo *petit-suisse* probiótico de base láctea - controle;

F2 - alimento probiótico parcialmente à base de soja, com creme de leite;

F3 - alimento probiótico à base de soja, com creme de soja.

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

Tabela 8. Contagens de bolores e leveduras obtidas para as formulações F1, F2 e F3 durante o armazenamento refrigerado (4 ± 1 °C) por até 28 dias.

Período (dias)	Populações de bolores e leveduras (log ufc/g)*		
	F1	F2	F3
1	2,30-2,79	<1-2,00	<1-2,48
7	2,00-2,61	<1-2,26	<1-3,00
14	3,11-3,46	2-2,88	1,85-3,21
21	3,51-3,61	3,05-3,38	2,08-3,62
28	3,43-3,62	3,38-3,64	2,00-3,67

F1 - queijo *petit-suisse* probiótico de base láctea - controle;

F2 - alimento probiótico parcialmente à base de soja, com creme de leite;

F3 - alimento probiótico à base de soja, com creme de soja.

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

As contagens de bolores e leveduras estiveram sempre abaixo do limite máximo exigido pela legislação (ANVISA, 2001) durante o armazenamento de todas as formulações produzidas neste trabalho.

As formulações foram elaboradas de acordo com as boas práticas de fabricação, havendo amplo controle da higiene dos utensílios e equipamentos empregados e da manipulação das matérias-primas durante todo o processamento.

Na Tabela 9 estão relacionados os resultados das análises exigidas pelo Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos (ANVISA, 2001). Os resultados indicaram que a quantidade de micro-organismos presentes nas formulações F1, F2 e F3 está de acordo com os padrões recomendados para alimentos à base de leite e de soja.

Tabela 9. Determinação de micro-organismos indicadores de contaminação nas formulações F1, F2 e F3 no 1º e no 21º dias de armazenamento.

Parâmetros microbiológicos	F1		F2		F3	
	1º dia	21º dia	1º dia	21º dia	1º dia	21º dia
<i>Bacillus cereus</i> (ufc/g)	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Coliformes termotolerantes (NMP/g)	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
Estafilococos coagulase+ (ufc/g)	<100	<100	<100	<100	<100	<100
<i>Listeria monocytogenes</i> (em 25 g)	ausência	ausência	ausência	ausência	ausência	ausência
<i>Salmonella</i> spp (em 25 g)	ausência	ausência	ausência	ausência	ausência	ausência

F1 - queijo *petit-suisse* probiótico de base láctea - controle;

F2 - alimento probiótico parcialmente à base de soja, com creme de leite;

F3 - alimento probiótico à base de soja, com creme de soja.

4.3 Perfil de textura instrumental

A Tabela10 apresenta os dados de textura instrumental dos parâmetros dureza, coesividade, adesividade (valores em módulo), elasticidade e gomosidade para as formulações F1 a F3. Ao longo do armazenamento houve diminuição da dureza em F1, enquanto houve um aumento em F2 e F3, isto é, a dureza das formulações não se manteve estável ao longo do armazenamento.

Tabela 10. Perfil de textura instrumental das formulações (média $\pm$ desvio padrão) após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento sob refrigeração a 4 ± 1 °C.

Textura	Período (dias)	Formulações*		
		F1	F2	F3
Dureza (N)	1	$1,872 \pm 0,123$ ^{Ca}	$3,976 \pm 0,321$ ^{Bd}	$4,965 \pm 0,237$ ^{Ad}
	7	$1,679 \pm 0,219$ ^{Bb}	$6,449 \pm 0,660$ ^{Ac}	$6,570 \pm 0,451$ ^{AcD}
	14	$1,643 \pm 0,117$ ^{Bbc}	$7,069 \pm 0,601$ ^{Ab}	$7,277 \pm 0,707$ ^{Abc}
	21	$1,620 \pm 0,100$ ^{Bbc}	$7,474 \pm 0,540$ ^{Aa}	$7,539 \pm 0,796$ ^{Aab}
	28	$1,582 \pm 0,152$ ^{Bc}	$7,354 \pm 0,600$ ^{Aab}	$8,238 \pm 0,704$ ^{Aa}
Adesividade (N s)**	1	$4,848 \pm 0,335$ ^{Ac}	$12,331 \pm 1,122$ ^{Bb}	$14,603 \pm 0,870$ ^{Ca}
	7	$4,241 \pm 0,183$ ^{Ab}	$15,257 \pm 2,335$ ^{Ba}	$14,498 \pm 1,946$ ^{Ba}
	14	$4,244 \pm 0,227$ ^{Ab}	$14,943 \pm 2,096$ ^{Ba}	$13,604 \pm 1,538$ ^{Ba}
	21	$4,158 \pm 0,403$ ^{Aab}	$15,359 \pm 1,841$ ^{Ba}	$13,946 \pm 1,841$ ^{Ba}
	28	$3,931 \pm 0,173$ ^{Aa}	$14,355 \pm 1,510$ ^{Ba}	$13,780 \pm 1,265$ ^{Ba}
Elasticidade	1	$0,909 \pm 0,005$ ^{Aa}	$0,875 \pm 0,002$ ^{Ca}	$0,882 \pm 0,005$ ^{Bb}
	7	$0,910 \pm 0,006$ ^{Aa}	$0,875 \pm 0,026$ ^{Ba}	$0,885 \pm 0,022$ ^{Bb}
	14	$0,907 \pm 0,018$ ^{Aa}	$0,866 \pm 0,025$ ^{Ba}	$0,915 \pm 0,045$ ^{Ab}
	21	$0,914 \pm 0,007$ ^{Aa}	$0,883 \pm 0,038$ ^{Ba}	$0,929 \pm 0,030$ ^{Aab}
	28	$0,912 \pm 0,008$ ^{Ba}	$0,887 \pm 0,038$ ^{Ca}	$0,949 \pm 0,034$ ^{Aa}
Coesividade	1	$0,382 \pm 0,005$ ^{Ca}	$0,507 \pm 0,016$ ^{Aa}	$0,489 \pm 0,011$ ^{Bb}
	7	$0,371 \pm 0,018$ ^{Ba}	$0,495 \pm 0,012$ ^{Aa}	$0,485 \pm 0,018$ ^{Ab}
	14	$0,371 \pm 0,033$ ^{Ba}	$0,507 \pm 0,012$ ^{Aa}	$0,500 \pm 0,016$ ^{Aab}
	21	$0,354 \pm 0,015$ ^{Bb}	$0,495 \pm 0,018$ ^{Aa}	$0,507 \pm 0,018$ ^{Aa}
	28	$0,344 \pm 0,016$ ^{Bb}	$0,504 \pm 0,022$ ^{Aa}	$0,502 \pm 0,014$ ^{Aab}
Gomosidade (N)	1	$0,714 \pm 0,046$ ^{Ca}	$2,013 \pm 0,158$ ^{Bc}	$2,428 \pm 0,143$ ^{Ad}
	7	$0,619 \pm 0,050$ ^{Bb}	$3,196 \pm 0,395$ ^{Ab}	$3,184 \pm 0,191$ ^{AcD}
	14	$0,608 \pm 0,050$ ^{Bb}	$3,588 \pm 0,363$ ^{Aa}	$3,637 \pm 0,392$ ^{Abc}
	21	$0,573 \pm 0,028$ ^{Bc}	$3,700 \pm 0,338$ ^{Aa}	$3,817 \pm 0,351$ ^{Aab}
	28	$0,543 \pm 0,029$ ^{Bc}	$3,710 \pm 0,403$ ^{Aa}	$4,136 \pm 0,359$ ^{Aa}

*Médias de 15 repetições; **Valores em módulo. F1 - queijo *petit-suisse* probiótico de base láctea - controle; F2 - alimento probiótico parcialmente à base de soja, com creme de leite; F3 - alimento probiótico à base de soja, com creme de soja.

A, B Letras maiúsculas distintas, em uma mesma linha indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

a, b Letras minúsculas distintas, em uma mesma coluna para cada parâmetro de textura indicam diferenças significativas entre os dias.

Na comparação entre os tratamentos, para Dureza, Adesividade e Gomosidade foram utilizados testes não-paramétricos, e para Elasticidade e Coesividade testes paramétricos.

Na comparação entre os dias, testes paramétricos (ANOVA) foram utilizados em F1 e F2 e testes não paramétricos (Friedman) em F3.

A estabilidade da dureza durante o período de armazenamento é desejável, uma vez que, dessa forma, confirma-se que o produto, após algumas semanas de armazenamento, continua semelhante ao produto recém-fabricado. Além disso, a estabilidade é muito desejada para manter as características físico-químicas e, conseqüentemente, sensoriais, do início ao fim da vida de prateleira do produto (MARUYAMA et al. 2006). CARDARELLI, FEBBO e SAAD (2003) observaram parâmetros de textura instrumental não estáveis durante a vida de prateleira de queijo *petit-suisse*, verificando que a dureza e a gomosidade do queijo *petit-suisse* simbiótico aumentaram durante o armazenamento.

Na Tabela 10 observa-se o comportamento antagônico dos parâmetros dureza e gomosidade na formulação F1, comparados às formulações F2 e F3. Em outras palavras, enquanto na formulação F1 a dureza e a gomosidade diminuíram significativamente, nas formulações F2 e F3 tais parâmetros aumentaram significativamente ($p < 0,05$). Na formulação F1, esse comportamento é resultante da possível proteólise que ocorreu no queijo. Nas formulações F2 e F3 o aumento foi, possivelmente, devido à formação de uma rede de gel das proteínas da soja. As proteínas da soja são constituídas principalmente por glicina e β -conglucina, que têm a capacidade de formar um gel sob a ação de enzimas, sendo que tal ação é refletida diretamente na textura (TANG et al., 2006). De acordo com LIM et al. (1990), o que determina a dureza não é a quantidade de proteínas, mas a forma como a proteína interage com outros componentes estruturais para formar a microestrutura do produto.

A dureza e a adesividade do produto à base de leite (F1) foi significativamente menor que dos produtos à base de soja (F2 e F3) desde o início do armazenamento ($p < 0,05$). Quando comparadas entre si, a formulação F1 apresentou dureza e gomosidade menores do que as formulações F2 e F3 ($p < 0,05$). Nota-se, também, que entre as formulações com soja (F2 e F3) só houve diferença significativa no primeiro dia de armazenamento.

A substituição do queijo quark pelo “queijo” de soja afetou intensamente os parâmetros de textura, uma vez que a formulação F1 (controle) diferiu significativamente ($p < 0,05$) das demais formulações em todos os parâmetros. Diferentemente do que foi observado por BURITI, CARDARELLI & SAAD (2008), que

verificaram um comportamento similar ($p>0,05$) entre três formulações de queijo fresco cremoso estudadas (probiótico, simbiótico e controle) com relação aos mesmos parâmetros - dureza, adesividade, elasticidade, coesividade e gomosidade. Em outro trabalho, Buriti et al. (2007b) estudaram a textura de queijo minas frescal elaborado com a cultura ABT-4, o qual teve a melhor estabilidade da textura durante o armazenamento, quando comparado aos demais queijos.

A adesividade das formulações F2 e F3 foi significativamente maior que da formulação F1. Ao longo do armazenamento esse parâmetro diminuiu na formulação F1 ($p<0,05$). Na formulação F2, a adesividade aumentou na primeira semana de armazenamento e manteve-se constante em F3.

A elasticidade diferiu significativamente entre as três formulações ($p<0,05$). Na formulação F3 houve aumento significativo da elasticidade aos 28 dias, em comparação às primeiras três semanas de armazenamento. A coesividade não diferiu significativamente entre F2 e F3 após a segunda semana ($p>0,05$) mas diferiu entre F1 e as demais ao longo de todo o período de armazenamento.

O perfil de textura instrumental de uma amostra comercial de queijo *petit-suisse* foi analisado, para comparação com as formulações desenvolvidas com soja (F2 e F3). A elasticidade ($\sim 0,8-0,9$) e a coesividade ($\sim 0,5$) de F2 e F3 foram semelhantes às da amostra comercial (médias de 0,8 e 0,5 para a elasticidade e a coesividade, respectivamente). Todavia, a dureza, a adesividade e a gomosidade de F2 e F3 foram muito maiores (Tabela 10) do que da amostra comercial, com médias de 1,1, 2,1 e 0,5 para dureza, adesividade e gomosidade, respectivamente.

A diferença nos parâmetros entre o produto comercial e os produtos à base de soja desenvolvidos é uma consequência da capacidade da soja em formar gel e da quantidade de gomas adicionada. Esses parâmetros podem ter influenciado a aceitação sensorial dos produtos, conforme discutido no item a seguir.

4.4 Análise Sensorial

A aceitabilidade sensorial após 7, 14 e 21 dias de armazenamento das formulações desenvolvidas está representada na Figura 5 (escore 1 = desgostei muitíssimo; escore = 9 gostei muitíssimo). Dentre os participantes, 64,2% eram mulheres e 35,8% eram homens. Não foi observada diferença significativa nos escores atribuídos pelos

consumidores durante os períodos de análise para cada formulação ($p_{7D}= 0,794$; $p_{14D}= 0,342$ e $p_{21D}=0,731$), sugerindo consenso na avaliação das amostras (Figura 5). Da mesma forma, não houve efeito do período de condução dos testes (manhã e tarde) no escore atribuído pelos provadores ($p_{7D}= 0,399$; $p_{14D}= 0,789$ e $p_{21D}=0,140$).

Foi observada uma influência positiva da soja sobre os escores atribuídos à formulação F3, a qual mostrou tendência, embora não significativa ($p>0,05$), a um melhor desempenho sensorial nas análises conduzidas aos 14 e aos 21 dias de armazenamento. Por outro lado, F2 apresentou uma tendência à redução dos escores durante o período de armazenamento. Houve diferença significativa apenas entre as formulações F2 e F3, respectivamente, com escores médios de 4,58 e 6,44, aos 21 dias de armazenamento ($p<0,05$) (Figura 5).

Figura 5. Escore sensorial atribuído pelos consumidores aos três tratamentos durante os períodos de análise. Pontos representam os valores médios ($n=50$), com duas unidades de desvio padrão (2DP).

A presença de cepas probióticas em queijos tem sido correlacionada com a melhoria das características sensoriais, uma vez que esses micro-organismos podem produzir metabólitos com atividade antimicrobiana, tais como ácidos orgânicos, álcoois e bacteriocinas, sendo capazes de retardar o processo de deterioração (DILLON & COOK, 1994).

A análise sensorial de outros produtos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa não revelou diferença significativa entre as amostras estudadas ao longo dos períodos de análise, ou seja, de acordo com os consumidores, não houve melhora ou piora na qualidade sensorial das amostras e todos os produtos foram bem aceitos. Exemplos desses produtos são o manjar branco potencialmente probiótico (CORRÊA, CASTRO & SAAD, 2008), sorvete com a adição de La-5 e Bb-12 (HARAMI, 2009), mix de açaí elaborado com La-5 e Bb-12 (VASCONCELOS, 2009), musse de goiaba produzida com La-5 (BURITI, CASTRO & SAAD, 2010), sobremesa simbiótica à base de arroz produzida com a mesma cultura ABT-4 utilizada no presente trabalho (KAKINOKI, 2010), e margarina contendo Bb-12 (SOUZA, 2010).

Adicionalmente, HEENAN et al. (2004) relataram que a aceitabilidade geral de uma sobremesa congelada à base de soja elaborada com probióticos, incluindo o Bb-12, foi excelente durante o armazenamento por 28 semanas. DONKOR et al. (2007), entretanto, verificaram que um iogurte probiótico de soja contendo *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10, *Lactobacillus casei* LAFTI L26 e *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* LAFTI B94 foi menos apreciado pelos consumidores do que o iogurte controle, sem probióticos.

Por outro lado, em ensaios de otimização sensorial de uma bebida fermentada de soja simbiótica, MONDRAGÓN-BERNAL et al. (2010) verificaram que o maior conteúdo de sacarose teve efeito significativo na melhora do sabor.

No presente trabalho, diversos comentários feitos pelos consumidores durante as análises sensoriais foram relativos à falta de açúcar nas amostras. Por ser um produto com características funcionais, uma alternativa para compensar a exigência dos consumidores seria adicionar um edulcorante e, assim, manter as características de um alimento funcional.

Figura 6. Distribuição dos escores obtidos na análise sensorial realizada após 7 dias de armazenamento refrigerado (4 ± 1 °C) das formulações F1, F2 e F3.

Apesar do alto desvio padrão dos dados ter contribuído para a redução dos escores médios, escores de 6 a 9 foram atribuídos por 78%, 64% e 56% dos consumidores, respectivamente, para as formulações F1, F2 e F3 na análise sensorial dos produtos com 7 dias de armazenamento (Figura 6). Esses escores correspondem, na escala hedônica, às opiniões variando entre “gostei ligeiramente” e “gostei muitíssimo”.

Figura 7. Distribuição dos escores obtidos na análise sensorial realizada após 14 dias de armazenamento refrigerado (4 ± 1 °C) das formulações F1, F2 e F3.

Aos 14 dias de armazenamento a frequência dos escores 6 a 9 atribuídos pelos consumidores foi de 54%, 52% e 46%, respectivamente, para as formulações F1, F2 e F3 (Figura 7).

Figura 8. Distribuição dos escores obtidos na análise sensorial realizada após 21 dias de armazenamento refrigerado (4 ± 1 °C) das formulações F1, F2 e F3.

Na análise sensorial dos produtos com 21 dias de armazenamento, escores de 6 a 9 foram atribuídos por 68%, 62% e 82% dos consumidores para as formulações F1, F2 e F3, respectivamente (Figura 8).

Embora poucas citações tenham sido feitas a respeito da acidez do produto, a maioria dos consumidores que citaram que não gostaram da acidez se referiu à formulação F2, a qual de fato apresentou o pH mais baixo, comparado às outras formulações (Tabela 3).

Figura 9. Escore sensorial atribuído pelos provadores às formulações F1, F2 e F3 após 21 dias, comparado ao produto comercial. Barras representam os valores médios ($n=50$), com duas unidades de desvio padrão (2DP).

Além das formulações produzidas também foram avaliadas amostras de uma formulação comercial de queijo *petit-suisse*. Os resultados que estão representados na Figura 9 indicam que a formulação comercial teve maior aceitação (média 8,04) do que as demais formulações ($p<0,05$). Veiga et al. (2000) submeteram 6 amostras comerciais de queijo *petit-suisse* à análise sensorial e obtiveram escores médios entre 6,05 e 7,0 para a aceitação geral.

As características menos apreciadas pelos consumidores que podem ter contribuído para a redução das notas em relação à amostra comercial foram, principalmente, a presença de grânulos, a textura muito consistente e o sabor da soja.

Os resultados aqui apresentados podem ser assim resumidos:

O pH não diminuiu significativamente ao longo do período de armazenamento de cada formulação, porém foi significativamente menor na formulação F2 (parcialmente com soja) em relação a F1 (com quark) e F3 (totalmente com soja).

A cultura de *Lactobacillus acidophilus* La-5 permaneceu viável até o 28º dia de armazenamento das formulações F1 e F2, com populações variando de 8,29 a 7,56 log ufc/g e de 8,17 a 6,49 log ufc/g, respectivamente. Entretanto, na formulação F3 as populações de La-5 mostraram-se satisfatórias até o 21º dia de armazenamento (8,18 a 6,84 log ufc/g), não atingindo o mínimo recomendado pela ANVISA (2008) na última semana de armazenamento. Por outro lado, a viabilidade de Bb-12 manteve-se acima de 8 log ufc/g até o 28º dia de armazenamento das formulações F1, F2 e F3, sem variação significativa nesse período ($p > 0,05$). A cultura *starter Streptococcus thermophilus* apresentou populações entre 9,73 e 8,86 log ufc/g durante o mesmo período.

Os parâmetros dureza e gomosidade diminuíram durante o armazenamento da formulação F1 e aumentaram em F2 e F3. A adesividade, a elasticidade e a coesividade tiveram variações pequenas em cada formulação ao longo do armazenamento. Todos os parâmetros de textura diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre a formulação F1 (com quark) e as formulações F2 (parcialmente com soja) e F3 (totalmente com soja).

Não houve diferença significativa na análise sensorial de uma mesma formulação entre os períodos de armazenamento ($p > 0,05$). Os micro-organismos probióticos presentes nas formulações F1, F2 e F3 podem ter contribuído para estabilizar as características sensoriais e, assim, para que não houvesse diferença entre os períodos de análise. Foram observados maiores escores médios ($p < 0,05$) para a formulação F3 aos 21 dias de armazenamento (6,4), em comparação a formulação F2 (4,6).

Os alimentos à base de soja, F2 e F3, mostraram-se um bom veículo para as bactérias probióticas (La-5 e Bb-12) durante os 28 dias de armazenamento, apresentando populações superiores ao mínimo recomendado para que um alimento seja caracterizado como probiótico, de acordo com a legislação (ANVISA, 2008).

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que a substituição total dos ingredientes lácteos pela soja na formulação de *petit-suisse* é tecnologicamente viável para disponibilizar ao consumidor um alimento funcional sem conteúdo lácteo e com alta viabilidade dos micro-organismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 ao longo do período de armazenamento, satisfazendo as exigências para ser considerado como alimento probiótico. Adicionalmente, foi observada uma influência positiva da soja sobre os escores atribuídos à formulação F3, a qual mostrou tendência a um melhor desempenho sensorial nas análises conduzidas a partir dos 14 dias de armazenamento, sendo um produto com boas perspectivas para uma futura comercialização.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 4 mar. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC n.359, de 23 de dezembro de 2003**. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/359_03rdc.pdf. Acesso em: 3 jul. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n.12, de 02 de janeiro de 2001**. A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm. Acesso em: 30 ago. 2011.

AGHEYISI, R. **The probiotics market**: Ingredients, supplements. In: BCC Research. Food and Beverage. 2008. Disponível em: <http://www.bccresearch.com/report/FOD035B.html>. Acesso em: 26 maio 2010.

AHMAD, N.; LI, L.; YANG, X.-Q.; NING, Z.-X.; RANDHAWA, M.A. Soy cheese flavour improvement. **Food Technology and Biotechnology**, v.46, p.252–261, 2008.

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

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

BEDANI, R.; ROSSI, E.A. O consumo de cálcio e a osteoporose. **Semina**, v.26, p.3-14, 2005.

BEHRENS, J.H.; SILVA, M.A.A.P. Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.3, p.431-439, 2004.

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

BEHRENS, J.H.; ROIG, S.M.; SILVA, M.A.A.P. Fermentation of soymilk by commercial lactic cultures: development of a product with market potential. **Acta Alimentaria**, v.33, p.101-109, 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: 13 mar. 2011.

BUCKLEY, N.D.; CHAMPAGNE, C.P.; MASOTTI, A.; WAGAR, L.E.; TOMPKINS, T.A.; GREEN-JOHNSON, J.M. Harnessing functional food strategies for the health challenges of space travel – fermented soy for astronaut nutrition. **Acta Astronautica**, v.68, p.731-738, 2011.

BURDOCK, G.A.; CARABIN, I.G.; GRIFITHS, J.C. The importance of GRAS to the functional food and nutraceutical industries. **Toxicology**, v.221, p.17–27, 2006.

BURITI, F.C.A.; OKAZAKI, T.Y.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh cheese in comparison with the traditional products. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.57, n.2, p.179-185, 2007b.

BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Effects of refrigeration, freezing and replacement of milk fat by inulin and whey protein concentrate on texture profile and sensory acceptance of synbiotic guava mousses. **Food Chemistry**, v.123, p.1190–1197, 2010.

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

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

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

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.

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

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

CARDARELLI, H.R.; BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic *petit-suisse* cheese. **LWT – Food Science and Technology**, v.41, p.1037–1046, 2008.

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

CASTIGLIONE, F.; DI GIROLAMO, E.; CIACCI, C.; CAPORASO, N.; PASQUALE, L.; COZZOLINO, A.; TORTORA, R.; TESTA, A.; RISPO, A. Lactose malabsorption: clinical or breath test diagnosis? **e-SPEN, European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism**, v.3, n.6, p.E316-E320, 2008.

CAVALLINI, D.C.U.; ABDALLA, D.S.P.; VENDRAMINI, R.C.; BEDANI, R.; BOMDESPACHO, L.Q.; PAULY-SILVEIRA, N.D.; VALDEZ, G.F.; ROSSI, E.A. Effect of isoflavone-supplemented soy yogurt on lipid parameters and atherosclerosis development in hypercholesterolemic rabbits: a randomized double-blind study. **Lipids in Health and Disease**, v.8, n.1, p.40-50, 2009.

CHAMPAGNE, C.P.; GARDNER, N.J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, p.61-84, 2005.

CHAMPAGNE, C.P.; GREEN-JOHNSON, J.; RAYMOND, Y.; BARRETTE, J.; BUCKLEY, N. Selection of probiotic bacteria for the fermentation of a soy beverage in combination with *Streptococcus thermophilus*. **Food Research International**, v.42, p.612–621, 2009.

CIABOTTI, S.; BARCELLOS, M.F.P.; MANDARINO, J.M.G.; TARONE, A.G. Avaliações químicas e bioquímicas dos grãos, extratos e tofus de soja comum e de soja livre de lipoxigenase. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.5, p.920-929, 2006.

CLYDESDALE, F. **Functional foods**: opportunities and challenges. In: Institute of Food Technologists. Knowledge Center. Read IFT Publications. Science Reports. Expert Reports. 2005. Disponível em: <http://www.ift.org/knowledge-center/read-ift-publications/science-reports/expert-reports/functional-foods.aspx>. Acesso em: 10 jun. 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira**: grãos: safra 2010/2011. Brasília: CONAB, 2011. 41p. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_08_09_11_44_03_boletim_agosto-2011..pdf. Acesso em: 28 ago. 2011.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Biodiesel**. 2011. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_06_07_08_34_00_conjuntura_biodiesel_maior_2011..pdf. Acesso em: 28 ago. 2011.

CORREA, S.B.M.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Probiotic potential and sensory properties of coconut flan supplemented with *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*, during shelf life of the product. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, n.9, p.1560-1568, 2008.

CRUZ, N.S.; CAPELLAS, M.; JARAMILLO, D.P.; TRUJILLO, A.J.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V. Soymilk treated by ultra high-pressure homogenization: acid coagulation properties and characteristics of a soy-yogurt product. **Food Hydrocolloids**, v.23, p.490–496, 2009.

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

DILLON, V.M.; COOK, P.E. Biocontrol of undesirable microorganisms in food. In: DILLON, V.M.; BOARD, R.G., eds. **Natural antimicrobial systems and food preservation**. Wallingford: CAB International, 1994. p.255-296.

DONKOR, O.N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Rheological properties and sensory characteristics of set-type soy yogurt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.9868-9876, 2007.

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

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

EMBRAPA SOJA. **A soja no Brasil**. 2004. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>. Acesso em: 23 jun. 2010.

EMBRAPA. **Catálogo de produtos e serviços**. Disponível em: http://www.catalogosnt.cnptia.embrapa.br/catalogo20/catalogo_de_produtos_e_servicos/arvore/CONTAG01_230_26102006145439.html. Acesso em: 10 set. 2010.

ESTEVES, E.A.; MARTINO, H.S.D.; OLIVEIRA, F.C.E.; BRESSAN, J.; COSTA, N.M.B. Chemical composition of a soybean cultivar lacking lipooxygenases (LOX2 and LOX3). **Food Chemistry**, v.122, p.238–242, 2010.

EUROPEAN COMMISSION CONCERTED ACTION ON FUNCTIONAL FOOD SCIENCE IN EUROPE. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. **British Journal of Nutrition**, v.81, n.4, suppl.1, p.S1-S27, 1999.

EVANGELISTA, C.M.; REGITANO-d'ARCE, M.A.B. Análise espectrofotométrica da ação das lipoxigenases em grãos de soja macerados em diferentes temperaturas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.3, p.270-274, 1997.

FARNWORTH, E.R.; MAINVILLE, I.; DESJARDINS, M.-P.; GARDNER, N.; FLISS, I.; CHAMPAGNE, C. Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. **International Journal of Food Microbiology**, v.116, p.174–181, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**: report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Córdoba, 2001. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf. Acesso em: 27 fev. 2009.

FOOKS, L.; FULLER, R.; 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.

FUCHS, R.H.B.; BORSATO, D.; BONA, E.; HAULY, M.C.O. “Iogurte” de soja suplementado com inulina e oligofrutose. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p.175-181, 2005.

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

GARDINER, G.; STANTON, C.; LYNCH, P.B.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Evaluation of cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.7, p.1379-1387, 1999.

GIBSON, G.R.; ZIEMER, C.J. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, v.8, n.5/6, p.473-479, 1998.

GIBSON, G.R. Prebiotics. **Best Practice & Research, Clinical Gastroenterology**, v.18, n.2, p.287-298, 2004.

GIBSON, G.R.; ROBERT, 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 Reviews**, v.17, n.2, p.259-275, 2004.

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.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.-R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v.360, p.512-519, 2003.

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

HÄNNINEN, O.; SEN, C.K. Nutritional supplements and functional foods: functional significance and global regulations. In: BAGCHI, D., ed. **Nutraceutical and functional food regulations in the United States and around the world**. London: Elsevier, Academic Press, 2008. p.11-35. (Food science and technology. International series).

HARAMI, J.B. **Desenvolvimento de cereal em barra com gelado comestível simbiótico**. São Paulo, 2008. 113p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

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.

HEKMAT, S.; SOLTANI, H.; REID, G. Growth and survival of *Lactobacillus reuteri* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 in yogurt for use as a functional food. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.10, p.293–296, 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4.ed. São Paulo: IAL, 2008. Disponível em:

http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7. Acesso em: 19 mar. 2009.

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

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S. Intestinal colonization, microbiota, and probiotics. **Journal of Pediatrics**, v.149, p.S115-S120, 2006.

JAQUET, M.; ROCHAT, I.; MOULIN, J.; CAVIN, C.; BIBILONI, R. Impact of coffee consumption on the gut microbiota: a human volunteer study. **International Journal of Food Microbiology**, v.130, p.117–121, 2009.

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

KAMALY, K.M. Bifidobacteria fermentation of soybean milk. **Food Research International**, v.30, n.9, p.675-682, 1998.

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

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

KUMAR, V.; RANI, A.; SOLANKI, S.; HUSSAIN, S.M. Influence of growing environment on the biochemical composition and physical characteristics of soybean seed. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p.188-195, 2006.

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

KWAK, N.S.; JUKES, D.J. Functional foods. Part 2. The impact on current regulatory terminology. **FoodControl**, v.12, n.2, p.109-117, 2001a.

LAPARRA, J.M.; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. **Pharmacological Research**, v.61, p.219–225, 2010.

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

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

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional *starter* cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p.67-78, 2004.

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

LIU, D.-M.; LI, L.; YANG, X.-Q.; LIANG, S.-Z.; WANG, J.-S. Survivability of *Lactobacillus rhamnosus* during the preparation of soy cheese. **Food Technology and Biotechnology**, v.44, p.417–422, 2006.

LIU, S.-N.; HAN, Y.; ZHOU, Z.-J. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. **Food Research International**, v.44, p.643-651, 2011.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. **Food Research International**, v.34, p.791–796, 2001a.

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

LUGASI, A.; SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance: a review. **Appetite**, v.51, n.3, p.456-467, 2008.

MARQUES, T.M.; WALL, R.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; RYAN, C.A.; STANTON, C. Programming infant gut microbiota: influence of dietary and environmental factors. **Current Opinion in Biotechnology**, v.21, p.149–156, 2010.

MARTÍN, R.; JIMÉNEZ, E.; HEILIG, H.; FERNÁNDEZ, L.; MARÍN, M.L.; ZOETENDAL, E.G.; RODRÍGUEZ, J.M. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.4 p.965–969, 2009.

MARTINS, C.A.O.; SEDIYAMA, C.S.; MOREIRA, M.A.; REIS, M.S.; ROCHA, V.S.; OLIVEIRA, M.G.A. Efeito da eliminação genética das lipoxigenases das sementes sobre

as características agronômicas da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.10, p.1389-1398, 2002.

MARUYAMA, L.Y.; CARDARELLI, H.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Textura instrumental de queijo *petit-suisse* potencialmente probiótico: influência de diferentes combinações de gomas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.386-393, 2006.

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

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

MENRAD, K. Market and marketing of functional food in Europe. **Journal of Food Engineering**, v.56, p.181–188, 2003.

MINELLI, E.B.; BENINI, A.; MARZOTTO, M.; SBARBATI, A.; RUZZENENTE, O.; FERRARIO, R.; HENDRIKS, H.; DELLAGLIO, F. Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. **International Dairy Journal**, v.14, p.723-736, 2004.

MONDRAGÓN-BERNAL, O.; RODRIGUES, M.I.; BOLINI, H.M.A.; MAUGERI, F. Optimization of synbiotic fermented food from hydrosoluble soy extract applying experimental design and sensory analysis techniques. **Journal of Sensory Studies**, v.25, n.3, p.371-389, 2010.

NEISH, A.S. Microbes in gastrointestinal health and disease. **Gastroenterology**, v.136, n.1, p.65-80, 2009.

O'FLAHERTY, S.; KLAENHAMMER, T.R. The role and potential of probiotic bacteria in the gut, and the communication between gut microflora and gut/host. **International Dairy Journal**, v.20, p.262–268, 2010.

O'HARA, A.M.; SHANAHAN, F. Gut microbiota: mining for therapeutic potential. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v.5, p.274–284, 2007.

OHAMA, H.; IKEDA, H.; MORIYAMA, H.; Health foods and foods with health claims in Japan. **Toxicology**, v.221, p.95–111, 2006.

OZCAN, T.; YILMAZ-ERSAN, L.; AKPINAR-BAYIZIT, A.; SAHIN, O.I.; AYDINOL, P. Viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 in rice pudding. **Mljekarstvo**, v.60, n.2, p.135-144, 2010.

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

PRADO, F.C.; PARADA, J.L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**, v.41, p.111–123, 2008.

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 & Technology**, v.13, p.3-11, 2002.

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

REID, G. Probiotics and prebiotics: progress and challenges. **International Dairy Journal**, v.18, p.969–975, 2008.

RICHTER, R.L.; VEDAMUTHU, E.R. Milk and milk products. In: CHANDAN, R.C., ed. **Compendium of the methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: Apha, 2001. p.483-495.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, v.27, p.1–11, 2010.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, suppl., p.1682S–1687S, 2000.

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

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

ROSS, R.P.; MILLS, S.; HILL, C.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Specific metabolite production by gut microbiota as a basis for probiotic function. **International Dairy Journal**, v.20, p.269–276, 2010.

ROSSI, E.A.; CAVALLINI, D.C.U.; MANZONI, M.S.J.; ROSSI, P.R. Produtos probióticos e prebióticos à base de soja. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F., eds. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. São

Paulo: Varela, 2011. cap.22, p.541-563.

ROSSI, E.A.; VENDRAMINI, R.C.; CARLOS, I.Z.; PEI, Y.C.; VALDEZ, G.F. Development of novel fermented soy milk product with potential probiotic properties. **European Food Research and Technology**, v.209, p.305-307, 1999.

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

SAAD, S.M.I.; CARDARELLI, H.R.; MARUYAMA, L.Y. **Queijos probiótico e/ou prebiótico, seu processo de fabricação e uso**. Br. Pat. PI0702.111-9, 20 jan. 2009. 27p. Revista de Propriedade Intelectual, item.3.1, n.1985, p.73.

SÁNCHEZ, B.; REYES-GAVILÁN, C.G.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M. Probiotic fermented milks: present and future. **International Journal of Dairy Technology**, v.62, n.4, p.472-483, 2009.

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, n.2, p.319-331, 2001.

SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, n.5/6, p.341-347, 1998.

SANDERS, M.E.; DOUGLAS, L.C. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. **Journal of the American Dietetic Association**, v.108, n.3, p.510-521, 2008.

SANDERS, M.E.; GIBSON, G.R.; GILL, H.; GUARNER, F. Probiotics in food: their potential to impact human health. **Council for Agricultural Science and Technology (CAST)**, n.36, out. 2007. Disponível em: <http://crossfitwv.typepad.com/files/cast-probiotics-issue-paper-final144.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2009.

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

SENDRA, E.; FAYOS, P.; LARIO, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; SAYAS-BARBERÁ, E.; PÉREZ-ALVAREZ, J.A. Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. **Food Microbiology**, v.25, p.13–21, 2008.

SETCHELL, K.D.; CASSIDY, A. Dietary soy isoflavones: biological effects and relevance to human health. **Journal of Nutrition**, v.129, p.758S-767S, 1999.

SHAH, N.P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v.17, p.1262–1277, 2007.

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

SOETERS, P.B. Probiotics: did we go wrong, and if so, where? **Clinical Nutrition**, v.27, p.173-178, 2008.

SOUZA, C.H.B. **Desenvolvimento de margarina probiótica e simbiótica**: viabilidade do probiótico no produto e resistência *in vitro*. São Paulo, 2010. 209p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

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

SVENSSON, U. Industrial perspectives. In: TANNOCK, GW., ed. **Probiotics**: a critical review. Norfolk: Horizon Scientific Press, 1999. p.57-64.

SWALLOW, D.M. Genetics of lactose persistence and lactose intolerance. **Annual Review of Genetics**, v.37, p.197-219, 2003.

TAMIME, A.Y.; SAARELA, M.; KORSLUND SØNDERGAARD, A.; MISTRY, V.V.; SHAH, N.P. Production and maintenance of viability of probiotic micro-organisms in dairy products. In: TAMIME, A.Y., ed. **Probiotic dairy products**. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. p.39-72.

TANG, C.-H. Effect of thermal pretreatment of raw soymilk on the gel strength and microstructure of tofu induced by microbial transglutaminase. **LWT - Food Science and Technology**, v.40, p.1403–1409, 2007.

TANG, C.-H.; WU, H.; CHEN, Z.; YANG, X.-Q. Formation and properties of glycinin-rich and β -conglycinin-rich soy protein isolate gels induced by microbial transglutaminase. **Food Research International**, v.39, p.87–97, 2006.

TSENG, Y.; XIONG, Y.L. Effect of inulin on the rheological properties of silken tofu coagulated with glucono-d-lactone. **Journal of Food Engineering**, v.90, p.511–516, 2009.

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

VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics - from Metchnikoff to bioactives.

International Dairy Journal, v.18, p.714–728, 2008.

VEIGA, P.G.; CUNHA, R.L.; VIOTTO, W.K.; PETENATE, A.J. Caracterização química, reológica e aceitação sensorial do queijo *petit-suisse* brasileiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.3, p.349-357, 2000.

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.

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

WEI, Q.-K.; CHEN, T.-R.; CHEN, J.-T. Using of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* to product the isoflavone aglycones in fermented soymilk. **International Journal of Food Microbiology**, v.117, p.120–124, 2007.

WELLS, A.L.; SAULNIER, D.M.A.; GIBSON, G.R. Gastrointestinal microflora and interactions with gut flora. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B., eds. **Handbook of prebiotics**. Boca Raton: CRC Press, 2008. p.14-38.

YASIR, S.; SUTTON, K.H.; NEWBERRY, M.P.; ANDREWS, N.R.; GERRARD, J.A. The impact of transglutaminase on soy proteins and tofu texture. **Food Chemistry**, v.104, n.4, p.1491–1501, 2007.

ZÁRATE, G.; CHAIA, A.P.; OLIVER, G. Some characteristics of practical relevance of the β -galactosidase from potential probiotic strains of *Propionibacterium acidipropionici*. **Anaerobe**, v.8, p.259–267, 2002.

ZULKURNAIN, M.; GOH, M.-H.; KARIM, A.A.; LIONG, M.-T. Development of a soy-based cream cheese. **Journal of Texture Studies**, v.39, p.635-654, 2008.

Anexo I. Protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
 Assistência Técnica Acadêmica

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF/72/2009
 Protocolo CEP/FCF/507
 CAAE: 0007.0.018.000-09

Ilma. Sra.
 Profa. Dra. Suzana Marta Isay Saad

I - Identificação

Projeto de Pesquisa:	Desenvolvimento de alimento probiótico à base de soja com polpa de fruta
Pesquisador Responsável:	Dra. Suzana Marta Isay Saad
Instituição:	FCF/FBA
Área Temática Especial:	Análise sensorial
Patrocinadores:	CNPq

II - Sumário Geral do Protocolo

Desenvolver um produto semelhante ao queijo *petit-suisse*, à base de soja, com polpa de fruta, com a adição composta dos microrganismos probióticos. O ensaio envolvendo indivíduos saudáveis visa a avaliação sensorial do produto.

Os objetivos do presente estudo são:

Geral:

Desenvolver um produto semelhante ao queijo *petit-suisse*, mas à base de soja, com polpa de fruta, com a adição de microrganismos probióticos.

Específicos:

Acompanhar a viabilidade dos microrganismos probióticos ao longo do armazenamento dos produtos (4°C, por até 28 dias).

Avaliar a aceitabilidade do produto sob o ponto de vista sensorial e suas características físico-químicas, microbiológicas e de textura instrumental durante o seu armazenamento.

Comparar o produto à base de soja e queijo *petit-suisse* probiótico de base láctea, reparados com a mesma cultura ABT.

Descrição da Casuística:

Características: ensaio com voluntários saudáveis (18 – 60 anos), que poderão receber três formulações, armazenadas por 7, 14 e 21 dias.

Procedência: alunos, docentes e funcionários da FCF.

Serão critérios de exclusão: Não gostar de produtos lácteos e a base de soja; possuir histórico de manifestação de alergia; intolerância a alimentos ou doença crônica (como

Anexo I. Protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Assistência Técnica Acadêmica

diabetes, hipotireoidismo, hipertireoidismo, hipertensão ou outras); estar fazendo tratamento médico; estar gripado, resfriado ou indisposto; ter entrado em contato, há menos de 1 hora, com materiais, alimentos ou cosméticos de cheiro forte.

III – Situação do Protocolo: APROVADO

Cabe ao pesquisador:

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

São Paulo, 29 de junho de 2009.

Profa. Dra. Mariza Landgraf
Vice-Coordenadora em exercício
Comitê de Ética em Pesquisa CEP/FCF/USP

Anexo II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

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

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa: **Desenvolvimento de alimento probiótico à base de soja com polpa de fruta**
2. Pesquisador: Prof^a. Dr^a. Susana Marta Isay Saad
3. Cargo/Função: docente
Departamento da FCF/USP: **Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica**
4. Avaliação do Risco da pesquisa: Risco Mínimo (X) Risco Médio () Risco Baixo () Risco Maior ()
5. Duração da Pesquisa: 2 anos (análise sensorial – 1 ano)

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

Justificativa, objetivos e procedimentos

Você está sendo convidado para participar da análise sensorial de um produto semelhante ao queijo *petit-suisse*. Este produto tem como característica, além da presença de leite e “leite” de soja como sua principal matéria prima, microrganismos que contribuem com a função intestinal e/ou fermentam o produto. O consumo da soja *in natura* ou de seus produtos tem despertado o interesse da população, não só por ser considerada fonte de nutrientes de baixo custo, mas pela sua capacidade de diminuir o risco de determinadas doenças. O desenvolvimento do queijo *petit-suisse* é feito pela mestrandia Natalia Silva Matias, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Susana Marta Isay Saad. O produto foi elaborado e acondicionado, de acordo com as Boas Práticas de Fabricação de Alimentos, nos laboratórios do Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica FCF/USP. O número mínimo de voluntários para esta análise sensorial é de 50 provedores. Caso você tenha interesse em participar, acomode-se junto a uma das cabines do Laboratório de Análise Sensorial (B16).

O produto a ser avaliado nesta análise é feito à base de leite e de soja. As formulações são constituídas também por açúcar, polpa de morango, gomas, corante, aroma e microrganismos que contribuem com a função intestinal e/ou fermentam o produto (*Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium* Bb-12 e *Streptococcus thermophilus*). Todos os ingredientes da formulação são utilizados em produtos disponíveis para consumo humano, ou seja, são de grau alimentício.

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

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

Desconfortos e riscos

Anexo II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

Benefícios esperados

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

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

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

Não haverá remuneração financeira aos participantes das análises sensoriais.

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

Natalia Silva Matias e Susana Marta Isay Saad.

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

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

.....
.....
.....

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

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

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa

Assinatura do pesquisador responsável
Profª. Drª. Susana Marta Isay Saad

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

Anexo III. Ficha para o teste de aceitação.

Ficha para teste de aceitação – produto semelhante ao queijo <i>petit-suisse</i> probiótico	
Nome: _____	Data: ____/____/____ Amostra: _____
Você recebeu uma amostra de um produto semelhante ao queijo <i>petit-suisse</i>. Por favor, prove a amostra e avalie de maneira geral (aparência, sabor e textura) usando a escala abaixo o seu grau de aceitação relacionado ao produto.	
<div style="margin-left: 40px;"><ul style="list-style-type: none">1 - Desgostei muitíssimo2 - Desgostei muito3 - Desgostei regularmente4 - Desgostei ligeiramente5 - Não gostei nem desgostei6 - Gostei ligeiramente7 - Gostei regularmente8 - Gostei muito9 - Gostei muitíssimo</div>	
<div style="margin-left: 40px;">Cite a característica que você mais gostou na amostra: ☺ _____</div> <div style="margin-left: 40px;">Cite a característica que você menos gostou na amostra: ☹ _____</div>	
Obrigado pela participação!	

Anexo IV. Estimativa de custos do queijo *petit-suisse* e do alimento à base de soja.

Queijo <i>petit-suisse</i>	Quantidade de ingrediente (Kg)	Preço/Kg (R\$)	Preço final* (R\$)
Massa-base de queijo quark			240,00
Creme de leite	0,60	7,50	4,52
Sacarose	0,53	2,45	1,29
Polpa de morango	0,51	12,70	6,41
Goma Guar	0,013	180,50	2,38
Goma Carragena	0,008	185,00	1,52
Goma Xantana	0,008	211,00	1,74
Corante	0,004	70,00	0,25
Aroma	0,002	50,00	0,11
Total			258,22

*Cálculos baseados nos gastos tidos com a produção em laboratório

Alimento à base de soja	Quantidade de ingrediente (Kg)	Preço/Kg (R\$)	Preço final (R\$)
Massa-base de “queijo” de soja			130,00
Creme de “leite” de soja	0,60	12,80	7,71
Sacarose	0,53	2,45	1,29
Polpa de morango	0,51	12,70	6,41
Goma Guar	0,013	180,50	2,38
Goma Carragena	0,008	185,00	1,52
Goma Xantana	0,008	211,00	1,74
Corante	0,004	70,00	0,25
Aroma	0,002	50,00	0,11
Total			151,41