UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

VIVIANE LÍVIA CARVALHO DE SOUZA

Requeijão cremoso probiótico: avaliação da
viabilidade de cepas de *Lactobacillus*, caracterização
físico-química e sensorial

LORENA - SP

2017

VIVIANE LÍVIA CARVALHO DE SOUZA

Requeijão cremoso probiótico: avaliação da viabilidade de cepas de *Lactobacillus*,
caracterização físico-química e sensorial

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia
de Lorena da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências do
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Industrial na área de concentração de
Microbiologia aplicada

Orientador: Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha

Edição reimpressa e corrigida

LORENA – SP
Agosto, 2017

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 pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Souza, Viviane Livia Carvalho

Requeijão cremoso probiótico: avaliação da
viabilidade de cepas de *Lactobacillus*, caracterização
físico-química e sensorial / Viviane Livia Carvalho
Souza; orientador Ismael Maciel de Mancilha - ed.
reimp., corr. - Lorena, 2017.
89 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de
Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo. 2017
Orientador: Ismael Maciel de Mancilha

1. Alimentos funcionais. 2. *Lactobacillus*. 3.
Probióticos. 4. Requeijão. I. Título. II. Mancilha,
Ismael Maciel de, orient.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, onde ainda que nos momentos difíceis não estava desamparada, sentia sua presença a cada passo meu.

Ao meu orientador Dr^o Ismael Maciel de Mancilha, por toda paciência, conhecimento compartilhado, apoio para corrigir minhas deficiências e pela confiança depositada em mim.

Aos meus pais, que embora não tenham tido as mesmas oportunidades que eu sempre se esforçaram e me apoiaram o máximo, de maneira que eu pudesse ir em busca dos meus sonhos.

À minha avó Mirtes pelo zelo, carinho e amor e apoio de sempre.

Às minhas irmãs Liliane e Ana Laura e os demais familiares, pelo apoio, por todo incentivo e presença constantes na minha vida sem eles esse sonho não seria possível.

À professora Jayne, professor Aarão e meu amigo Robinson, pelo apoio primordial nessa reta final. E principalmente gostaria de agradecê-los pelo zelo e empatia que apresentaram pelas questões de cunho pessoal.

Ao Toni, por ser tão companheiro e presente, agradeço pelo amor, incentivo, amizade, calma, descontração e ajuda incondicional nos momentos difíceis.

Às professoras Bernadette e Tatiane e os colegas Fabrício, Barbara Pereira, Javier, Larissa por estarem sempre tão dispostos a ajudar e sessar minhas dúvidas.

À professora Maria das Graças de Almeida Felipe, pelas palavras de incentivo que tanto me ajudaram na qualificação, e por dispor o seu laboratório sempre quando precisei.

Aos meus amigos em especial, Cyntia, Flaviana, Isabele, Natália, Vanessa Higuchi e Vanessa Costa, obrigada por toda ajuda e suporte nos momentos difíceis.

Aos colegas do laboratório de probióticos, Moysés, Juan, Ludmila, Caludio, Rafaela e Patrícia, por de alguma forma terem contribuído para realização deste trabalho.

À empresa Corbion PURAC que cedeu gentilmente o ácido láctico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela Concessão da bolsa de Mestrado.

À Universidade de São Paulo – Campus Luiz de Queiroz (ESALQ) em especial Denise, Melina e Giovana do laboratório de Laticínios e a Clínica do leite que

gentilmente cederam o laboratório para realização dos experimentos de lipídeos e umidade dos requeijões.

Ao pessoal da Micro cervejaria da EEL pela disponibilidade de utilização do laboratório de análise sensorial de bebidas.

A Escola de Engenharia de Lorena pela oportunidade de realização do mestrado.

A todos os professores que estiveram presentes na minha formação.

Aos técnicos e funcionários da EEL, em especial Sandra, André e Regina.

Muito obrigada!

“É necessário ter um caos em si para dar luz à uma estrela bailarina”

Nietzsche

BIOGRAFIA

Viviane Livia Carvalho de Souza, nasceu em Caratinga – Minas Gerais em 10 de fevereiro de 1989.

Em 2008 ingressou no curso de nutrição, onde na Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto – ENUT/UFOP, fez diversos projetos de extensão na área hospitalar atuando nas áreas de amamentação infantil e atendimento clínico nutricional na Santa Casa de Ouro Preto, estagiou em Unidades de Alimentação e Nutrição, Nutrição social e Nutrição clínica. Foi membro do Centro Acadêmico de Nutrição – CALNUT/UFOP e do Programa de Educação Tutorial – PET Saúde/Vigilância em Saúde. Realizou iniciação científica como voluntária no setor de Nutrição Clínica e Social da Universidade Federal de Ouro Preto e atuou como professora de ciências do ciclo básico em uma escola municipal local. Graduou-se Nutricionista em agosto de 2013.

Em 2014 atuou como nutricionista gerente de unidade na empresa Stillus Alimentação Ltda.

Em fevereiro de 2015 ingressou no Mestrado em Ciências no Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia Industrial do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, onde estudou sobre Requeijão cremoso probiótico: avaliação da viabilidade de cepas de *Lactobacillus*, caracterização físico-química e sensorial.

RESUMO

SOUZA, V.L.C. **Requeijão cremoso probiótico: avaliação da viabilidade de cepas de *Lactobacillus*, caracterização físico-química e sensorial.** 2017. 89 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

A crescente preocupação da população com a saúde tem aumentado a demanda por alimentos que apresentam propriedades funcionais, os quais, além do valor nutricional agregado, estimulam atividades fisiológicas e/ou metabólicas proporcionando benefícios ao indivíduo. Dentre estes encontram-se os alimentos probióticos, prebióticos e simbióticos. Requeijão é um alimento que apresenta potencial como veículo de espécies de micro-organismos probióticos, pois sua matriz apresenta características que contribui para a sobrevivência dos micro-organismo, além de ser um produto com boa aceitabilidade no Brasil. Os alimentos probióticos se destacam no mercado devido às várias evidências científicas sobre seus efeitos benéficos à saúde humana. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade celular de 6 cepas de *Lactobacillus* a saber: *L. plantarum* ATCC 8014, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. delbrueckii* UFV H2B20, *L. fermentum* ATCC 9338, *L. casei* ATCC 7469 e *L. paracasei* SP11 incorporadas no requeijão cremoso. Testes preliminares foram realizados a fim de se adequar a formulação de requeijão cremoso com as características requeridas pela legislação vigente. Posteriormente, fabricou-se o requeijão cremoso probiótico sendo incorporado as respectivas cepas, de forma individual, onde avaliou-se a viabilidade destas cepas ao longo do período de 65 dias de estocagem a 5°C, tempo este correspondente a vida útil do produto no mercado. Amostras foram coletadas para caracterização físico química (pH e acidez titulável) nos tempos 7, 30, 45 e 65 dias. Posteriormente o requeijão foi caracterizado quanto aos padrões de identidade estabelecido pela ANVISA. No tempo inicial e após 65 dias amostras foram submetidas à análise sensorial sendo avaliados atributos como sabor, odor, aparência e impressão global, bem como a intenção de compra e índice de aceitabilidade. Nas formulações probióticas a população de células viáveis em 1g de requeijão contendo *Lactobacillus* foi superior a 10^8 UFC/g após 65 dias de armazenamento a 5°C estando em conformidade com os padrões estabelecidos pela ANVISA. As formulações contendo *Lactobacillus* apresentaram valores de pH e acidez titulável mais ácidos em relação a formulação base, atingindo valores de pH inferiores a 6.44, e com produção máxima de ácido láctico de 0,43% no entanto mantiveram-se constantes no período de armazenamento por 65 dias. As análises físico – químicas mostraram que as formulações de requeijão cremoso estão de acordo com o padrão mínimo de identidade do requeijão cremoso estabelecido pela ANVISA. A análise sensorial revelou que a incorporação de *Lactobacillus* nas formulações não influenciou negativamente nos atributos avaliados, bem como na aceitação do produto, sendo a formulação contendo *Lactobacillus paracasei* que obteve a maior aceitação, sendo as demais classificadas pelos provadores como “gostei ligeiramente”. Estes resultados permitem concluir que requeijão cremoso e cepas de *Lactobacillus* são adequados para a formulação de um novo alimento funcional. Desta forma, contribuiu-se para o desenvolvimento de uma tecnologia para produção de requeijão cremoso probiótico em conformidade com os padrões de qualidade estabelecidos na legislação vigente.

Palavras chave: Alimentos funcionais, *Lactobacillus*, Probióticos, Requeijão.

ABSTRACT

SOUZA, V.L.C. **Probiotic Brazilian cream cheese:** evaluation of the viability of *Lactobacillus* strains, physico-chemical and sensorial characterization. 2017. 89 p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

The growing concern of the population with health has increased the demand for foods that have functional properties, which, besides the added nutritional value, stimulate physiological and / or metabolic activities providing benefits to the individual. Among these are probiotic, prebiotic and symbiotic foods. Brazilian cream cheese is a food that has potential as a vehicle for probiotic microorganism species, since its matrix has characteristics that contribute to the survival of microorganisms, besides being a product with high acceptability in Brazil. Probiotic foods stand out in the market because of the various scientific evidence on their beneficial effects on human health. Thus, the present work's objective was to evaluate the cell viability of 6 strains of *Lactobacillus*, namely: *L. plantarum* ATCC 8014, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. delbrueckii* UFV H2B20, *L. fermentum* ATCC 9338, *L. casei* ATCC 7469 And *L. paracasei* SP11 incorporated in Brazilian cream cheese. Preliminary tests were performed in order to adapt the Brazilian cream cheese formulation to the characteristics required by current legislation. Subsequently, the probiotic Brazilian cream cheese was inoculated with the respective strains, individually, where the viability of said strains was evaluated over the 65-day storage period at 5 ° C, which corresponds to the shelf life of the product on the market. Samples were collected for physico-chemical characterization (pH and titratable acidity) in 7, 30, 45 and 65 days. Subsequently the Brazilian cream cheese was characterized as to the identity standards established by ANVISA. At the initial time and after 65 days, samples were submitted to sensorial analysis being evaluated attributes such as taste, odor, appearance and overall impression, as well as the purchase intention and acceptability index. In all probiotic formulations the viable cell population in 1g of Brazilian cream cheese containing *Lactobacillus* was greater than 10^8 CFU / g after 65 days of storage at 5 ° C, being in accordance with standards established by ANVISA. The formulations containing *Lactobacillus* presented pH values and titratable acidity more acidic in relation to the base formulation, reaching values of pH lower than 6.44 and with maximum production of lactic acid of 0.43%, however, they remained constant in the storage period for 65 days. The physico-chemical analyzes showed that all the Brazilian cream cheese formulations are in accordance with the minimum standard established by ANVISA. Sensory analysis revealed that the incorporation of *Lactobacillus* in the formulations did not negatively influence the evaluated attributes, as well as the acceptance of the product. The formulation containing *Lactobacillus paracasei* obtained the most acceptance, being the others classified by the tasters as "liked slightly". These results allow us to conclude that *Lactobacillus* are suitable microorganisms for the creation of a new functional product, as well as the probiotic Brazilian cream cheese. In this way, this work contributed to the development of a technology for the production of probiotic Brazilian cream cheese in compliance with the quality standards established in the current legislation.

Keywords: Functional foods; *Lactobacillus*, Probiotics, Brazilian cream cheese.

Lista de Figuras

Figura 1 - Mecanismo de ação dos probióticos.	23
Figura 2 - Fluxograma da produção de requeijão cremoso.	38
Figura 3 - A) Placa contendo número de células incontáveis. B) Número de células entre 25 e 250.	40
Figura 4 - Determinação de pH em requeijão cremoso.	40
Figura 5 - Acidez titulável em termo de ácido láctico em requeijão cremoso. A) amostra de requeijão cremoso com álcool 95% neutro, B) filtração em papel filtro quantitativo, C) Titulação da amostra.	41
Figura 6 - Butirômetro de Gerber para leite.	42
Figura 7 – A) Etapa de secagem das placas vazias B) Pesagem da amostra. C) Amostra em forma de “Sanduiche”.....	43
Figura 8 - Modelo de ficha a ser utilizada na avaliação sensorial.....	46
Figura 9 - A) Formulação de requeijão cremoso estável B) Formulação de requeijão cremoso apresentando formação de grumos e separação de fases.....	48
Figura 10 – Variação da viabilidade celular das cepas de <i>Lactobacillus</i> (log UFC/g) nas diferentes formulações de requeijão cremoso probiótico durante armazenamento por 65 dias a 5°C.....	51
Figura 11 - Representação espacial das médias dos atributos avaliados no teste de aceitação das formulações de requeijão probiótico em relação a formulação base no tempo inicial (T0) e após 65 dias de armazenamento a 5°C (T65).	60
Figura 12 - Valores médios das notas atribuídas o quesito impressão global para as diferentes formulações de requeijão probiótico avaliadas.	62
Figura 13 - Índice de aceitabilidade das formulações de requeijão cremoso probiótico avaliadas.	63
Figura 14 - Valores médios das notas referentes ao quesito “intenção de compra” das diferentes formulações de requeijão probiótico avaliadas.	63

Lista de Tabelas

Tabela 1- Espécies de micro-organismos probióticos aprovados pela ANVISA.....	25
Tabela 2 - Composição das formulações de requeijão cremoso avaliadas.....	37
Tabela 3 - Variação da população de células viáveis (log10 UFC/g) nas diferentes formulações de requeijão cremoso durante 65 dias de armazenagem a 5°C	50
Tabela 4 - Valores de pH e desvio padrão das formulações de requeijão cremoso avaliadas durante 65 dias de estocagem a 5°C.....	52
Tabela 5 - Valores de acidez titulável e desvio padrão das diferentes formulações de requeijão probiótico armazenadas por 65 dias a 5°C.	54
Tabela 6 - Características físico – químicas das formulações de requeijão cremoso probiótico após 65 dias de armazenagem a 5°C.	55
Tabela 7 – Resultados das análises microbiológicas das formulações de requeijão	56
Tabela 8 - Valores médios das notas dos atributos e impressão global da avaliação sensorial das diferentes formulações de requeijão probiótico.	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS	19
2.1.1 PROBIÓTICOS	21
2.1.1.2 Gênero <i>Lactobacillus</i>	26
2.1.1.3 Alimentos probióticos	27
2.2 QUEIJOS.....	29
2.2.1 QUEIJOS FUNDIDOS	30
2.2.2 REQUEIJÃO	31
2.2.2.1 Processamento do Requeijão Cremoso	32
2.2.2.2 Requeijão cremoso Probiótico.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 MICRO-ORGANISMOS E PREPARO DO INÓCULO	36
3.1.1 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO DE REQUEIJÃO CREMOSO BASE	36
3.1.2 PREPARO DO REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO	39
3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS	39
3.2.1 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	39
3.2.2 DETERMINAÇÃO DO pH E ACIDEZ TITULÁVEL	40
3.2.3 DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ TITULÁVEL	41
3.2.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LIPÍDEOS.....	42
3.2.5 DETERMINAÇÃO DE EXTRATO SECO TOTAL	43
3.2.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE GORDURA NO EXTRATO SECO (GES)	43
3.2.7 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	44
3.2.7.1 Obtenção e preparo das amostras de requeijão cremoso para análise microbiológica	44
3.2.7.2 Contagem de coliformes totais e termotolerantes	44
3.2.7.3 Contagem de <i>Staphylococcus spp</i>	44
3.2.7.4 CONTAGEM DE <i>SALMONELLA</i>	45
3.2.8 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E CARBOIDRATOS.....	45
3.2.9 AVALIAÇÃO SENSORIAL	45
3.2.8.1 ANÁLISE DOS RESULTADOS	47
3.3 COMITÊ DE ÉTICA.....	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO DE REQUEIJÃO CREMOSO BASE	48
4.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR NAS DIFERENTES FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO	49
4.3 VARIAÇÃO DO pH E DA ACIDEZ TITULÁVEL DAS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO	51
4.4 AVALIAÇÃO SENSORIAL DO REQUEIJÃO PROBIÓTICO	57
5 CONCLUSÕES	65
6 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	66
REFERÊNCIAS.....	67
APENDICE A	78

APENDICE B..... 81
APENDICE C..... 88

1 INTRODUÇÃO

A população cada vez mais preocupada com a saúde preventiva tem optado por alimentos funcionais, de forma a promover a saúde. É sabido a importância de se manter uma microbiota intestinal humana saudável e os alimentos funcionais atuam de maneira complementar à fisiologia intestinal. Para assegurar um efeito benéfico adequado, é importante ressaltar que as substâncias denominadas como fisiologicamente ativas, devem estar presentes nos alimentos em quantidades adequadas e consumidas com frequência.

O mercado brasileiro encontra-se em crescente ascensão no que diz respeito ao comércio de alimentos funcionais, o que tem estimulado o segmento de pesquisas e desenvolvimento no setor alimentício, tornando os alimentos mais saudáveis e atrativos destacando a inclusão na dieta de fibras, probióticos, prebióticos vitaminas entre outros.

Entende-se por probiótico os micro-organismos vivos com capacidade de promover o equilíbrio microbiano intestinal. Dentre os benefícios provenientes de probióticos destacam-se a modulação da microbiota intestinal; alteração do metabolismo microbiano; estímulo da imunidade e absorção de determinados nutrientes, bem como o auxílio na digestão da lactose; supressão do câncer e redução do nível do colesterol sanguíneo.

A ANVISA preconiza, por meio de uma Lista de Alegações de Propriedade Funcional, que para um produto receber alegação de propriedade funcional relacionada a característica probiótica, o mesmo deve apresentar quantidade mínima viável de micro-organismos de $8 \text{ a } 9 \log_{10} \text{ UFC/g ou mL}$ no produto pronto para o consumo. Neste contexto, vale destacar que essa quantidade deve ser consumida diariamente, com a finalidade de assegurar os efeitos benéficos do probiótico.

As bactérias lácticas se destacam como componentes dos alimentos funcionais, sendo 56 espécies do gênero *Lactobacillus* e 29 espécies do gênero *Bifidobacterium*, e em menor escala *Enterococcus faecium*. No entanto apenas 10 cepas apresentam efeito probiótico comprovado, destacando *Lactobacillus acidophilus*; *Lactobacillus casei* variedade *shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*; *Lactobacillus casei* variedade *defensis*; *Lactobacillus paracasei*; *Lactobacillus lactis*; *Bifidobacterium bifidum*; *Bifidobacterium animalis* (incluindo subespécie *B. Lactis*); *Bifidobacterium animalis*; *Bifidobacterium longum* e

Enterococcus faecium, apresentam efeito probiótico comprovado.

Dentre os alimentos probióticos destacam-se os produtos de origem láctea, dentre estes os iogurtes, queijos, bebidas lácteas fermentadas, sorvetes e sobremesas. Os queijos apresentam vantagens em relação aos outros produtos alimentícios como veículos para micro-organismos probióticos devido ao seu conteúdo de gordura, baixo nível de oxigênio, condições de estocagem, matriz sólida, um pH mais elevado que os iogurtes e leites fermentados.

Estudos têm direcionado o desenvolvimento de queijos probióticos a partir dos diferentes tipos disponíveis no mercado. Dentre eles encontram-se os queijos fundidos, que surgiram como uma alternativa de manter as características físico-químicas, sensoriais e aumentando a conservação de alguns queijos durante o processo de exportação do produto.

Dentre os queijos fundidos elaborados a partir da massa fresca destaca-se o requeijão cremoso, que surgiu como uma opção de aproveitamento do leite ácido e apresenta boa aceitação pelo consumidor brasileiro. Neste contexto, destaca-se que a literatura é escassa no que diz a respeito a requeijão cremoso probiótico, sendo que a maioria dos trabalhos não avalia a viabilidade celular durante a vida de prateleira do produto.

Diante do exposto, a associação de evidências científicas concernentes aos efeitos benéficos promovidos por alimentos probióticos, a demanda por alimentos mais saudáveis e a boa aceitação por requeijão cremoso -sustenta a avaliação deste alimento como veículo de micro-organismos probióticos. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia de produção de requeijão cremoso probiótico. Especificamente, objetivou-se desenvolver formulações de requeijão cremoso probiótico; estudar a viabilidade de cepas de *Lactobacillus* incorporadas no requeijão probiótico mantido sob refrigeração, bem como caracterizar este alimento no tocante às suas propriedades físico-químicas, microbiológica e sensorial.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Roberfroid (2007), define alimentos funcionais como alimentos que agem benéficamente no organismo promovendo a saúde, por meio de mecanismos que não são obtidos pela nutrição convencional, sendo que este efeito atua de forma à promoção da saúde e não à cura de doenças.

Os consumidores, atraídos pela possibilidade de optar por alimentos que promovam benefícios adicionais à saúde, tendem a optar por alimentos funcionais, estimulando a inovação no desenvolvimento de novos produtos (ARES et al., 2009)

Segundo Stringheta et al (2007) a primeira definição de alimentos funcionais surgiu no Japão, em 1980, sendo definido como alimentos que fazem parte de uma dieta normal, que apresentam aparência similar aos alimentos convencionais, atuando de forma a reduzir o risco de doenças crônicas mantendo suas funções básicas nutricionais.

No entanto a legislação brasileira (BRASIL, 1999), regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA por meio da Resolução nº 18 de 30/04/1999, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde no Brasil, define como alimento funcional: “todo alimento ou ingrediente, que além das funções nutricionais básicas, quando consumido diariamente, produz efeitos metabólicos, fisiológicos e benéficos à saúde, sendo seguro sua ingestão sem supervisão médica.”

De acordo com Rodrigues et al. (2011) para se garantir os benefícios do consumo dos alimentos funcionais, as substâncias denominadas fisiologicamente ativas devem estar presentes nos alimentos em quantidades adequadas. No Brasil a ANVISA (BRASIL 1999), é o órgão responsável por avaliar alegações de propriedades funcionais em alimentos, por meio da Comissão Técnico-Científica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos (CTCAF).

Os alimentos funcionais podem ser classificados de acordo com o alimento em si, ou conforme seus componentes bioativos, como por exemplo, probióticos, fitoquímicos, prebióticos, minerais essenciais, vitaminas e determinados peptídeos e proteínas. (ARVANITOYANNIS; HOUWELINGENKOUKALIAROGLOU, 2005).

Segundo Moraes e Colla (2006), os ácidos graxos poli-insaturados, em especial ômega 3 e 6 apresentam efeitos funcionais, reduzindo a hipercolesterolemia.

Dentre os alimentos que contêm ômega 3 e 6, estão os peixes de água fria, como atum, bacalhau, salmão, sardinha, óleos vegetais, nozes, sementes de linhaça e alguns vegetais.

Os alimentos funcionais atuam de maneira complementar a fisiologia intestinal, assim como a composição e atividade do ecossistema microbiano responsável pela sua colonização, devido aos diversos estudos evidenciando esses benefícios, aumentou-se interesse para o desenvolvimento de alimentos funcionais, o que pode ser confirmado pelos recentes desenvolvimentos na área de probióticos, prebióticos e simbióticos (ROBERFROID, 2005).

Define-se probióticos como “micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001). Os prebióticos são definidos como ‘ingredientes seletivamente fermentáveis que permitem modificações específicas na composição e/ou na atividade da microbiota gastrointestinal que resultam em benefícios a saúde do hospedeiro’ (ROBERFROID, 2007). Os produtos simbióticos são constituídos por uma combinação de probiótico e prebióticos (SAAD, 2006).

De acordo com Saad (2006) uma microbiota intestinal humana saudável age de maneira benéfica no organismo, e tanto na saúde como na doença, uma dieta suplementada de probióticos e prebióticos pode vir a atuar de maneira positiva assegurando o equilíbrio da mesma.

O trato gastrointestinal (TGI) humano é um micro sistema cinético que possibilita o desempenho normal das funções fisiológicas do hospedeiro, exceto quando há dominância de micro-organismos prejudiciais e com potencial patogênico, o que causa desequilíbrio da microbiota intestinal resultando na proliferação de patógenos. Diante dessa afirmativa destaca-se a importância de manter o equilíbrio da microbiota, o que pode ser adquirido ou assegurado pela suplementação adequada na dieta com alimentos funcionais (BIELECKA; BIEDRZYCKA; MAJKOWSKA, 2002).

Segundo Pimentel et al. (2005), as fibras podem ser encontradas em raízes, grãos ou hortaliças, sendo classificadas em solúveis e insolúveis. As solúveis tendem a formar géis devido a sua capacidade de absorver água, o gel atua de maneira benéfica ao organismo, retardando o esvaziamento gástrico e o tempo de trânsito intestinal, diminuindo a absorção de glicose e colesterol e protegendo contra o câncer colorretal. A inulina e os frutooligosacarídeos (FOS), são compostos não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, estimulando seletivamente a proliferação ou

atividade de bactérias desejáveis no cólon, e são denominados prebióticos (SAAD, 2006).

Os únicos compostos prebióticos permitidos no Brasil e utilizados sobre alegação de efeito sobre a composição da microbiota intestinal, pela indústria de alimentos são a inulina, e os fruto- oligossacarídeos (FOS), sendo recomendada a dose diária mínima de 3g para alimentos sólidos e de 1,5 g para alimentos líquidos (BRASIL, 2008). É necessário ressaltar a necessidade de garantir o efeito fisiológico desejado, portanto as substâncias denominadas como fisiologicamente ativas devem estar presentes nos alimentos em quantidades adequadas (RODRIGUES et al., 2011).

De acordo com Stringheta et al. (2007), em 2005 o mercado brasileiro voltado para os alimentos funcionais representou 14% da indústria de alimentos, sendo avaliado em US\$ 600 milhões, representando em torno de 20% o crescimento médio anual relacionado ao consumo de produtos lácteos funcionais.

Belchior (2004), citou que naquela época já era uma realidade a indústria investir cada vez mais no desenvolvimento de produtos lácteos funcionais, tornando-os mais atrativos, por meio da incorporação de fibras, probióticos, vitaminas entre outros.

Devido ao interesse crescente dos consumidores por esses produtos, o desenvolvimento de alimentos funcionais como probióticos apresenta perspectiva de continuar em ascensão durante as próximas décadas. A divulgação desses produtos pela mídia tem proporcionado resultados satisfatórios, aumentando significativamente o conhecimento do consumidor, referente aos diferentes tipos de alimentos funcionais (WINTER, 2008).

2.1.1 Probióticos

O imunologista russo Elie Metchnikoff no século XIX, correlacionou a vida longa e saudável de camponeses búlgaros com o consumo diário de leites fermentados contendo *Lactobacillus*, que agiam de forma benéfica a saúde intestinal do consumidor, assim surgiu o primeiro conceito de micro-organismos probióticos. (DOUGLAS, 2008).

De acordo com Coppola e Turnes (2004), probiótico é uma palavra de origem grega que significa “pró-vida”. Este termo surgiu em 1965, quando Lilly e Still definiram

probiótico como substância microbiana que estimulava o crescimento de outros micro-organismos (OMGE, 2008).

Ao longo dos anos diferentes definições de probióticos foram publicadas. (SANDERS, 2007). Moraes e Jacob (2006), ressaltam a existência do vínculo do termo probiótico a micro-organismos vivos no final da década de 1980 quando Fuller (1989), definiu probiótico como um suplemento alimentar, proveniente de micro-organismos vivos, devido a sua capacidade de promover o balanço da microbiota intestinal, agindo de forma benéfica no animal hospedeiro.

Porém a definição aceita em âmbito internacional é que “probióticos são micro-organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001).

Para que uma cepa de micro-organismo possa ser aprovada como probiótico, deve apresentar, pelo menos duas características obrigatórias; não ser patogênica e ser considerada como segura para consumo humano, GRAS – “generally recognized as safe” (GRANATO et al., 2010).

Portanto na seleção de probióticos para aplicação industrial, os principais critérios incluem: caracterização do gênero, espécie, linhagem e sua origem, com indicação inicial de segurança presumida, em relação as cepas probióticas conhecidas; estudo da aderência e do potencial invasivo da cepa; estudo entre a interação da cepa com a microbiota intestinal e o hospedeiro; verificação de histórico de patogenicidade e infectividade, de fatores de virulência, de toxicidade, de atividade metabólica, de atividade hemolítica, além das propriedades intrínsecas como por exemplo a resistência a antibióticos (FAO/WHO, 2002; HOLZAPFEL; PINEIRO ; STANTON, 2007; VASILJEVIC ; SHAH, 2008).

Puupponen- Pimia et al. (2002), ressaltaram que os probióticos atuam de maneira benéfica ao organismo, aumentando a resistência contra patógenos, devido a sua influência positiva sobre a microbiota intestinal humana, resultado de fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos. O consumo de culturas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas no TGI, reprimindo a proliferação de bactérias com potencial prejudicial, suprimindo os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro.

De acordo com Fuller (1989), três mecanismos de ação são atribuídos aos probióticos, sendo: supressão do número de micro-organismos patógenos, através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e

a competição por sítios de adesão; interferência na atividade enzimática, devido a alteração do metabolismo microbiano; aumento dos níveis de anticorpos e da atividade dos macrófagos, de forma a estimular a imunidade do hospedeiro.

Segundo Saad et al. (2011), as bactérias intestinais mais estudadas para o uso como potenciais probióticos são os membros dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Cepas de *Enterococcus*, *Bacillus* e *Escherichia* são também utilizados como probióticos, entretanto esses micro – organismos são comumente encontrados em suplementos e não em alimentos. Diante do exposto os mecanismos de ação de Bifidobactérias e *Lactobacillus* são descritos na figura 1.

Figura 1 - Mecanismo de ação dos probióticos.

Fonte: Adaptada (SAAD; 2006).

A modulação da microbiota intestinal por micro-organismos probióticos também é conhecido como exclusão competitiva e pode ocorrer devido à competição por sítios de adesão, competição por nutrientes (OUWEHAND et al., 2002) ou devido as bactérias lácticas a partir da fermentação produzirem ácidos orgânicos como acetato, propionato, butirato e outros produtos importantes, como o lactato, succinato, etanol, valerato e caproato (SALMINEN et al., 1998), onde a redução do pH, proporcionada por esses ácidos, torna o meio desfavorável para o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos (OLIVEIRA, 2006).

As bactérias lácticas são caracterizadas pela liberação de diversas enzimas no lúmen intestinal, que exercem efeitos sinérgicos sobre a digestão, atuando no alívio de sintomas relacionados à deficiência de absorção de nutrientes. Na microbiota intestinal essas bactérias exercem uma função vitalícia, que consiste na produção da enzima β -D galactosidase, que auxilia na hidrólise da lactose no intestino, tendo uma ação benéfica em indivíduos que apresentam intolerância a lactose (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001).

De acordo com Saad et al. (2011), as bactérias lácticas caracterizam-se pela liberação de diversas enzimas no lúmen intestinal, onde a hidrólise enzimática bacteriana pode aumentar a biodisponibilidade de proteínas e de gordura e aumentar a liberação de aminoácidos livres, além de ácido láctico, ácidos graxos de cadeia curta, como propionico e butírico. Quando absorvidos, esses ácidos graxos contribuem para o pool de energia disponível do hospedeiro e podem proteger contra mudanças patológicas na mucosa do cólon, além de uma concentração mais elevada de ácidos graxos de cadeia curta e auxiliar na manutenção de um pH apropriado no lúmen do cólon, sendo crucial para a expressão de muitas enzimas bacterianas sobre os compostos estranhos e sobre o metabolismo de carcinógenos no intestino. Assim, a produção de ácido butírico por algumas bactérias probióticas neutraliza a atividade de alguns carcinógenos da dieta, como as nitrosaminas, resultantes da atividade metabólica de bactérias comensais em indivíduos que consomem dietas com alto teor de proteína (WOLLOWSKI et al., 2001).

Segundo Kotzamanidis et al (2010), o mecanismo de ação em relação ao sistema imunológico se deve ao fato de probióticos apresentarem capacidade de modular a resposta inflamatória e anti-inflamatória inata e de se adaptar à resposta imune do hospedeiro. Portanto algumas espécies de *Lactobacillus* melhoram a imunidade do hospedeiro, contribuindo na atividade fagocítica dos monócitos e das

células polimorfonucleares (PMN), e também na produção de Imunoglobulina A (IgA e citocinas).

Puupponen - Pimiã et al. (2002), afirma que a característica mais promissora no desenvolvimento de probióticos é a resistência aumentada contra patógenos, atuando de forma a excluir micro-organismos potencialmente patogênicos e reforçando os mecanismos naturais de defesa do organismo.

De acordo com Kopp-Hoolihan (2001) outros efeitos resultantes da ingestão de probióticos englobam sua atuação nas reações alérgicas, melhoria da saúde urogenital, prevenção ao câncer e efeitos anti-hipertensivos.

As bactérias lácticas se destacam no grupo de probióticos mais estudados como componentes de alimentos funcionais (ROBERFROID, 2007), com destaque para espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e em menor escala *Enterococcus faecium*. Estas espécies (Tabela 1) são as empregadas com maior frequência como suplementos probióticos, sendo isoladas em todas as porções do trato gastrointestinal do indivíduo saudável (CHARTERIS et al., 1998; BIELECKA et al., 2002). Há indícios que o íleo terminal e o cólon respectivamente, são os locais mais colonizados por espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (SAAD, 2006).

Segundo Shah (2007), 56 espécies pertencem ao gênero *Lactobacillus* e 29 espécies de *Bifidobacterium*, no entanto apenas 10 cepas apresentam efeito probiótico comprovado.

Tabela 1- Espécies de micro-organismos probióticos aprovados pela ANVISA.

<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus casei</i> variedade <i>shirota</i>
<i>Lactobacillus casei</i> variedade <i>ramnosus</i>
<i>Lactobacillus casei</i> variedade <i>defensis</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>Bifidobacterium animalis</i> (incluindo a subespécie <i>B. lactis</i>)
<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Enterococcus faecium</i>

Fonte: (BRASIL, 2002); (BRASIL, 2008).

De acordo com Reid (2006), em um estudo no qual foram listadas as cepas que apresentam efeito probiótico comprovado, estão em evidência *Lactobacillus casei* Shirota, *L. casei* DN114-001, *L. johnsonii* La1, *L. acidophilus* La-5, *Bifidobacterium animalis* DN-173-010 e *B. animalis* Bb-12; tais cepas são aprovadas pela ANVISA, e possuem destaque nas indústrias de produtos lácteos.

2.1.1.2 Gênero *Lactobacillus*

A descrição de *Lactobacillus* por Beijerinck em 1901 como bactérias Gram-positivas separou os coliformes das bactérias lácticas; o interesse pela presença dos *Lactobacillus* na dieta humana aumentou desde o início do século XX, quando Elie Metchnikoff – Instituto Pasteur, Paris – promoveu o uso desses microrganismos para a bacterioprofilaxia e bacterioterapia (STILES., 1997).

O gênero *Lactobacillus* é um grupo heterogêneo de bactérias gram-positivas, não formadoras de esporos encontradas em forma de bacilos ou cocobacilos, são bactérias aero-toleantes, acidúricas com crescimento em pH em torno de 4.50 ou acidofílicas, estritamente fermentativas, com necessidades nutricionais que incluem carboidratos, aminoácidos, peptídeos, ésteres de ácidos graxos, sais, derivados de ácidos nucleicos e vitaminas, com crescimento em temperaturas entre 27 a 40 °C, sendo a temperatura ótima para crescimento 37°C (HAMMES; VOGEL,1995; HOLT, 1994).

Além de ser de grande importância para o homem como membros essenciais de uma microbiota humana saudável e servindo como elementos importantes de uma dieta humana saudável (LAHTINEN et al.,2011). Podendo ser encontradas em plantas, fezes e habitats artificiais como efluentes e alimentos em decomposição e em plantas (HAMMES; VOGEL,1995).

A divisão clássica dos *Lactobacillus* está baseada em suas características fermentativas, bem como os produtos do metabolismo dos carboidratos onde as espécies de *Lactobacillus* podem ser subdivididas em homofermentativas e heterofermentativas (LAHTINEN et al., 2011).

Os *Lactobacillus* homofermentativos incluem os que fermentam glicose em lactato como produto principal e mais abundante, através da via glicolítica Embden – Meyerhoff – Parnas (EMP), não fermentando pentoses ou gliconato (VÁSQUEZ et

al.,2005; MOZZI; RAYA; VIGNOLO, 2010). Neste grupo encontram-se espécies de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* entre outros (AXELSSON.,2004).

No grupo de bactérias lácticas heterofermentativas encontramos por exemplo espécies de *Lactobacillus fermentum* (AXELSSON,2004). Essas bactérias degradam hexoses e pentoses pela via D- xilulose 5- fosfato fosfocetolase, enzima específica da via heterofermentativa, obtendo como produto etanol, lactato, acetato, formato e CO₂ (MOZZI; RAYA; VIGNOLO, 2010).

Adicionalmente existe o grupo de bactérias denominados heterofermentativos facultativos, que também fermentam pentoses, através de uma fosfocetolase induzida para produzir ácidos láctico e acético (VÀSQUEZ et al.,2005). Entre as espécies encontradas nessa categoria estão o *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei* (AXELSSON, 2004).

2.1.1.3 Alimentos probióticos

Os alimentos são matrizes importantes para veiculação de micro-organismos probióticos no organismo humano. Além disso, os alimentos proporcionam um ambiente tamponante que protege as células durante a passagem pelo trato gastrointestinal do hospedeiro e influenciam a colonização do intestino por parte desses micro-organismos. Além disso, os alimentos podem conter outros ingredientes funcionais, como compostos bioativos, que podem interagir com os probióticos e alterar positivamente a sua funcionalidade e eficácia (RANADHEERA et al., 2009).

De acordo com Sveje (2007), a quantidade de produtos probióticos disponíveis conciliado com a familiaridade do consumidor com o conceito de probióticos têm estimulado a realização de estudos sobre a produção de alimentos com esses compostos. Em 2006, mais de 600 produtos alimentícios foram lançados pela indústria de laticínios utilizando o termo probióticos no nome.

Os produtos lácteos destacam-se como principal veículo de culturas probióticas, tornando-se os pioneiros na categoria de alimentos probióticos (SANCHEZ et al., 2009). Saxelin (2008), estimou em 2008 que o mercado de iogurtes probióticos na Europa estava avaliado em 1 bilhão de euros, sendo que iogurtes e outros leites fermentados estão entre os principais veículos de culturas probióticas.

A legislação brasileira recomenda a ingestão diária de alimentos probióticos contendo no mínimo 10^8 a 10^9 UFC, o que corresponde ao consumo de 100g de

produto contendo $10^6 - 10^7$ UFC/g ou mL de células viáveis (BRASIL, 2008). Cruz et al (2008), ressalta ainda a importância da viabilidade dos micro-organismos probióticos que deve ser mantida desde a fabricação até o momento do consumo tornando-se necessário assegurar, ainda, que as células sobrevivam à passagem pelo trato gastrointestinal.

Em estudo realizado por Castro (2009), foram avaliadas diferentes formulações de bebidas lácteas fermentadas com cepas probióticas (*Bifidobacterium BB-12* e *Lactobacillus acidophilus*), oligofrutose e soro de queijo. Foi constatado que o efeito do teor de soro e do prebiótico não interferiu na população de micro-organismos probióticos. Sendo todas as bebidas avaliadas consideradas probióticas, pois apresentaram contagem de células viáveis superiores a 6 log UFC/mL.

Na incorporação de cepas probióticas em sorvetes, existem vários fatores que comprometem a viabilidade das culturas probióticas, onde destacam-se a incorporação de oxigênio, e o processo de mistura e congelamento do produto (TURGUT ; CAKMAKCI, 2009). Segundo Andrieghetto e Gomes (2003), em estudo onde o sorvete adicionado de *Lactobacillus acidophilus*, pode ser considerado um sorvete probiótico, por ser observado uma contagem de células de $8,3 \times 10^7$ UFC/g após 60 dias de armazenamento a 25°C, não havendo alteração nas características sensoriais e microbiológicas.

Corrêa (2008), utilizou *Bifidobacterium lactis* BL-04 ou *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 82, na produção de manjar de coco probiótico. O resultado foi satisfatório, obtendo populações de 6 a 7 log UFC/g no produto final, e durante 28 dias de armazenamento mantiveram-se acima de 7,1 log UFC/g.

De acordo Heller et al (2003), os queijos apresentam vantagens em relação aos demais produtos probióticos. A maioria possui pH mais elevado que iogurtes e leites fermentados, o que torna o meio mais estável para a sobrevivência de culturas probióticas por um período mais longo. Além disso, os queijos, por apresentarem uma quantidade de gordura relativamente alta, oferecem uma proteção para a bactéria probiótica durante a passagem pelo Trato Gastrointestinal- TGI . Sendo considerado o produto mais adequado como veículo de micro-organismos probióticos quando comparados aos leites fermentados e iogurtes (BERGAMINI et al., 2005).

Sharp (2008), estudou *Lactobacillus casei* 334, como modelo para analisar a viabilidade de micro-organismos probióticos em iogurte e em queijo cheddar light. Os resultados mostraram que a referida cepa apresentou estabilidade e viabilidade em

ambos os produtos, após 3 meses e 3 semanas, refrigerados a 5°C, (10^7 UFC/g). No entanto, quando o iogurte probiótico e o queijo cheddar probiótico foram expostos às condições gástricas (pH 2,00), foi constatado que no queijo cheddar a cepa apresentou desempenho superior (10^4 UFC/g) após 120 minutos de exposição as condições gástricas, em relação ao iogurte onde a população foi reduzida a 10UFC/g após 30 minutos de exposição a condições gástricas.

Buriti et al (2007), avaliaram queijos frescos suplementados com *L. paracasei* subsp. *Paracasei* LBC 82 associados *Streptococcus thermophilus*, como resultado foi observado populações superiores a 10^7 UFC/g durante 21 dias de armazenamento refrigerado.

2.2 QUEIJOS

Queijo é a denominação genérica de um grupo de produtos alimentícios fermentados, a base de leite, produzido mundialmente, com grande diversidade de sabores, texturas e formas (FOX et al., 2000). A essência do processo de fabricação do queijo consiste na conversão de um líquido (leite) em um alimento sólido (massa) por meio da ação das enzimas do coalho, sendo esta massa de coalhada a base do queijo, que posteriormente, dependendo do tipo, passa por processos como prensagem, salga e cura (LOMHOLT; OVIST, 1999).

No entanto a definição legal para queijo segundo a Portaria nº 146 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL 1996), é:

“Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácido orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes.”

Furtado (1990), classificou os queijos em cinco tipos, compreendendo a) os queijos de massa fresca, onde há necessidade de serem consumidos rapidamente, como por exemplo os queijos franceses (Petit Suisses), ou o queijo minas frescal; b) queijos de massa mole, onde há forte fermentação inicial, a cura é prolongada e há por muitas vezes presença de mofo, como por exemplo Brie, Camembert e Maroilles; c) queijos de massa firme, onde o teor de umidade é reduzido e possui mais sais minerais, apresentam duas subdivisões: d) massa firme e crua, como o Gouda e o Cheddar e de massa firme e cozida como o parmesão; queijos onde a massa apresenta veios azulados ou esverdeados como no Roquefort e no Gorgonzola; e e) por fim os queijos fundidos, como no requeijão.

2.2.1 Queijos fundidos

Em 1911 foram observadas as primeiras tentativas de fabricação de queijo fundido, devido a necessidade da exportação de queijos para países onde eram mantidos a temperaturas não adequadas devido ao clima quente, havendo então a separação da proteína e gordura. Como uma tentativa a solucionar este problema os produtores de queijo W. Gerber e F. Sttler na Suíça utilizaram citrato de sódio como agente peptizante e altas temperaturas para solubilizar o caseinato de cálcio da matéria prima na fabricação de queijos tipo Emmental e Gruyère, sendo observado a formação de um gel firme e homogêneo após o resfriamento, dando origem ao queijo fundido (GARRUTI et al., 2003; BERGER et al., 1989).

Na fabricação de queijo fundido o citrato de sódio foi o primeiro sal emulsificante utilizado na fabricação, no entanto atualmente outros são aplicados com a mesma finalidade como ácido monofosfórico e polifósforico, como por exemplo sais a base de citrato de sódio, fosfato monossódico, difosfato tetrassódico, trifosfato pentassódico e hexametafosfato de sódio. (VAN DENDER, 2006).

Segundo o Regulamento Técnico que trata da Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Processado ou Fundido (Portaria MAPA nº 356), o queijo processado é “um produto obtido por trituração, mistura, fusão ou emulsão por meio de calor e agentes emulsificantes de uma ou mais variedades de queijos, com ou sem adição de outros produtos lácticos e/ou sólidos de origem láctea e / ou especiarias, condimentos ou outras substâncias alimentícias nas quais o queijo constitui o

ingrediente lácteo utilizado como matéria- prima preponderante na base láctea” (BRASIL, 1997).

Os queijos fundidos ou processados são obtidos de maneira tradicional por meio da mistura de queijo, sal fundente e água, submetidos a calor e agitação (LEE et al., 2001). Em síntese a fabricação desses queijos, consiste basicamente em fundir seus dois elementos principais: a gordura e a proteína (VAN DENDER, 2014).

Embora o queijo perca sua identidade ao se transformar em queijo fundido, o mesmo adquire características positivas, como maior conservação (MORENGHI, 2002), tendo como exemplo de queijo fundido o requeijão cremoso (VAN DENDER, 2014).

2.2.2 Requeijão

O requeijão surgiu como uma opção de aproveitamento do leite coagulado por bactérias lácticas provenientes da microbiota natural do leite. É um produto tipicamente brasileiro, e consumido em praticamente todas as regiões brasileiras, tendo como matéria prima o leite desnatado. A utilização do leite desnatado é justificada devido à separação da gordura da massa durante o processo de coagulação, onde a mesma é descartada junto com o soro (OLIVEIRA, 1986; VAN DENDER, 2001; SANTOS 2002).

Do grupo de queijos denominados fundidos, processados ou pasteurizados, elaborados a partir da massa fresca, o requeijão cremoso é o produto de maior representatividade no Brasil (OLIVEIRA, 1986; VAN DENDER, 2000), sendo o leite de vaca a matéria-prima mais utilizada na fabricação de requeijão. Em sua constituição o leite tem como componente principal a água, e dentre os sólidos estão presentes gordura, proteínas, lactose e sais minerais. A gordura exerce uma função importante na cor, na consistência e no sabor do requeijão (RIBEIRO, 2000).

De acordo com o Regulamento Técnico que trata da Fixação e Identidade e Qualidade de Requeijão abordado na Portaria nº 359 – MAPA (BRASIL, 1997a), requeijão é o produto proveniente da fusão da massa coalhada, que pode ser cozida ou não, dessorada e lavada, sendo obtida por meio da coagulação ácida e/ou enzimática do leite, podendo ser adicionado de creme de leite e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite ou *butter oil*. Deve conter no mínimo 55,0% de matéria gorda no extrato seco e 65% de umidade no máximo, apresentando as seguintes características sensoriais: consistência untável; textura cremosa, fina, lisa ou

compacta; com formato variável; cor e odor característicos; sabor levemente ácido, opcionalmente salgado.

De acordo com a Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, que aprova o “Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos”, a tolerância para amostra indicativa para coliformes e *staphylococcus* no requeijão é de 10 para Coliformes a 45°C/g e 10³ para *Estafilococcus* coagulase positiva/g (BRASIL, 2001).

Segundo Van Dender (2000) a vida de prateleira do requeijão cremoso acondicionado em embalagens plásticas, de polipropileno ou polietileno de alta densidade, seladas com alumínio e fechadas com uma tampa plástica é de aproximadamente 60 dias.

2.2.2.1 Processamento do Requeijão Cremoso

Geralmente, as etapas principais na fabricação do requeijão englobam: coagulação do leite; dessoragem, lavagem da massa, adição de cloreto de sódio e sais fundentes; adição de creme de leite ou manteiga; fusão da massa; envase; resfriamento do produto embalado, seguido de estocagem em temperatura de refrigeração (RODRIGUES, 2006). É recomendado o resfriamento rápido para queijos cremosos, de modo a evitar o crescimento de esporos e a reação de Maillard (MORENGHI, 2002).

Para que se obtenha um requeijão cremoso microbiologicamente estável, é primordial o controle da matéria prima, de forma a manter reduzido o número de esporos. Boas práticas de fabricação também devem ser seguidas de forma a se obter um produto de qualidade e seguro para o consumo (MORENO et al., 2006). O leite também deve estar isento de antibióticos, e apresentar sabor, cor, e odor típicos (VAN DENDER, 2001).

Na fabricação do requeijão cremoso, utiliza-se como matéria-prima o leite e/ou leite reconstituído (BRASIL, 1997), de forma a se obter a massa. De acordo com Martins (1981) e Moreno et al. (2002) pode-se optar pela coagulação enzimática do leite ou pela adição de fermentos lácteos ou por acidificação direta por meio da adição de ácido láctico 85% (0,55%) ou ácido acético ao leite aquecido a 45°C, sob agitação lenta e continua até o momento da precipitação da massa. Na coagulação ácida, a massa é obtida por acidificação direta e do leite quente, onde o pH é maior que 4,6 (ponto isoelétrico da caseína), devido ao calor e o ácido, há desidratação parcial das

proteínas do leite (ORDÓÑEZ et al., 2006). No entanto para que haja bom desempenho emulsificante do sal fundente, é recomendado que o pH esteja entre 5.40 a 6.20 (DRUNKLER, 2009).

Para fusão da massa é necessário o aquecimento mínimo de 80°C durante 15 segundos ou outro binômio tempo / temperatura equivalente (VAN DENDER 2014). Os sais fundentes têm por função permitir a formação de uma emulsão a partir da mistura gordura, proteína e água, resultando em um produto homogêneo e estável (VAN DENDER, 2000).

O cloreto de sódio é utilizado na fabricação do requeijão de forma a melhorar algumas características sensoriais como sabor, textura e aparência do produto, além de controlar o nível de acidez, inibindo o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis, bem como auxiliar na expulsão do soro (RIBEIRO, 2000).

A adição do creme de leite realça o sabor do requeijão, tornando-o mais cremoso, atraente para consumo e melhorando suas características sensoriais (VALLE, 1981).

Segundo Van Dender (2000), o requeijão cremoso deve apresentar em sua composição 57-60% de umidade, 28-30% de gordura, 0,8-1,0% de sal, e pH entre 5,7-5,9. Do ponto de vista econômico a umidade do produto final é diretamente proporcional ao seu rendimento, ou seja, quanto maior a umidade maior o rendimento, no entanto a umidade também altera a consistência do requeijão cremoso.

2.2.2.2 Requeijão cremoso Probiótico

Heller (2003) sugere que a incorporação de bactérias probióticas na matriz lipoproteica do queijo confere uma capacidade tamponante durante a passagem desse alimento pelo Trato Gastrointestinal, o que auxilia na sobrevivência das células probióticas, aliada a baixa acidez do produto. Aparentemente a matriz dos queijos é eficaz na proteção da bactéria probiótica contra ação do oxigênio, baixo pH e sais biliares.

Segundo Buriti (2005) o pH do queijo, sua alta atividade de água, a sua matriz sólida, e uma concentração alta de lipídeos presentes são características que podem auxiliar na manutenção da viabilidade dos micro-organismos probióticos, bem como oferecer proteção as bactérias probióticas durante sua passagem pelo Trato Gastrointestinal. A baixa concentração de sal e ausência de conservantes,

observadas em alguns queijos, oferecem excelentes condições para a sobrevivência e multiplicação de cepas probióticas.

Drunkler (2009) pesquisou a produção de requeijão cremoso simbiótico, onde avaliou-se a melhor forma de inoculação da cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 demonstrando ser adequado no final do processo de fusão da massa, o que permitiu a obtenção de células viáveis em concentração satisfatória após 60 dias de armazenamento a 5°C. Foi constatado que o aumento da concentração do inóculo resulta inicialmente em um maior número de micro-organismos probióticos. Quanto às temperaturas analisadas (50, 60, 70 °C), foi deferido que a medida que a temperatura aumentava havia redução do número de micro-organismos probióticos no requeijão cremoso, no entanto na temperatura de 50°C a vida útil do requeijão era menor, devido contaminação. A partir dos resultados os autores concluíram que foi possível elaborar requeijão cremoso simbiótico, atendendo aos parâmetros de identidade e qualidade preconizados pela legislação vigente, bem como qualidade sensorial e número de células após 60 dias de armazenamento a 5°C referente a $6\log_{10}$ UFC/g.

Teixeira (2012), desenvolveu um requeijão cremoso caseiro probiótico inoculado com *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum*, onde elaborou 3 formulações: requeijão fresco padrão (25% de lipídeos), requeijão fresco com probióticos (25% de lipídeos) e requeijão cremoso fresco probiótico com teor reduzido de gordura (14% de lipídeos), e os avaliou no período de 15 dias nos quesitos, pH, acidez titulável, viabilidade celular e sensorial. A autora observou que durante o período de armazenagem (15 dias a 10°C) ocorreu aumento da acidez titulável e redução de pH das amostras adicionadas de probióticos, onde foi constatado que a formulação probiótica após 7 dias de armazenamento a 10°C obteve a contagem de *L. acidophilus* de $2,0 \times 10^9$ e *B. bifidum* $1,0 \times 10^9$, e após 15 dias de armazenamento a contagem de *L. acidophilus* de $4,0 \times 10^7$ UFC/g e *B. bifidum* de $2,0 \times 10^8$ UFC/G. O requeijão cremoso fresco com baixo teor de gordura apresentou contagem de *L. acidophilus* de $5,0 \times 10^9$ UFC/g e *B. bifidum* de $2,0 \times 10^9$ UFC/g, mantendo-se constante até o período final de 15 dias de armazenamento. O estudo concluiu que o requeijão cremoso fresco foi apropriado para a incorporação de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* e melhorou a qualidade sensorial do requeijão cremoso fresco probiótico.

Gaino et al. (2012), desenvolveram requeijão cremoso adicionado de *Lactobacillus casei*, e observaram que, após 28 dias de armazenamento a 4°C, o

número de *Lactobacillus casei* manteve-se constante em $2,2 \times 10^7$ UFC/g. A aceitação do produto foi equivalente a 82%, concluindo que o requeijão foi uma boa alternativa como produto lácteo probiótico.

Segundo Teixeira (2012) a literatura é escassa quanto ao requeijão cremoso com função probiótica, sendo um produto ainda não comercializado. Mas em virtude de suas características químicas e do seu alto consumo no Brasil, demonstra ser uma boa estratégia melhorar a sua qualidade com a adição de probióticos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Probióticos da Escola de Engenharia de Lorena EEL/USP e no laboratório de laticínio da Escola Luiz de Queiroz ESALQ/ USP – Piracicaba - SP onde realizou-se as análises de lipídeos e umidade, sendo as análises microbiológicas realizadas no Laboratório SILO Microbiologia – Rio de Janeiro – RJ.

3.1 Micro-organismos e preparo do inóculo

Para o desenvolvimento do requeijão probiótico proposto no presente trabalho foram avaliadas 6 cepas de *Lactobacillus*, a saber: *L. plantarum* ATCC 8014, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. delbrueckii* UFV H2B20, *L. fermentum* ATCC 9338, *L. casei* ATCC 7469 e *L. paracasei* SP11.

As referidas cepas, mantidas a -20° C em 20% (v/v) de glicerol, foram ativadas a 37°C por 24h a partir de culturas estoque do Laboratório de Probióticos- EEL/USP em frasco Erlenmeyer de 200mL contendo 198 mL de meio Man Rogosa & Sharpe – MRS, constituído de 10 g/L de peptona, 10g/L de extrato de carne, 5g/L de extrato de levedura, 20g/L de glicose, 5g/L de acetato de sódio, 1g/L de tween, 2 g/L de fosfato de potássio, 2g/L de citrato de amônio, 0,1 g/L de sulfato de magnésio e 0,05 g/L de sulfato de manganês (DE MAN, 1960), sendo o pH ajustado para 6.50 e esterilizado a 121°C por 15 minutos. Em seguida o conteúdo de cada frasco foi transferido para frascos Erlenmeyer contendo 2000 mL de caldo MRS a pH 6,50 devidamente esterilizado e incubados em estufa a 37°C por 18 horas. Posteriormente as respectivas suspensões de células foram centrifugadas 3 vezes a 1.246xG por 20 minutos, sendo duas vezes o sobrenadante descartado, e as células ressuspensas em solução salina 0,09% para efeito de retirar os componentes do meio MRS do inóculo. Após isso, centrifugou-se novamente e as células foram ressuspensas em 50 mL de leite em pó desnatado reconstituído à 10% e transferidas para frasco Erlenmeyer de 100mL esterilizado seguido de incubação a 37°C por 2 horas.

3.1.1 Desenvolvimento da formulação de requeijão cremoso base

Para o desenvolvimento da formulação base (Figura 2) experimentos foram realizados de acordo com a metodologia proposta por Drunkler (2009). Para tanto, 10

formulações foram desenvolvidas cujos ingredientes encontram-se discriminados na Tabela 2, visando selecionar uma formulação de requeijão cremoso em conformidade com os padrões de identidade e qualidade preconizadas pela legislação vigente (BRASIL, 1997_a) e que pudesse ser utilizada na elaboração do requeijão cremoso probiótico contendo aproximadamente 10^{11-12} UFC/g.

Tabela 2 - Composição das formulações de requeijão cremoso avaliadas.

Componentes	Formulações									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leite (L)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Ácido láctico (%v/v)	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	2,8	2,8	2,8
Sal fundente (% m/m) *	0,6	1,0	2,0	2,5	3,0	4,0	4,5	1,0	1,0	1,0
Creme de leite(%m/m) * (% gordura) **	50 17	50 17	50 17	50 17	50 17	50 17	50 17	50 17	50 25	50 35
Cloreto de sódio (% m/m) *	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
Água destilada (%m/m) *	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

*Em relação ao peso da massa **% de gordura do creme de leite.

Fonte: Autoria própria

O requeijão cremoso foi confeccionado de acordo com fluxograma mostrado na Figura 2. Para tanto, o leite pasteurizado tipo C 3% de gordura (Serramar), foi transferido para uma cuba de aço inox, com capacidade de 10 L e aquecido a 82°C. Em um béquer de vidro o ácido láctico 85%, grau alimentício, (PURAC) foi diluído com água destilada na proporção de 1:10 e adicionado ao leite sob agitação lenta até completa mistura do ácido. Após a coagulação, resfriou-se à temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e realizou-se a dessoragem e prensagem manual da massa com o auxílio de uma peneira de nylon devidamente higienizada. Em seguida a massa foi pesada em balança semi- analítica digital (DIGIMED KN800DR) para

efeito de cálculo dos demais ingredientes a serem adicionados. Em seguida, adicionou-se o creme de leite (17% de gordura ou 25% de gordura - Nestlé ou 35% de gordura - Comevap), seguido de homogeneização manual e aquecimento até 85°C. Na sequência adicionou-se o cloreto de sódio (Cisne) e o sal fundente (Citrato de sódio e polifosfatos - Rica Nata) previamente diluído em água a 80°C conforme orientação do fabricante, seguido de homogeneização manual por aproximadamente 5 minutos. Posteriormente o requeijão foi embalado a quente manualmente, em potes plásticos de polipropileno devidamente autoclavados a 121°C por 15 minutos, selados com papel filme de PVC (Wyda Pratic), fechados com tampa plástica e armazenados à temperatura de $5 \pm 1^\circ\text{C}$.

Figura 2 - Fluxograma da produção de requeijão cremoso.

Fonte: Adaptado Drunkler (2009).

As referidas formulações foram avaliadas quanto ao perfil de textura e consistência. As formulações que apresentaram sinais de instabilidade como separação de fases, formação de grumos e ausência ou excesso de viscosidade, cor, sabor e odor indesejados foram descartadas. Desta forma, selecionou-se a formulação 10 para dar continuidade aos experimentos.

3.1.2 Preparo do requeijão cremoso probiótico

Com base na formulação 10 preparou-se 11900 g de requeijão cremoso. Em capela de fluxo laminar a massa fundida (85 °C) foi fracionada em 7 partes em frascos de polipropileno devidamente higienizados contendo 1700 g cada. Em seguida promoveu-se o resfriamento à temperatura de 50°C e inoculou-se, em 6 frascos, individualmente, com 100 mL dos respectivos inóculos (item 4.1) para conferir uma concentração de células inicial de 10^{11} a 10^{12} UFC/g sendo 1 considerado como controle (sem inoculação). Após homogeneização manual os frascos foram armazenados a 5°C. Reservou-se em frascos individuais 1000g para análise sensorial e 700g para caracterização físico – química, teste de viabilidade celular e análise microbiológica.

Amostras foram coletadas nos dias 7, 30, 45 e 65 dias para avaliação da viabilidade celular, bem como pH e a acidez titulável.

3.2 Métodos analíticos

3.2.1 Determinação da viabilidade celular

Para determinação da população de células viáveis nas amostras de requeijão probiótico foi utilizada a técnica de plaqueamento *pour plate*, por meio da qual em condições assépticas, 1g das respectivas amostras, foi devidamente diluída em 9 mL de solução salina a 0,9% (m/v), seguida de diluições decimais sucessivas de 10^{-1} a 10^{-12} . Em placas de Petri foram adicionados 15mL de Ágar MRS (constituído de caldo MRS acrescido de 15 g/L de ágar) pH 6,5 e 1,0 mL das respectivas diluições seguido de homogeneização por meio de movimentos circulares em forma de oito e deixadas em repouso para solidificação do ágar. Posteriormente as placas foram invertidas e

incubadas a 37°C por 72 horas, após o que procedeu-se a contagem das colônias (Figura 3). O resultado foi expresso em unidade formadora de colônia por g (UFC/g), considerando-se válidas as placas contendo entre 25 e 250 colônias.

Figura 3 - A) Placa contendo número de células incontáveis. B) Número de células entre 25 e 250 UFC/mL.

Fonte: Autoria própria

3.2.2 Determinação do pH e Acidez titulável

O pH foi determinado pelo método eletroanalítico (pHmetro digital PG1800 GEHAKA ®) onde 2g de amostra em temperatura ambiente ($23,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) foram previamente diluídos pela adição de 20 mL de água em um béquer de 50 mL, como exposto na figura 4 (BRASIL, 2006).

Figura 4 - Determinação de pH em requeijão cremoso.

Fonte: Autoria própria.

3.2.3 Determinação de Acidez titulável

A acidez titulável, expressa em porcentagem de ácido láctico, foi determinada de acordo com as normas do instituto Adolfo Lutz (ZENEBON et al., 2008) que consistiu da titulação, em duplicata, de 10g de amostra previamente transferidas para um balão volumétrico de 100mL e adicionada de álcool neutro 95%, até completar o volume, seguido de agitação e repouso por 6 horas. Em seguida procedeu-se a filtração em papel filtro quantitativo e uma alíquota de 10 mL foi transferida para um Erlenmeyer de 150 mL acrescentado de 5 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína a 1% e titulado com solução de NaOH 0,1M até leve coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos (Figura 5). A concentração de ácido láctico foi determinada por meio da formula:

$$\% \text{ em ácido láctico} = V \times f \times 0,9 / m$$

onde:

V = volume (mL) da solução de hidróxido de sódio 0,1M gasto na titulação;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1M;

0,9= fator de correção do ácido láctico.

m = massa (g) da amostra

Figura 5 - Acidez titulável em termo de ácido láctico em requeijão cremoso. A) amostra de requeijão cremoso com álcool 95% neutro, B) filtração em papel filtro quantitativo, C) Titulação da amostra.

Fonte: Autoria própria.

3.2.4 Determinação do teor de lipídeos

O teor de lipídeos foi determinado utilizando a metodologia proposta por (ZENEON et al., 2008) que consistiu da técnica de determinação de gordura utilizando o butirômetro para leite (Figura 6), onde 1g de amostra foi transferida para um béquer de 25mL e adicionada com 5mL de ácido sulfúrico (D=1,5), seguido de aquecimento em chapa de aquecimento (IKA RH basic 1) até completa dissolução da amostra. Posteriormente a amostra foi transferida para um butirômetro de leite, completado o volume para 20 mL com ácido sulfúrico (D=1,5), e com o auxílio de uma pipeta automática acrescentou-se 1mL de álcool isoamílico seguido de agitação até completa homogeneização e levado ao banho maria (63°C) por 15 minutos. Na sequência o butirômetro foi colocado em centrífuga de Gerber a 1.200 rpm durante 15 minutos. Posteriormente procedeu-se a leitura e determinou-se a porcentagem de lipídeos por meio da fórmula:

$$\text{Lipídeos (\% m/m)} = V \times 11,33/p$$

Onde:

V= valor lido na escala do butirômetro

11,33= equivalente em peso de 11 mL de leite

p= nº de gramas da amostra

Figura 6 - Butirômetro de Gerber para leite.

Fonte: Autoria própria

3.2.5 Determinação de extrato seco total

O extrato seco total do requeijão cremoso foi determinado por meio de secagem da amostra em forno micro-ondas conforme metodologia descrita por Van Dender (2000), onde um béquer de 600 mL contendo 150 mL de água e 5 placas de Petri, contendo dois discos de papel filtro Whatman nº4, foram inseridos no micro-ondas (Brastemp mod. BMP 40E SAAB) por 10 minutos em potência 10. Em seguida as placas foram resfriadas em um dessecador à vácuo e posteriormente pesadas em balança analítica (GEHAKA AG200). Na sequência colocou-se um disco de papel filtro na placa de petri 3g de amostra de requeijão e outro disco de papel filtro de modo a formar um “sanduiche” (Figura 7). As placas foram colocadas novamente no forno micro-ondas por 15 min na potência 7, e após esse tempo foram retiradas do forno, resfriadas em dessecador e o peso final anotado.

A porcentagem de extrato seco é calculada através da formula:

$$\% \text{ EST} = (\text{Peso final da placa} - \text{Peso inicial da placa}) \times 100 / \text{Peso da amostra}$$

Figura 7 – A) Etapa de secagem das placas vazias B) Pesagem da amostra. C) Amostra em forma de “Sanduiche”.

Fonte: Autoria própria

3.2.6 Determinação do teor de Gordura no Extrato seco (GES)

O teor de gordura no extrato seco do requeijão cremoso foi determinado utilizando-se a seguinte fórmula (BRASIL 2006):

$$\text{GES} = (\% \text{ de gordura} / \% \text{ EST.}) \times 100$$

3.2.7 Análises microbiológicas

Para fins de controle microbiológico do requeijão, foram realizadas contagens de coliformes totais e termotolerantes, contagem de *Staphylococcus spp* e *Salmonella*. A metodologia para obtenção, preparo das amostras para as análises microbiológicas foi executada segundo descrito por Silva *et al.* (2001).

3.2.7.1 Obtenção e preparo das amostras de requeijão cremoso para análise microbiológica

Para este estudo as amostras de requeijão cremoso foram acondicionadas congeladas a -18°C em um isopor contendo IceFoam®, e enviadas via transportadora, tendo chegado nas dependências do laboratório Silo Microbiologia – RJ, em menos de 24 horas e ainda congeladas.

3.2.7.2 Contagem de coliformes totais e termotolerantes

A estimativa da concentração de coliformes a 35 °C e a 45 °C foi realizada de acordo com o método recomendado por Kornacki e Johnson (2001), que utiliza como base o caldo Lauril Sulfato (Himedia-M1046) com MUG (4-Metilumbeliferil-β-DGlicuronídeo) e caldo EC com MUG (Himedia-M1042). O cálculo do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35 °C e a 45 °C por grama de requeijão cremoso foi realizado utilizando-se tabela de conversão para 3 tubos (intervalo de confiança de 95%) de acordo com o descrito por Swanson *et al.* (2001).

3.2.7.3 Contagem de *Staphylococcus spp*

A quantificação de *Staphylococcus aureus* coagulase positivos foi realizada por meio de contagem direta em placa contendo meio Baird-Parker (Difco-276840) suplementado com emulsão Telurito Gema de Ovo (Laborclin-520089) de acordo com o método descrito por Bennet e Lancette (2001). Colônias apresentando morfologia típica (coloração negra, com margens ligeiramente descoloradas, cercadas por um

halo opaco, frequentemente com uma região externa translúcida, de consistência amanteigada ou gomosa ao toque da alça de inoculação) foram transferidas para caldo BHI (Difco-241830) e submetidas à prova da coagulase, descrita na mesma metodologia.

3.2.7.4 Contagem de *Salmonella*

Os testes para detecção de *Salmonella* sp. nas amostras de requeijão cremoso foram feitos em conformidade com o método recomendado pelo FDA para detecção de *Salmonella* sp, descrito por Wallace et al. (2016).

3.2.8 Determinação das concentrações de ácidos orgânicos e carboidratos

As concentrações dos ácidos orgânicos e carboidrato como butírico, fórmico, propionico, acético, láctico, glicose, galactose e lactose foram determinados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), segundo a metodologia proposta por Zeppa et al (2001). Para tanto empregou-se uma coluna “Bio-Rad Aminex” HPX-87H a 65°C; sensor UV a 210 nm para quantificação de ácidos orgânicos e índice de refração para quantificação dos carboidratos; eluente ácido sulfúrico 0,013N, fluxo de 0,8mL/min; volume da amostra injetada, 20µL.

As amostras foram preparadas pesando-se, em um tubo falcon de 50 mL, 5 gramas das respectivas amostras sendo então adicionados 25 mL de solução de H₂SO₄ a 0,013 N, seguido de aquecimento, em banho maria, a 60°C por 60 minutos. Na sequência as mesmas foram homogeneizadas em homogeneizador tipo vórtice por 60 segundos ou até homogeneização completa, sendo posteriormente centrifugadas a 3.372 x g por 15 minutos e filtradas em membrana Millex – GV (22µm).

3.2.9 Avaliação sensorial

As diferentes formulações de requeijão cremoso, devidamente armazenadas a 5°C por um período de 65 dias, contendo as respectivas cepas probióticas foram submetidas a análise sensorial no Laboratório de Análise Sensorial da Planta de Bebidas da EEL-USP. Esta análise contou com a participação de aproximadamente 60 provadores de ambos os sexos, não treinados, que receberam 5 g das respectivas

amostras, devidamente codificadas, à temperatura de $15 \pm 2^\circ\text{C}$ acompanhadas de água mineral e biscoito água e sal para limpeza do palato. Os provadores foram devidamente instruídos quanto ao procedimento adotado e orientados para utilizarem espátulas de plástico descartáveis para o manuseio das amostras.

A referida avaliação foi realizada utilizando-se uma escala hedônica de 9 pontos (Figura 8), de acordo com o Instituto Adolfo Lutz (ZENEBO et al.,2008) e consistiu da avaliação dos seguintes atributos: impressão global, aroma, cor, sabor e textura, além da intensão de compra.

Figura 8 - Modelo de ficha a ser utilizada na avaliação sensorial.

Análise sensorial de requeijão cremoso probiótico

Nome: _____ Data: _____

Por favor, avalie a amostra codificada da esquerda para a direita e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou da mesma.

	Código da amostra	_____	_____	_____	_____
9-gostei extremamente	Impressão global:	_____	_____	_____	_____
8-gostei muito	Manuseio:	_____	_____	_____	_____
7-gostei moderadamente	Aroma:	_____	_____	_____	_____
6-gostei ligeiramente	Sabor:	_____	_____	_____	_____
5-nem gostei, nem desgostei	Aparência:	_____	_____	_____	_____
4-desgostei ligeiramente					
3-desgostei moderadamente					
2-desgostei muito					
1-desgostei extremamente					

Assinale qual seria sua atitude quanto à compra do produto:

5- eu certamente compraria este produto	Código da amostra:	_____ ()
4-eu provavelmente compraria este produto		_____ ()
3-eu tenho dúvidas se compraria este produto		_____ ()
2- eu provavelmente não compraria este produto		_____ ()
1-eu certamente não compraria este produto		

Comentários:

Aluna: Viviane Lívia Carvalho de Souza

Orientador: Prof Drº Ismael Maciel de Mancilha

Fonte: Adaptado (ZENEBO et al., 2008)

3.2.8.1 Análise dos resultados

Os resultados foram avaliados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com intervalo de confiança de 95% empregando-se o software BioEstat 5.0.

3.3 Comitê de ética

O presente projeto foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP), da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA / USP, tendo recebido o certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) de número: 59947316.9.0000.5422.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento da formulação de requeijão cremoso base

O desenvolvimento da formulação base abrangeu a elaboração de 10 formulações (Tabela 2), visando a obtenção de um requeijão cremoso estável de acordo com o Regulamento Técnico que trata da Fixação e Identidade e Qualidade de Requeijão (BRASIL,1997). As formulações foram avaliadas subjetivamente quanto à formação de grumos, separação de fases, textura e sabor. Observou-se que as formulações 1, 2, 3, 4, 5 e 6 apresentaram instabilidade, bem como formação de grumos e separação de fases conforme ilustrado na Figura 9.

Figura 9 - A) Formulação de requeijão cremoso estável B) Formulação de requeijão cremoso apresentando formação de grumos e separação de fases.

Fonte: Autoria própria

Segundo Van Dender (2014), na fabricação de requeijão cremoso, o desempenho do sal fundente é dependente do pH da massa, que deve estar entre 5.40 e 6.20. Desta forma, avaliou-se diferentes concentrações de ácido láctico, o que resultou na utilização de 2,8mL (%v/v) de ácido láctico 85%, para coagulação do leite.

Em avaliação preliminar, considerando o quesito sabor, eliminou-se as formulações 3, 4, 5, 6 e 7 por apresentaram sabor amargo causado provavelmente, pela alta concentração do sal fundente que é rico em fósforo (DRUNKLER, 2009).

De acordo com Romeih et al. (2002), o teor de gordura interfere nos quesitos sabor, textura e aparência dos alimentos. Desta forma, avaliou-se diferentes % de gordura nas formulações 7, 8, 9 e 10, que apresentaram resultados satisfatórios no que se refere a textura e sabor. Assim, considerando os padrões de identidade de requeijão cremoso estabelecido no Regulamento Técnico de Fixação e Identidade do requeijão (BRASIL, 1997^a), que preconiza que o produto deve conter no mínimo 55% de matéria gorda no extrato seco, selecionou-se a formulação 10 (Tabela 2) para dar continuidade aos trabalhos.

4.2 Avaliação da viabilidade celular nas diferentes formulações de requeijão cremoso probiótico

A variação da população de células das respectivas cepas de *Lactobacillus* inoculadas nas diferentes formulações de requeijão cremoso probiótico, após 65 dias de estocagem a 5°C, encontra-se apresentada na Tabela 3 e Figura 10. Observa-se que houve um decréscimo equivalente a 3 ciclos logarítmicos da população de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20 e *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338, e de um ciclo logarítmico de *Lactobacillus casei* ATCC 7469, *Lactobacillus paracasei* SP11 e *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356. Neste contexto, é válido ressaltar que apenas em 1 grama das formulações de requeijão cremoso inoculadas com as respectivas cepas de *Lactobacillus* contêm uma população de células viáveis superior a 10⁸UFC, que corresponde a quantidade diária recomendada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2008) para consumo de produtos probióticos.

Resultados inferiores foram relatados por Teixeira (2012) em requeijão cremoso contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum*. O autor verificou que estas cepas probióticas se mantiveram viáveis durante o período de armazenamento de 15 dias a 10°C, observando redução na população de *Lactobacillus* equivalente a dois ciclos logarítmicos, atingindo uma população de 4,0 x 10⁷ UFC/g após 15 dias. Gaino et al. (2012) reportaram que, em requeijão cremoso

probiótico inoculado com *Lactobacillus casei*, após 28 dias de armazenamento a 4°C, não se observou variações significativas, apresentando contagem inicial de 2.2×10^7 UFC/g mantendo-se constante até o tempo final.

Tabela 3 - Variação da população de células viáveis (log10 UFC/g) nas diferentes formulações de requeijão cremoso durante 65 dias de armazenagem a 5°C

Formulações	Tempo de estocagem (dias)			
	7	30	45	65
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	12,48	9,71	9,24	9,12
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469	10,45	9,06	8,48	8,94
<i>Lactobacillus paracasei</i> SP11	10,61	9,36	9,44	9,20
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	10,33	10,11	9,47	9,33
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2B20	12,59	9,73	9,21	9,20
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338	11,80	9,83	9,09	8,43

Valores médios de duas repetições

Fonte: Autoria própria

No tocante a variação da viabilidade celular das diferentes cepas de *Lactobacillus* nas formulações avaliadas ao longo de 65 dias de estocagem a 5°C, representada na Figura 9, verifica-se que houve decréscimo de viabilidade das cepas estudadas. Estes resultados corroboram com os obtidos por Ramírez et al. (2007) que desenvolveram um tipo de queijo denominado “queso crema” contendo *Lactobacillus casei* e reportaram contagem inicial de 10^{12} UFC/g e após 15 dias este valor foi reduzido para $1,1 \times 10^9$ UFC/g, devido às condições de estocagem, segundo os autores.

Figura 10 – Variação da viabilidade celular das cepas de *Lactobacillus* (log UFC/g) nas diferentes formulações de requeijão cremoso probiótico durante armazenamento por 65 dias a 5°C.

LP = *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; LC= *Lactobacillus casei* ATCC 7469; LI= *Lactobacillus paracasei* SP11i; LA= *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356; LD= *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20; LF= *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338.

Valores médios de duas repetições; $\pm$ desvio padrão.

Fonte: Autoria Própria

4.3 Variação do pH e da acidez titulável das formulações de requeijão cremoso probiótico.

Durante o período de armazenamento por 65 dias a 5°C, o valor pH de todas as formulações apresentaram valores próximos a 6.0 (Tabela 4) desde o primeiro dia avaliado, indicando que a maior parte do processo de acidificação foi transcorrido após a inserção do inóculo, conforme era o esperado

A variação do pH e da acidez titulável das formulações probióticas avaliadas ao longo de 65 dias de armazenagem a 5°C encontra-se mostrada nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. Verifica-se que os valores de pH variaram entre 6.20 e 6.70 nas formulações probióticas no período estudado. Estes valores são menores que os observados na formulação base (sem inóculo) pH 6.44 a 6.73, devido a atividade fermentativa das respectivas cepas de *Lactobacillus*.

Resultados similares foram encontrados por Drunkler (2009), que reportou diferenças significativas ($p < 0.05$) entre o pH (6.20 a 6.10) da formulação base (sem inóculo) e o pH (5.90 a 5.50) da formulação de requeijão cremoso simbiótico contendo *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* Bb-12, inulina e oligofrutose no tempo inicial. A autora justificou que a diferença observada se deve ao fato que na elaboração do requeijão cremoso simbiótico a inoculação foi realizada com células pré-ativadas em leite reconstituído a 10% a 37°C por 7 horas, o que estimulou a atividade metabólica das células. O autor reportou ainda que, após o período de 60 dias de armazenamento a 5°C, o pH da formulação de requeijão cremoso simbiótico (5,70) não foi alterado significativamente ($p > 0.05$), em relação ao tempo inicial (5,90).

Tabela 4 - Valores de pH e desvio padrão das formulações de requeijão cremoso avaliadas durante 65 dias de estocagem a 5°C.

Formulações							
Tempo (Dias)	Base	LP	LC	LI	LA	LD	LF
7	6.65±0.18	6.40±0.16	6.44±0.19	6.40±0.16	6.41±0.17	6.20±0.10	6.22±0.19
30	6.73±0.18	6.49±0.17	6.30±0.17	6.42±0.18	6.39±0.15	6.22±0.15	6.40±0.19
45	6,44±0.17	6.51±0.19	6.39±0.10	6.70±0.13	6.46±0.18	6.32±0.16	6.52±0.17
65	6.51±0.19	6.58±0.13	6.44±0.12	6.69±0.15	6.54±0.11	6.41±0.19	6.69±0.14

LP = *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; LC= *Lactobacillus casei* ATCC 7469; LI= *Lactobacillus paracasei* SP11i; LA= *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356; LD= *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20; LF= *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338.

Valores médios de duas repetições; ±desvio padrão.

Fonte: Autoria Própria

Gaino et al. (2012) avaliaram a variação do pH em requeijão cremoso probiótico contendo *Lactobacillus casei* após 28 dias de armazenamento a 10°C. Estes autores verificaram variações dos valores de pH de 5,70 para 5,60 na formulação controle e de 5,80 para 5,40 no requeijão probiótico. De forma semelhante

Teixeira (2008) também avaliou formulações de requeijão cremoso probiótico contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum*, e constatou redução no valor do pH de 5.50 para 5.10 após 15 dias de armazenamento a 10°C.

As diferenças observadas no tocante à variação dos valores de pH no presente trabalho e aquelas reportadas por Drunkler (2009), Gaino (2012) e Teixeira (2012), se devem provavelmente às diferenças nas matérias primas, bem como as diferentes metodologias de produção empregadas

Rapacci (1998) estudaram o efeito do tipo e concentração de sal fundente nas características físico-químicas do requeijão cremoso tradicional, cuja massa foi obtida por acidificação direta e a quente. Os autores reportaram valores de pH na faixa de 5,92 a 6,35.

No que se refere à variação da acidez titulável (Tabela 5) nas formulações avaliadas no período de 65 dias de armazenagem a 5°C, verifica-se que o teor de ácido láctico expresso em % foi maior nas formulações contendo as respectivas cepas de *Lactobacillus* (valores entre 0.43 a 0.30 após 7 dias de armazenamento a 5°C, e 0.28 a 0.24% após 65 dias) em relação à formulação base (valores entre 0.17 após 7 dias de armazenamento a 5°C e 0.12 % após 65 dias) a acidez titulável diminuiu durante o armazenamento das formulações, no entanto não em quantidade suficiente para alterar o pH.

As diferenças observadas na acidez titulável se deve à atividade das cepas de bactérias lácticas avaliadas que foram estimuladas a produzir ácido láctico (BURITI *et al.*, 2007; SHAH, 2007) por ocasião do preparo do inóculo a 37°C antes de serem incorporadas nas respectivas formulações de requeijão probiótico.

Resultados semelhantes foram reportados por Drunkler (2009) em formulações de requeijão simbiótico contendo inulina, oligofrutose e *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis Bb-12*, durante o tempo de armazenamento por 60 dias a 5°C. O autor observou que não houve diferença significativa no tocante à acidez titulável (0,30%) em relação ao tempo inicial (0,35%).

Resultados distintos aos do presente trabalho foram reportados por Teixeira (2012) em requeijão cremoso contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum*, no tempo inicial e após 15 dias de armazenamento a 10°C. O autor descreveu que a incorporação dos micro-organismos no requeijão cremoso, resultou em aumento da acidez titulável reportando valores de ácido láctico de 0,32g/100g no tempo inicial e após 15 dias 0,48 g/100g na formulação probiótica. Na formulação

controle, o autor reportou valor de 0,38g/100g de ácido láctico após 15 dias de armazenamento a 10°C.

Tabela 5 - Valores de acidez titulável e desvio padrão das diferentes formulações de requeijão probiótico armazenadas por 65 dias a 5°C.

Acidez titulável (% ácido láctico)							
Formulações							
Tempo (Dias)	Base	LP	LC	LI	LA	LD	LF
7	0.17±0.07	0.35±0.08	0.30±0.09	0.38±0.08	0.30±0.08	0.43±0.09	0.43±0.09
30	0.12±0.09	0.23±0.09	0.30±0.09	0.32±0.09	0.29±0.07	0.23±0.08	0.27±0.09
45	0.14±0.09	0.26±0.08	0.29±0.08	0.33±0.09	0.29±0.09	0.26±0.09	0.28±0.08
65	0.12±0.08	0.25±0.09	0.28±0.09	0.24±0.08	0.28±0.09	0.28±0.09	0.24±0.09

LP = *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; LC= *Lactobacillus casei* ATCC 7469; LI= *Lactobacillus paracasei* SP11i; LA= *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356; LD= *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20; LF= *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338.

Valores médios de duas repetições; ±desvio padrão.

Fonte: Autoria Própria

4.4 Caracterização físico química do requeijão cremoso probiótico

4.4.1 Umidade, Lipídeos, Extrato Seco total e Gordura no Extrato Seco

As respectivas formulações de requeijão cremoso probiótico, após 65 dias de armazenagem a 5°C, foram devidamente caracterizadas, em conformidade com os padrões de identidade estabelecidos na legislação vigente, cujos resultados encontram-se mostrados na Tabela 6. Verifica-se que o teor de gordura no extrato seco e umidade nas respectivas formulações estão em conformidade com o padrão mínimo estabelecido no Regulamento Técnico que é parte da Portaria nº 359 – MAPA (BRASIL, 1997), que determina que o teor de gordura no extrato seco (GES) deve ser superior a 55% e o teor máximo de Extrato Seco Total (EST) de 65%.

Assim, observa-se que houve diferença na composição das formulações de requeijão cremoso contendo as respectivas cepas de *Lactobacillus* em relação à formulação base nos parâmetros estudados. Isso se deve ao fato que a ausência de inóculo (100 mL) na formulação base provoca diferenças no teor de umidade, bem como alteração dos outros parâmetros avaliados, uma vez que o teor de umidade é utilizado para efeito de cálculo dos demais parâmetros.

Tabela 6 - Características físico – químicas das formulações de requeijão cremoso probiótico após 65 dias de armazenagem a 5°C.

Formulação	Umidade (%m/m)	EST (%m/m)	Lipídeos (%m/m)	GES (%m/m)
Base	60,00	40,00	26,89	67,22
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	62,58	37,42	24,52	65,52
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	62,00	38,00	24,25	63,81
<i>Lactobacillus paracasei</i> SP11	64,15	35,85	23,49	65,52
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469	64,95	35,05	23,24	66,30
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2B20	64,03	35,97	23,92	66,49
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338	63,45	36,55	24,06	65,82

EST = Extrato Seco Total; GES = Gordura no Extrato Seco

Determinações realizadas em duplicata

Fonte: Autoria Própria

Resultados semelhantes foram encontrados por Drunkler (2009) que em seu estudo avaliou valores de lipídeos, EST e GES em formulações de requeijão cremoso simbiótico contendo *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* Bb-12, oligofrutose e inulina, onde reportou valores entre 21,76% a 24,39% de lipídeos nas formulações simbióticas e 25,17% na formulação controle. Os valores de EST

variaram de 34,73% a 42,11% nas formulações simbióticas e 39,18% no controle, sendo que os teores de GES variaram de 55,51% para formulações simbióticas a 68,46% para a formulação controle.

A composição físico-química encontrada no presente trabalho foi similar aos resultados obtidos por Teixeira (2012) que formulou um requeijão cremoso probiótico contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* reportando valores de 60,03% de umidade e 24,67% de lipídeos.

4.4.2 Avaliação microbiológica das formulações de requeijão cremoso probiótico.

Visando avaliar a qualidade microbiológica das formulações de requeijão cremoso, após 65 dias armazenados a 5°C, foram realizadas análises, cujos resultados estão mostrados na Tabela 7 e Apêndice B.

Verifica-se que a caracterização microbiológica das diferentes formulações avaliadas, após 65 dias de armazenagem a 5°C, apresentam valores que demonstram que as referidas formulações estão plenamente em conformidade com os padrões microbiológicos constantes do Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Requeijão abordado na Portaria nº 359 – MAPA (BRASIL, 1997_a).

Tabela 7 – Resultados das análises microbiológicas das formulações de requeijão

	Micro-organismos			
	Coliformes Totais a 35°C (NMP/g)	Coliformes a 45 °C (NMP/g)	<i>Salmonella</i> sp	<i>Estafilococos coagulase</i> (UFC/g)
BASE	<3,0	<3,0	Ausência em 25g	<10UFC/g
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	<3,0	<3,0	Ausência em 25g	<10UFC/g

(Continua)

(Conclusão)

Tabela 7 – Resultados das análises microbiológicas das formulações de requeijão

<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469	<3,0	<3,0	Ausência em 25g	<10UFC/g
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2B20	<3,0	<3,0	Ausência em 25g	<10UFC/g
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	< 3,0	<3,0	Ausência em 25g	<10UFC/g
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338	< 3,0	<3,0	Ausência em 25g	<10UFC/g
<i>Lactobacillus paracasei</i> SP11	< 3,0	<3,0	Ausência em 25g	<10UFC/g

NMP/g: Número Mais Provável/ grama; UFC/g: Unidade Formadora de Colônia/grama

Fonte: Autoria Própria

Após o encerramento dos experimentos, tivemos a oportunidade de caracterizar os ácidos orgânicos e carboidratos das formulações de requeijão após 130 dias de sua data de fabricação, uma vez que os mesmos apresentavam aparentemente características desejáveis, os resultados encontram-se apresentados no Apêndice C.

4.4 Avaliação sensorial do requeijão probiótico

As características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais são fatores relevantes no lançamento de novos produtos alimentícios no mercado. De acordo com Minim (2013), a avaliação sensorial de um alimento revela a satisfação do consumidor, que por sua vez tem o papel de avaliar os parâmetros de qualidade, de forma a permitir identificar a qualidade relativa dos atributos do produto. Neste contexto os testes afetivos são uma importante ferramenta, a qual permite conhecer a opinião do consumidor em relação às características sensoriais específicas ou globais de determinado produto, além de revelar o grau de aceitação por um determinado público.

Segundo Saad et al. (2011) os testes sensoriais afetivos são parte do sistema de controle de qualidade de alimentos, uma vez que estes são a única forma de se avaliar a opinião dos consumidores em relação a um alimento específico. Estes autores mencionam ainda que para alimentos suplementados com culturas probióticas ou ingredientes prebióticos essa avaliação é imprescindível.

Desta forma, as diferentes formulações de requeijão foram submetidas à avaliação sensorial, considerando o tempo inicial e após 65 dias de armazenamento a 5°C. Assim, as respectivas formulações foram avaliadas por 60 provadores, não treinados, na faixa etária de 15 a 62 anos, recrutados aleatoriamente entre os alunos e funcionários da Escola de Engenharia de Lorena / EEL-USP, cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 8 e Figura 11.

Desta forma, a análise dos quesitos aparência e aroma revela que não houve diferenças significativas ($p > 0.05$) entre as formulações probióticas e a formulação base, nos tempos avaliados. Esta observação revela que as cepas de *Lactobacillus* não interferiram significativamente nestes atributos.

Considerando o quesito sabor observa-se que, no tempo inicial, a avaliação das formulações de requeijão cremoso probiótico contendo *Lactobacillus plantarum*, e *Lactobacillus casei* ATCC 7469 foram significativamente inferiores ($p < 0.01$) em relação a formulação base. Assim, a avaliação do sabor para as demais formulações no tempo inicial, bem como após 65 dias de armazenagem a 5°C foram estatisticamente iguais.

No tocante aos atributos manuseio e impressão global observa-se que houve diferenças significativas, aos níveis de 1% e 5% respectivamente, entre a formulação probiótica contendo *Lactobacillus casei* ATCC 7469 e a formulação base, sendo esta melhor avaliada. Desta forma, a avaliação das demais formulações nos tempos inicial e após 65 dias revelou falta de significância nos valores atribuídos para estes quesitos.

Gaino et al. (2012) ao avaliar o perfil sensorial do requeijão cremoso probiótico inoculado com *Lactobacillus casei* armazenado por 4 dias a 7°C, constataram que a presença da cepa probiótica não influenciou significativamente ($p > 0.05$) as características sensoriais do produto, sendo os atributos aparência, aroma, sabor textura e aceitação geral avaliadas como “gostei moderadamente e gostei muito”.

Tabela 8 - Valores médios das notas dos atributos e impressão global da avaliação sensorial das diferentes formulações de requeijão probiótico.

		Formulações						
Atributos	Tempo	Base	LP	LC	LI	LA	LD	LF
Aparência	Inicial	7.75 ^a	7.61 ^a	6.98 ^a	6.95 ^a	7.43 ^a	7.11 ^a	7.58 ^a
	65 dias	7.30 ^a	7.73 ^a	7.00 ^a	7.48 ^a	7.48 ^a	7.55 ^a	7.48 ^a
Aroma	Inicial	7.16 ^a	6.73 ^a	6.65 ^a	6.58 ^a	7.60 ^a	6.71 ^a	6.85 ^a
	65 dias	7.00 ^a	6.88 ^a	6.88 ^a	6.83 ^a	6.90 ^a	6.80 ^a	6.90 ^a
Sabor	Inicial	7.73 ^a	6.20 ^b	6.53 ^b	7.11 ^a	7.18 ^a	7.20 ^a	6.28 ^a
	65 dias	7.40 ^a	7.33 ^a	7.10 ^a	7.38 ^a	7.60 ^a	7.10 ^a	7.06 ^a
Manuseio	Inicial	7.18 ^a	7.18 ^a	6.09 ^b	7.31 ^a	7.35 ^a	6.54 ^a	7.68 ^a
	65 dias	7.15 ^a	7.72 ^a	6.80 ^a	6.86 ^a	7.54 ^a	7.46 ^a	7.35 ^a
Impressão global	Inicial	7.60 ^a	6.96 ^a	6.81 ^b	7.38 ^a	7.30 ^a	7.01 ^a	7.50 ^a
	65 dias	6.96 ^a	7.68 ^a	6.95 ^a	7.13 ^a	7.31 ^a	7.21 ^a	7.25 ^a

Médias seguidas da mesma letra na mesma linha não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de média de Tukey.

LP = *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; LC= *Lactobacillus casei* ATCC 7469; LI= *Lactobacillus paracasei* SP11i; LA= *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356; LD= *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20; LF= *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338.

Fonte: Autoria própria

Diferenças nas características físico-químicas (item 5.4.1) devem ser consideradas para justificar as diferenças estatísticas no quesito sabor nas formulações de requeijão cremoso contendo *Lactobacillus casei* ATCC 7469 e *Lactobacillus paracasei* SP 11. Verifica-se que essas formulações apresentaram maior teor de umidade o que possivelmente afetou negativamente o sabor de ambas as formulações, bem como o manuseio e impressão global da formulação de requeijão cremoso contendo *Lactobacillus casei* ATCC 7469.

Figura 11 - Representação espacial das médias dos atributos avaliados no teste de aceitação das formulações de requeijão probiótico em relação a formulação base no tempo inicial (T0) e após 65 dias de armazenamento a 5°C (T65).

(Continua)

(Conclusão)

Figura 11 - Representação espacial das médias dos atributos avaliados no teste de aceitação das formulações de requeijão probiótico em relação a formulação base no tempo inicial (T0) e após 65 dias de armazenamento a 5°C (T65).

L. plantarum = *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; *L. casei* = *Lactobacillus casei* ATCC 7469; *L. paracasei* = *Lactobacillus paracasei* SP11i; *L. acidophilus* = *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356; *L. delbrueckii* = *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20; *L. fermentum* = *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338.

Fonte: Autoria própria

No tocante a impressão global, cujos resultados encontram-se representados na Figura 12, observa-se que as diferentes formulações avaliadas foram classificadas como “gostei moderadamente” (7,0) e “gostei ligeiramente” (6,0).

Figura 12 - Valores médios das notas atribuídas o quesito impressão global para as diferentes formulações de requeijão probiótico avaliadas.

LP = *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; LC= *Lactobacillus casei* ATCC 7469; LI= *Lactobacillus paracasei* SP11i; LA= *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356; LD= *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20; LF= *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338.

Fonte: Autoria Própria

Outra alternativa para se avaliar a aceitação de um produto alimentício consiste na determinação do “Índice de Aceitabilidade” que, de acordo com Dutcosky (1996), pode ser calculado por meio da equação apresentada abaixo, sendo considerado 70% como um bom indicativo de aceitabilidade.

$$IA(\%) = A \times 100 / B$$

Onde:

A= Nota média do atributo a ser avaliado

B=Nota / máxima obtida para o atributo avaliado

Desta forma, calculou-se o IA para as respectivas formulações de requeijão probiótico, onde em todos os atributos alcançou-se Índice de Aceitabilidade acima de 70%. No tocante sabor os índices de aceitabilidade encontram-se mostrados na Figura 13, revelando valores acima de 70%, o que confirma a boa aceitabilidade das formulações pelos provadores.

Figura 13 - Índice de aceitabilidade das formulações de requeijão cremoso probiótico avaliadas.

LP = *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; LC= *Lactobacillus casei* ATCC 7469; LI= *Lactobacillus paracasei* SP11i; LA= *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356; LD= *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20; LF= *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338.

Fonte: Autoria Própria

Adicionalmente, avaliou-se a atitude de compra do requeijão cremoso probiótico por parte dos provadores, cujos resultados são mostrados na Figura 14.

Figura 14 - Valores médios das notas referentes ao quesito “intenção de compra” das diferentes formulações de requeijão probiótico avaliadas.

LP = *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; LC= *Lactobacillus casei* ATCC 7469; LI= *Lactobacillus paracasei* SP11i; LA= *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356; LD= *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20; LF= *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338.

Fonte: Autoria Própria

Verifica-se que, com exceção da formulação base, pelo menos 80% dos provadores manifestaram que “provavelmente comprariam esse produto” quando armazenado por 65 dias a 5°C. Observa-se ainda que a avaliação das formulações no tempo inicial revelou valores das notas de intenção de compra inferiores, com exceção para a formulação base, o que demonstra que a incorporação das respectivas cepas probióticas interferiu positivamente na qualidade sensorial do requeijão cremoso.

Resultados semelhantes foram obtidos por Gaino et al. (2012), que formularam requeijão cremoso probiótico contendo *L. casei* armazenado por 4 dias a 7°C, quando 82% dos provadores manifestaram que “certamente ou provavelmente” comprariam o produto, sendo que para a formulação base (controle) esse valor foi reduzido para 72%.

Teixeira (2012), relata que na avaliação sensorial de requeijão cremoso contendo *L.acidophillus* e *B.bifidum* não foi observado diferença estatística ($p>0.5$) entre o tempo inicial e após 7 dias de armazenamento, no tocante a aceitabilidade e intenção de compra do produto.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- O requeijão cremoso apresenta-se como um veículo adequado para carrear cepas de micro-organismos probióticos, em conformidade com os padrões de identidade estabelecidos na legislação vigente.
- As formulações de requeijão cremoso probiótico avaliadas sustentaram uma população adequada de células viáveis durante 65 dias a 5°C, sendo que apenas 1 grama destas formulações é suficiente para atender as necessidades diárias de ingestão de produtos com alegação probiótica.
- A caracterização físico química e microbiológica das formulações avaliadas revelou que a inoculação de micro-organismos probióticos não alterou os padrões de identidade e qualidade estabelecidos na legislação.
- A avaliação sensorial das formulações avaliadas revelou, por meio da análise da “intenção de compra” que 80% dos provadores manifestaram que “provavelmente compraria” o produto.
- O índice de aceitabilidade para todos os atributos avaliados superior a 70% em todas as formulações.

6 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Avaliar a viabilidade dos *Lactobacillus* em requeijão cremoso, em um tempo superior a 65 dias, avaliando sua interferência na vida útil do produto, bem como seu mecanismo de ação contra possíveis contaminantes.

Caracterizar o requeijão cremoso probiótico no tocante a ácidos orgânicos e carboidratos no tempo inicial e após armazenamento a 5°C, bem como e avaliar a influência desses ácidos na característica sensorial do produto.

Desenvolver um Requeijão cremoso probiótico sem lactose.

REFERÊNCIAS

AXELSSON, L. Acid lactic bacteria: classification and physiology. *In*: Salminen S, Wright AV, Ouwehand A (eds) Lactic Acid Bacteria: **Microbiological and Functional Aspects**. New York : Marcel Dekker, 2004. P.1-66, 2004.

ALMEIDA, K.E.; TAMINE, A.Y.; OLIVEIRA, M.N. "Influence of total solids contents of /milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria". **LWT - Food Science and Technology**, v.42, p. 672-678,2009.

ANDRIGHETTO, C.; GOMES, M.I.F.V. Produção de picolés utilizando leite acidófilo. **Braz. J. Food Technol.**, v.6, n.2, p. 267-271, 2003.

ARES, G et al. Alternatives to reduce the bitterness, astringency and characteristic flavour of antioxidant extracts. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 871-878, 2009.

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

BENNET, R. W.; LANCETTE, G. A. **Staphylococcus aureus**. In: Food and Drug Administration – FDA. BAM – Bacteriological Analytical Manual Online. 8 ed. Rev. A. Silver Spring. FDA. Cap.12, 2001. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071429.htm>

BERGAMINI, C.V et al. Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. **Food Research International**, v.38, p.587-604,2005.

BERGER, W et al. **Processed cheese manufacture**: a Joha guide. Landerburg, BK Giulini, 1989. 238p.

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

BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Resolução nº 18 de 03 de dezembro de 1999 a. **Aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos.** Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/815ada0047458a7293e3d73fbc4c6735/RESOLUCAO_18_1999.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 09 fev 2016.

BRASIL. Resolução RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o “**Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.**” Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b . Acesso em: 20/08/2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996 **D.O.U 11/ 03/ 96**. Aprovar os regulamentos técnicos de Identidade e qualidade dos produtos lácteos.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006 **D. O. U. 14/ 12/ 2006**. Dispõe dos Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. Regulamento Técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, p. 191,2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Comissões e Grupos de Trabalho. Comissão Técnico-científica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. IX- Lista de Alegações de propriedade funcional aprovadas.** 2008. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em jan 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo processado ou fundido, processado pasteurizado ou fundido UHT (UAT): portaria nº 356, de 4 de setembro de 1997a. In: **NOVA legislação de produtos lácteos e de alimentos para fins especiais diet, lighth, enriquecidos.** São Paulo: Fonte Comunicações, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Leite e Produtos Lácteos. Portaria nº 359. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do requeijão cremoso ou requesón.** Brasília, DF, 1997b.

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

BOURROUL, G. O potencial da cadeia láctea brasileira. **Leite e Derivados**, n.95, p.36-48, 2006.

BURITI, F.C.A et al. Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented ed with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. **Food Chemistry**, v. 104, p.1605-1610,2007.

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.

CASTRO, F.P. et al. Influence of different content of cheese whey and oligofructose on the properties of fermented lactic beverages: Study using response surface methodology. **LWT . Food Science and Technology**, v.42,p. 993-997,2009b.

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

CHARTERIS, W.P. et al. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **Internation Journal of Dairy Technology**, v.51, n.4, p.123-136,1998.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.

CRUZ, A.G. et al. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science & Technology**, c. 20, n. 8, p. 344-354, 2009.

DE MAN, J.C., ROGOSA, M., SHARPE, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. **J. Applied Bact.**, 23:130-135.

DOUGLAS, L. C.; SANDERS, M. E. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 108, n. 3, p. 510- 21, 2008.

DRUNKLER, D.A. **Produção de requeijão cremoso simbiótico**. 2009. 178p Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: DA Champagnat, 1996.123p.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Cordoba, Spain: Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. 2001. 34 p. Disponível em: < ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf> Acesso em dezembro de 2015.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**, Ontario, Canada, 2002. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>>. Acessado em 17 jan. de 2016.

FOX, P.F. et al. Cheese: historical aspects. In: FOX, P.F.;GUINEE,T.P;COGAN, T.P.; MCSWEENEY, P.L.H., (eds.) **Fundamentals of cheese Science**. Gaithersburg: ASPEN, 2000. P. 1-9.

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

FURTADO, M. M. **Arte e ciência do queijo**. São Paulo: Globo, 1990.

GAINO, V. O. et al. Requeijão cremoso probiótico: avaliação da viabilidade de *Lactobacillus casei*, da composição físico-química e aceitação sensorial. **Semana. Ciências Agrárias**, v. 33, suplemento 2, p. 3133-3142, 2012.

GARRUTI, D. S. et al . Desenvolvimento do perfil sensorial e aceitação do requeijão cremoso. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n.3, p. 434-440,2003.

GRANATO, D. et al. Probiotic dairy products as functional foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9,p.455-470,2010.

HOLT, J.G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p.

HELLER, K.J. et al. Cheese and its potential as a probiotic food. N: FARNWORTH, E.R., (Ed.) **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC, 2003. P.203-225.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo, 2008. 532 p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. The world dairy situation 2007. **Bulletin IDF**, n. 423, p.5-18, 2007.

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

KOTZAMANIDIS, C. et al. Evaluation of adhesion capacity, cell surface traits and immunomodulatory activity of presumptive probiotic *Lactobacillus* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, n. 2, p.154-163, 2010.

HOLZAPFEL, W.H. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition" **American Journal of Clinical Nutrition**, c.73, p.365S, 2001.

LAHTINEN, S. et al . **Lactic acid bacteria**: microbiological and functional aspects. 4th ed., Florida, USA: CRC Press, 2011.

LEE, S. K.; KLOSTERMEYER, H. The effect of pH on the rheological properties of reduced-fat model processed cheese spreads. **Lebensm.-Wiss.u.-Technol.**, v. 34, p. 288-292, 2001.

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

LOMHOLT, S.B.; QVIST, K.B. The formation of cheese curd. In: LAW, B.A., (Ed.) **Technology of cheesemaking**. Boca Raton: CRC, 1999. p.66-98.

MARTINS, J.F.P. **Processamento de requeijão cremoso e outros queijos fundidos**. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos. 1981. 386p.

MINIM, V. P. R.; **Análise Sensorial. Estudos com consumidores.** 3º ed. Viçosa: 2013.332p.

MORAES F. P.; COLLA L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p.99-112, 2006.

MORAIS, M. B.; JACOB, C. M. A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, p. S189-S197, 2006.

MORENGHI, G. B. **Caracterização e vida de prateleira de queijos fundidos fabricados utilizando como conservantes sorbato de potássio, nisina e lisozima.** 2002. 136f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MORENO, I.; VIALTA, A.; VALLE, J. L. Efeitos das várias etapas do processamento de requeijão e queijos fundidos na microbiota do leite. **Revista Indústria de Laticínios**, mar-abr., p 63-66,2002.

MORENO, I. et al. Impacto da Qualidade da matéria-prima no produto final. In: VAN DENDER, A.G.F. **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: Tecnologia de fabricação, controle de processo e aspectos de mercado.** São Paulo: Fonte Comunicações e Editora Ltda, 2006. Cap.4, p.75-126.

MOROTOMI, M. Intestinal bacteria and cancer. In: YAKULT HONSHA. **Intestinal flora and immunity: intestinal infection, allergies, and cancer.** Tokyo: Yakult Honsha, 1997. p.35-44.

MOZZI, F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G. M. Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applicattions. **Ames: Blackwell**, 2010.

OLIVEIRA, A.C. **Viabilidade de Lactobacilus acidophilus e Bifidobacterium latis, microencapsulados por coarcevação, seguida de secagem por spray drying e leite de jorro.** 77p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

OLIVEIRA, J.S. de **Queijos: fundamentos tecnologicos.** Campinas: UNICAMP, 1986. 146p.

OMGE. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE GASTROENTEROLOGIA. **Guias práticas:**

probióticos e prebióticos. [s.l.]: [s.n.], 2008.

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N.P. Chemical analysis and sensory evaluation of Cheddar cheese produced with *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* or *Bifi dobacterium* sp. **Int. Dairy J.**, v.17, n.8, p.937-345, 2007.

ÓRDOÑEZ, J.A.P. **Tecnologia de alimentos**.. Porto Alegre: Artmed, 2005.V.2.

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

PINEIRO, M.; STANTON, C. Probiotic bactéria: legislative framework – requeriments to evidence basis. **Journal of Nutrition**, v.137, p.850S, 2007.

PIMENTEL, B. M. V.; FRANCKI, M.; GOLLÜCKE, B. P. **Alimentos funcionais: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 2005.

PUUPPONEN-PIMIA, R. et al. Development of functional ingredients for gut health **Trends in Food Science and 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.1-7,2009.

Ramírez, G. et al. Evaluación de la viabilidad de una cepa probiótica nativa de *Lactobacillus casei* en queso crema. **Rev. Lasallista Investig**, v. 4, p.37-42, 2007.

RAPACCI, M. **Estudo comparativo das características físicas e químicas, reológicas e sensoriais do requeijão cremoso obtido por fermentação láctica e acidificação direta**. 1997. 142 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

RIBEIRO, E.P. **Queijos**. São Caetano do Sul, Escola de Engenharia Mauá, ,2000. Apostila. cap.8.

REID,G.; KIM,S.O.; KOHLER,G.A. Selecting, testing and understanding probiotic microorganisms. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.46, n.2, p.149-157,2006.

RODRIGUES, F. Requeijão, fondue, especialidade, queijo processado. Juiz de fora: Do Autor, 2006

RODRIGUES, D. et al. The potential effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled milk matrices. **LWT-Food Science and Technology**, v.44, p. 100-108, 2011.

ROBERFROID, M.B. Inulin-type fructans: functional food ingredients. **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 11, p. 2493S – 2502S, 2007.

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

ROMEIH, E.A. et al. Lowfat white-brined cheese made from bovine milk and two commercial fat mimetics: chemical, physical and sensory attributes. **International Dairy Journal**, v.12, n.6, p.525-540, 2002.

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

SAAD, S. M. I. et al. Probióticos e Prebióticos em Alimentos: Aspectos Tecnológicos, Legislação e Segurança no Uso. In: SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e prebióticos em alimentos**: fundamentos e aplicações tecnológicas. São Paulo: Varela, 2011. p. 23-49.

SHAH, N.P. Functional cultures and health benefits. **Int. Dairy J.**, v.17, p.1262-1277, 2007.

SHARP, M.D.; MCMAHON, D.J.; BROADBENT, J.R. Comparative evaluation of yougurt and low-fat Cheddar cheese as delivery media for probiotic *Lacotbacillus casei*. **Journal of Food Science**, v.73, p. M375-M377.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; ISOLAURI, E. Clinical applications of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, p.563-572, 1998.

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

SANCHEZ, B. et al. Probiotic Fermented Milks: present and future. **International Journal of Dairy Technology**, v.62, p.1-10,2009.

SANTOS, J. A. Requeijão: produto típico do Brasil com mercado emergente. **Revista Leite e Derivados**, v. 11, n.66, p. 36-46, 2002.

SAXELIN, M. Probiotic formulations and applications, the current probiotics market and changes in the market place: a European perspective. **Clinical Infectious Disease**, v.46, p.76-79,2008.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2. ed. rev. ampl. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 317p.

STILES, M.E; HOLZAPFEL, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **Int J Food Microbiol**. V,36, n.1p.1-29,1997.

STRINGHETA, P. C. et al. **Alimentos “funcionais”: conceitos, contextualização e regulamentação** Juiz de Fora: Templo 246 p, 2007.

SVEJE, M. Probiotic and Prebiotics – improving consumer health trough food consumption. **Nutracos**, sept/oct, p.28-31, 2007.

SWANSON, K. M. J.; PETRAN, R. L.; HANLIN, J. H. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: Downes FP, Ito K (eds). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4ª ed. Washington, DC: American Public Health Association (APHA); 2001. p. 53-62.

TEIXEIRA, L.S.B. **Qualidade e viabilidade de requeijão cremoso adicionado de *Lactobacillus Acidophilus* e *Bifidobacterium Bifidum***. 2012. Dissertação (Mestrado em Nutrição). Universidade Federal do Pernambuco, Recife.

TURGUT, T.; CAKMAKCI,S. Investigation of the possible use of probiotics in ice cream manufacture. **International Journal of Dairy Technology**, Chichester, v. 62, n.3, p.444-451,2009.

VALLE, J.L.E. Qualidade físico-química da matéria-prima e produto acabado. In: MARTINS, J.P.P.; FERNANDES, A.G. (Ed.). **Processamento de requeijão cremoso e outros queijos fundidos**. Campinas: ITAL,1981. cap.2, p.1-5.

VAN DENDER, A.G.F. et al. **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: aspectos de qualidade, processamento, rotulagem, legislação e mercado.** Seminário ITAL/ TECNOLAT. Campinas, nov.2000. Cap.1 e 7. Apostila.

VAN DENDER, A.G.F. Fabricação de queijos fundidos e de requeijão cremoso: aspectos legais e parâmetros para escolha de matéria prima. **Revista Indústria de Laticínios**, v 4, n. 35, p. 62-66, 2001.

VAN DENDER, A. G. F. **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos:** tecnologia de fabricação, controle do processo e aspectos de mercado. São Paulo, SP: Fonte Comunicações e Editora, 2014. 391p.

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

VÁSQUEZ ,A. et al .DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. **Syst Appl Microbiol**. V.28 n.5, p.430-431,2005.

WALLACE H. ANDREWS, W.H.; JACOBSON, A. & HAMMACK, T. Salmonella. In: **Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual Online., Chapter 5,** 2016. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>

WOLLOWSKI, L.; RECHKEMMER, G.; POOL-ZOBEL, B.L. Proctetive role of probiotics and prebiotics in colon câncer. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.451-455,2001.

WINTER, J. **Probiotics: the potential of billions.** Functional Ingredients, Nov. 01, 2008. Disponível em : <http://www.functionalingredientsmag.com/fimag/articleDisplay.asp?strArticleId=1921&strSite=FFNsite>. Acessado em 07 fev 2016.

ZEPPA, G.; CONTERNO, L; GERBI, Determination of organic acids, sugars, diacetyl, and acetoin in cheese by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V.49, P-2722- 2726, 2001.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (Coord.). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. versão digital. Brasília, DF: Ministério da Saúde,

2008. 1020 p. Disponível em:
http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf . Acesso em: 20 abr. 2017.

APENDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Desde logo fica garantido o sigilo das informações. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Requeijão cremoso probiótico: Avaliação da viabilidade celular, caracterização físico-química e sensorial.

Pesquisador Responsável: Viviane Livia Carvalho de Souza

Telefone para contato: (12) 98188-9332

Pesquisadores participante: Ismael Maciel de Mancilha

Telefones para contato: (12) 3159 5031

O objetivo do trabalho é contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia de produção de requeijão cremoso probiótico. Estudando a viabilidade de cepas de *Lactobacillus* incorporadas no requeijão cremoso mantido sob refrigeração. Caracterizando o requeijão cremoso probiótico no tocante às suas propriedades físico-química compreendendo pH, acidez titulável, lipídeos, proteínas e umidade. Avaliar as propriedades sensoriais e a intenção de compra do requeijão cremoso probiótico.

Serão obtidas sete formulações de requeijão cremoso probiótico, cada formulação contendo uma espécie de *Lactobacillus*, e uma sem denominada formulação padrão. Após a determinação de análises físico-químicas, serão avaliadas características sensoriais do requeijão cremoso probiótico. A referida avaliação será feita por meio de escala hedônica de 9 pontos e intenção de compra, impressão global, aroma, manuseio e sabor. A ficha de avaliação a ser utilizada segue a padronização proposta pelo (IAL 2008). As análises serão realizadas no laboratório de sensorial da Planta de bebidas na EEL-USP, em cabines individuais sob condições adequadas de iluminação e temperatura. Os testes serão realizados por consumidores comuns, convocados por intermédio de informativos distribuídos no campus da Escola de Engenharia de Lorena. Não há nenhum risco, prejuízo, desconforto ou lesões que podem ser provocados pela pesquisa, com garantia de sigilo e direito de retirar o consentimento a qualquer tempo. Este estudo é importante porque seus resultados fornecerão informações para o desenvolvimento de um novo produto.

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. Que o trabalho tem por finalidade contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia de produção de requeijão cremoso probiótico;
2. Que como voluntário deste estudo, terei que participar do teste de aceitação do requeijão cremoso probiótico e informar o quanto gostei ou desgostei do produto e intenção de compra;
3. Que a minha participação como voluntário se limitará a uma seção de avaliação sensorial de aproximadamente 15 minutos em um único dia, e outra após 60 dias;
4. Que necessitarei comparecer ao laboratório de análise sensorial da planta de bebidas na EEL-USP para a realização do teste de aceitação do produto;
5. Que não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo;
6. Que meu nome será mantido em sigilo, assegurando assim a minha privacidade e se desejar, deverei ser informado sobre os resultados dessa pesquisa;
7. Que poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum tipo de prejuízo ou penalização;
8. Eu não terei quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa;
9. Concordo que este estudo é importante porque seus resultados fornecerão informações para o desenvolvimento de um novo produto;
10. Que em caso de qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos poderei entrar em contato com a equipe científica pelo telefone (12 98188-9332, falar com Viviane Livia Carvalho de Souza);

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar, como voluntária(o), do estudo: **Requeijão cremoso probiótico: avaliação da viabilidade de cepas de Lactobacillus, caracterização físico-química e sensorial.**

Nome e Assinatura do pesquisador

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____,
 RG _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo **Requeijão cremoso probiótico: avaliação da viabilidade de cepas de Lactobacillus, caracterização físico-química e sensorial.** Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador Viviane Livia Carvalho de Souza sobre a pesquisa, os

procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Local e data _____/_____/_____

Assinatura do Voluntário _____

Assinatura do Pesquisador _____ (Viviane Livia
Carvalho de Souza)

Assinatura do Orientador _____ (Prof. Dr. Ismael Maciel
de Mancilha)

APENDICE B

LAUDO DE ANÁLISE

PROCEDÊNCIA: Viviane Lícia Carvalho de Souza
Lab. de Probióticos
Departamento Biotecnologia - LOT
Escola de Engenharia de Lorena - EEL/USP
Estrada Municipal do Campinho s/n, Ponte Nova
12602-871 - Lorena - SP

PRODUTO: REQUEIJÃO (AMOSTRA LP)

RECEBIMENTO DA AMOSTRA: 31/05/2017

EMISSÃO DO LAUDO: 16/05/2017 **REGISTRO Nº** 02843-17

APRESENTAÇÃO DO PRODUTO

Amostra refrigerada, acondicionada em embalagem lacrada.
Temperatura no recebimento: 18°C
Responsável pela coleta: o cliente
Envio: SEDEX (31/05/2017)

METODOLOGIA EMPREGADA

A metodologia de análise microbiológica foi realizada segundo o disposto pelo "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" da "American Public Health Association" (APHA).

RESULTADO MICROBIOLÓGICO

EXAMES	RESULTADO ENCONTRADO	PADRÃO DE QUALIDADE Valor máximo permitido (grupo 8J)	LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO DA TÉCNICA
Coliformes a 35°C (NMP/g)	< 3,0 NMP/g	NE	3,0 NMP/g
Coliformes a 45°C (NMP/g)	< 3,0 NMP/g	10 NMP/g	3,0 NMP/g
Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)	< 10 UFC/g	1.000 NMP/g	10 UFC/g
<i>Salmonella</i> sp/25g	Ausência em 25 g	Ausência em 25g	***

NE = não especificado UFC/g = Unidade Formadora de Colônia/grama NMP = Número Mais Provável/grama

CONCLUSÃO

Produto **DE ACORDO** com os Padrões Legais Vigentes
Referencia: RDC nº 12 de 02/01/2001, ANVISA.

OBSERVAÇÃO: Este laudo refere-se unicamente à amostra enviada.
Registro: CVS N° -E-08/111.789/1991
Registro: CRBio- N° 814/02
CNPJ 40.332.009/0001-14

Marcia Soares Pinheiro
Marcia Soares Pinheiro
Responsável Técnica
CRBio - 462-02

LAUDO DE ANÁLISE

PROCEDÊNCIA: Viviane Lícia Carvalho de Souza
Lab. de Probióticos
Departamento Biotecnologia - LOT
Escola de Engenharia de Lorena - EEL/USP
Estrada Municipal do Campinho s/n, Ponte Nova
12602-871 - Lorena - SP

PRODUTO: REQUEIJÃO (AMOSTRA LI)

RECEBIMENTO DA AMOSTRA: 31/05/2017

EMIÇÃO DO LAUDO: 16/05/2017 **REGISTRO Nº** 02842-17

APRESENTAÇÃO DO PRODUTO

Amostra refrigerada, acondicionada em embalagem lacrada.
Temperatura no recebimento: 18°C
Responsável pela coleta: o cliente
Envio: SEDEX (31/05/2017)

METODOLOGIA EMPREGADA

A metodologia de análise microbiológica foi realizada segundo o disposto pelo "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" da "American Public Health Association" (APHA).

RESULTADO MICROBIOLÓGICO

EXAMES	RESULTADO ENCONTRADO	PADRAO DE QUALIDADE Valor máximo permitido (grupo 8J)	LIMITE MINIMO DE DETECÇÃO DA TÉCNICA
Coliformes a 35°C (NMP/g)	< 3,0 NMP/g	NE	3,0 NMP/g
Coliformes a 45°C (NMP/g)	< 3,0 NMP/g	10 NMP/g	3,0 NMP/g
Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)	< 10 UFC/g	1.000 NMP/g	10 UFC/g
Salmonella sp/25g	Ausência em 25 g	Ausência em 25g	***

NE = não especificado UFC/g = Unidade Formadora de Colônia/grama NMP = Número Mais Provável/grama

CONCLUSÃO

Produto **DE ACORDO** com os Padrões Legais Vigentes
Referência: RDC nº 12 de 02/01/2001, ANVISA.

OBSERVAÇÃO: Este laudo refere-se unicamente à amostra enviada.
Registro: CVS Nº -E-08/111.789/1991
Registro: CRBio- Nº 814/02
CNPJ 40.332.009/0001-14

Marcia Soares Pinheiro
Responsável Técnica
CRBio - 462-02

LAUDO DE ANÁLISE

PROCEDÊNCIA: Viviane Lícia Carvalho de Souza
Lab. de Probióticos
Departamento Biotecnologia - LOT
Escola de Engenharia de Lorena - EEL/USP
Estrada Municipal do Campinho s/n, Ponte Nova
12602-871 - Lorena - SP

PRODUTO: REQUEIJÃO (AMOSTRA P)

RECEBIMENTO DA AMOSTRA: 31/05/2017

EMIÇÃO DO LAUDO: 16/05/2017 **REGISTRO Nº** 02844-17

APRESENTAÇÃO DO PRODUTO

Amostra refrigerada, acondicionada em embalagem lacrada.
Temperatura no recebimento: 18°C
Responsável pela coleta: o cliente
Envio: SEDEX (31/05/2017)

METODOLOGIA EMPREGADA

A metodologia de análise microbiológica foi realizada segundo o disposto pelo "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" da "American Public Health Association" (APHA).

RESULTADO MICROBIOLÓGICO

EXAMES	RESULTADO ENCONTRADO	PADRÃO DE QUALIDADE Valor máximo permitido (grupo 8J)	LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO DA TÉCNICA
Coliformes a 35°C (NMP/g)	< 3,0 NMP/g	NE	3,0 NMP/g
Coliformes a 45°C (NMP/g)	< 3,0 NMP/g	10 NMP/g	3,0 NMP/g
Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)	< 10 UFC/g	1.000 NMP/g	10 UFC/g
<i>Salmonella</i> sp/25g	Ausência em 25 g	Ausência em 25g	***

NE = não especificado UFC/g = Unidade Formadora de Colônia/grama NMP = Número Mais Provável/grama

CONCLUSÃO

Produto **DE ACORDO** com os Padrões Legais Vigentes
Referencia: RDC nº 12 de 02/01/2001, ANVISA.

OBSERVAÇÃO: Este laudo refere-se unicamente à amostra enviada.
Registro: CVS N° -E-08/111.789/1991
Registro: CRBio- N° 814/02
CNPJ 40.332.009/0001-14

Marcia Soares Pinheiro
Marcia Soares Pinheiro
Responsável Técnica
CRBio - 462-02

LAUDO DE ANÁLISE

PROCEDÊNCIA: Viviane Lícia Carvalho de Souza
 Lab. de Probióticos
 Departamento Biotecnologia - LOT
 Escola de Engenharia de Lorena - EEL/USP
 Estrada Municipal do Campinho s/n, Ponte Nova
 12602-871 - Lorena - SP

PRODUTO: REQUEIJÃO (AMOSTRA LF)

RECEBIMENTO DA AMOSTRA: 31/05/2017

EMIÇÃO DO LAUDO: 16/05/2017 **REGISTRO Nº** 02841-17

APRESENTAÇÃO DO PRODUTO

Amostra refrigerada, acondicionada em embalagem lacrada.
 Temperatura no recebimento: 18°C
 Responsável pela coleta: o cliente
 Envio: SEDEX (31/05/2017)

METODOLOGIA EMPREGADA

A metodologia de análise microbiológica foi realizada segundo o disposto pelo "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" da "American Public Health Association" (APHA).

RESULTADO MICROBIOLÓGICO

EXAMES	RESULTADO ENCONTRADO	PADRAO DE QUALIDADE Valor máximo permitido (grupo 8J)	LIMITE MINIMO DE DETECÇÃO DA TÉCNICA
Coliformes a 35°C (NMP/g)	< 3,0 NMP/g	NE	3,0 NMP/g
Coliformes a 45°C (NMP/g)	< 3,0 NMP/g	10 NMP/g	3,0 NMP/g
Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)	< 10 UFC/g	1.000 NMP/g	10 UFC/g
<i>Salmonella</i> sp/25g	Ausência em 25 g	Ausência em 25g	***

NE = não especificado UFC/g = Unidade Formadora de Colônia/grama NMP = Número Mais Provável/grama

CONCLUSÃO

Produto **DE ACORDO** com os Padrões Legais Vigentes
 Referência: RDC nº 12 de 02/01/2001, ANVISA.

OBSERVAÇÃO: Este laudo refere-se unicamente à amostra enviada.
 Registro: CVS Nº -E-08/111.789/1991
 Registro: CRBio- Nº 814/02
 CNPJ 40.332.009/0001-14

Marcia Soares Pinheiro
 Responsável Técnica
 CRBio - 462-02

LAUDO DE ANÁLISE

PROCEDÊNCIA: Viviane Lícia Carvalho de Souza
Lab. de Probióticos
Departamento Biotecnologia - LOT
Escola de Engenharia de Lorena - EEL/USP
Estrada Municipal do Campinho s/n, Ponte Nova
12602-871 - Lorena - SP

PRODUTO: REQUEIJÃO (AMOSTRA LC)

RECEBIMENTO DA AMOSTRA: 31/05/2017

EMISSÃO DO LAUDO: 16/05/2017 **REGISTRO Nº** 02839-17

APRESENTAÇÃO DO PRODUTO

Amostra refrigerada, acondicionada em embalagem lacrada.
Temperatura no recebimento: 18°C
Responsável pela coleta: o cliente
Envio: SEDEX (31/05/2017)

METODOLOGIA EMPREGADA

A metodologia de análise microbiológica foi realizada segundo o disposto pelo "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" da "American Public Health Association" (APHA).

RESULTADO MICROBIOLÓGICO

EXAMES	RESULTADO ENCONTRADO	PADRÃO DE QUALIDADE Valor máximo permitido (grupo 8J)	LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO DA TÉCNICA
Coliformes a 35°C (NMP/g)	< 3,0 NMP/g	NE	3,0 NMP/g
Coliformes a 45°C (NMP/g)	< 3,0 NMP/g	10 NMP/g	3,0 NMP/g
Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)	< 10 UFC/g	1.000 NMP/g	10 UFC/g
<i>Salmonella</i> sp/25g	Ausência em 25 g	Ausência em 25g	***

NE = não especificado UFC/g = Unidade Formadora de Colônia/grama NMP = Número Mais Provável/grama

CONCLUSÃO

Produto **DE ACORDO** com os Padrões Legais Vigentes
Referência: RDC nº 12 de 02/01/2001, ANVISA.

OBSERVAÇÃO: Este laudo refere-se unicamente à amostra enviada.

Registro: CVS N° -E-08/111.789/1991

Registro: CRBio- N° 814/02

CNPJ 40.332.009/0001-14

Marcia Soares Pinheiro
Marcia Soares Pinheiro
Responsável Técnica
CRBio - 462-02

LAUDO DE ANÁLISE

PROCEDÊNCIA: Viviane Lícia Carvalho de Souza
Lab. de Probióticos
Departamento Biotecnologia - LOT
Escola de Engenharia de Lorena - EEL/USP
Estrada Municipal do Campinho s/n, Ponte Nova
12602-871 - Lorena - SP

PRODUTO: REQUEIJÃO (AMOSTRA LD)

RECEBIMENTO DA AMOSTRA: 31/05/2017

EMIÇÃO DO LAUDO: 16/05/2017 **REGISTRO Nº** 02840-17

APRESENTAÇÃO DO PRODUTO

Amostra refrigerada, acondicionada em embalagem lacrada.
Temperatura no recebimento: 18°C
Responsável pela coleta: o cliente
Envio: SEDEX (31/05/2017)

METODOLOGIA EMPREGADA

A metodologia de análise microbiológica foi realizada segundo o disposto pelo "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" da "American Public Health Association" (APHA).

RESULTADO MICROBIOLÓGICO

EXAMES	RESULTADO ENCONTRADO	PADRAO DE QUALIDADE Valor máximo permitido (grupo 8J)	LIMITE MINIMO DE DETECÇÃO DA TÉCNICA
Coliformes a 35°C (NMP/g)	< 3,0 NMP/g	NE	3,0 NMP/g
Coliformes a 45°C (NMP/g)	< 3,0 NMP/g	10 NMP/g	3,0 NMP/g
Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)	< 10 UFC/g	1.000 NMP/g	10 UFC/g
<i>Salmonella</i> sp/25g	Ausência em 25 g	Ausência em 25g	***

NE = não especificado UFC/g = Unidade Formadora de Colônia/grama NMP = Número Mais Provável/grama

CONCLUSÃO

Produto **DE ACORDO** com os Padrões Legais Vigentes
Referencia: RDC nº 12 de 02/01/2001, ANVISA.

OBSERVAÇÃO: Este laudo refere-se unicamente à amostra enviada.
Registro: CVS Nº -E-08/111.789/1991
Registro: CRBio- Nº 814/02
CNPJ 40.332.009/0001-14

Marcia Soares Pinheiro
Responsável Técnica
CRBio - 462-02

LAUDO DE ANÁLISE

PROCEDÊNCIA: Viviane Lícia Carvalho de Souza
Lab. de Probióticos
Departamento Biotecnologia - LOT
Escola de Engenharia de Lorena - EEL/USP
Estrada Municipal do Campinho s/n, Ponte Nova
12602-871 - Lorena - SP

PRODUTO: REQUEIJÃO (AMOSTRA LA)

RECEBIMENTO DA AMOSTRA: 31/05/2017

EMIÇÃO DO LAUDO: 16/05/2017 **REGISTRO Nº** 02838-17

APRESENTAÇÃO DO PRODUTO

Amostra refrigerada, acondicionada em embalagem lacrada.
Temperatura no recebimento: 18°C
Responsável pela coleta: o cliente
Envio: SEDEX (31/05/2017)

METODOLOGIA EMPREGADA

A metodologia de análise microbiológica foi realizada segundo o disposto pelo "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" da "American Public Health Association" (APHA).

RESULTADO MICROBIOLÓGICO

EXAMES	RESULTADO ENCONTRADO	PADRÃO DE QUALIDADE Valor máximo permitido (grupo 8J)	LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO DA TÉCNICA
Coliformes a 35°C (NMP/g)	< 3,0 NMP/g	NE	3,0 NMP/g
Coliformes a 45°C (NMP/g)	< 3,0 NMP/g	10 NMP/g	3,0 NMP/g
Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)	< 10 UFC/g	1.000 NMP/g	10 UFC/g
Salmonella sp/25g	Ausência em 25 g	Ausência em 25g	***

NE = não especificado UFC/g = Unidade Formadora de Colônia/grama NMP = Número Mais Provável/grama

CONCLUSÃO

Produto **DE ACORDO** com os Padrões Legais Vigentes
Referência: RDC nº 12 de 02/01/2001, ANVISA.

OBSERVAÇÃO: Este laudo refere-se unicamente à amostra enviada.
Registro: CVS N° -E-08/111.789/1991
Registro: CRBio- N° 814/02
CNPJ 40.332.009/0001-14

Marcia Soares Pinheiro
Marcia Soares Pinheiro
Responsável Técnica
CRBio - 462-02

APENDICE C

Determinação das concentrações de ácidos orgânicos e carboidratos

Ácidos orgânico (g/L)					
Formulações	Láctico	Propionico	Butirico	Fórmico	Acético
Base	2.07	0.49	-	0.28	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	7.57	-	-	0.48	-
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469	5.04	-	0.19	0.09	-
<i>Lactobacillus paracasei</i> SP11	7.12	-	-	0.27	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	7.27	-	0.57	0.34	-
<i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20	19.51	-	0.18	0.48	-
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338	17.1	-	0.18	0.62	-

Fonte: Autoria própria

Carboidratos (g/L)			
Formulações	Galactose	Glicose	Lactose
Base	0.24	-	25.62
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	0.22	-	23.54
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469	-	-	22.50
<i>Lactobacillus paracasei</i> SP11	-	-	23.25
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	-	-	16,45
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFVH2B20	0.27	-	13.10
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338	0.21	-	15,81

Fonte: Autoria própria