

1 **Desenvolvimento de requeijão cremoso probiótico suplementado com**
2 **diferentes cepas do gênero *Lactobacillus***

3
4 Viviane Lívia Carvalho de Souza^{a1}, Ana Maria dos Santos Camargos^a e Sarah
5 de Souza Queiroz^a

6 ^aEscola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, SP, Brasil, 12600-970

7
8 ¹Corresponding author: *Email address*: liviacarvalho@usp.br

9
10 **HIGHLIGHTS:**

- 11 • Requeijão cremoso mostrou-se uma matriz adequada para carrear probióticos.
12 • A viabilidade celular foi mantida dentro do padrão por 65 dias.
13 • A avaliação sensorial revelou uma boa aceitação geral do produto.

14
15 **ABSTRACT**

16 Alimentos probióticos são produtos que, além de possuírem alto valor nutricional,
17 estimulam atividades fisiológicas e metabólicas no organismo. Dessa forma, os
18 seus benefícios aliados à maior conscientização da população na busca pela
19 reeducação alimentar impulsionam o consumo desta classe de produtos. O
20 requeijão cremoso é um alimento que apresenta uma matriz com características
21 físico-químicas adequadas para sua utilização como potencial carreador de
22 microrganismos. O desenvolvimento das formulações de requeijão probiótico
23 incorporadas com seis cepas de *Lactobacillus*: *L. plantarum* ATCC 8014, *L.*
24 *acidophilus* ATCC 4356, *L. delbrueckii* UFV H2B20, *L. fermentum* ATCC 9338,
25 *L. casei* ATCC 7469 e *L. paracasei* SP11 foi proposto e revelou resultados
26 promissores. Foi constatado que durante um período de 65 dias de estocagem
27 a 5°C, foi mantida viável uma concentração de células acima de 10⁸ UFCg⁻¹, que
28 se encontra dentro do limite estipulado para classificação como alimento
29 funcional. Além disso, o requeijão cremoso probiótico avaliado neste trabalho
30 revelou-se como um produto de boa aceitação global na análise sensorial e com
31 intenção positiva de compra pelos avaliadores.

32
33 **PALAVRAS CHAVE:** Alimentos funcionais, Lactobacilos, Probióticos, Requeijão
34 cremoso, Perfil sensorial.

35 1. INTRODUÇÃO

36 Probióticos são definidos como “microrganismos vivos que, se
37 administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde” (FAO,
38 2002). Além de propiciarem a manutenção de uma microbiota intestinal
39 saudável, estimulam a resistência gastrointestinal à colonização por patógenos,
40 auxiliam a digestão da lactose em indivíduos intolerantes e promovem ativação
41 do sistema imune (Kechagia *et al.*, 2013; Kerry *et al.*, 2018). Os produtos lácteos
42 se apresentam como principais veículos de culturas probióticas, sendo os
43 pioneiros nessa categoria (Sanchez *et al.*, 2009). O mercado global de
44 probióticos foi avaliado em US\$42.66 bilhões em 2016 e algumas projeções
45 indicam que esse setor poderá alcançar US\$ 64 bilhões até o ano de 2022
46 (www.marketsandmarkets.com).

47 Diversas opções de alimentos funcionais podem ser encontradas
48 atualmente no mercado. Dentre estes alimentos, os mais tradicionais são os
49 leites fermentados e iogurtes, porém o desenvolvimento de probióticos em
50 queijos têm recebido destaque, já que essa matriz apresenta um maior conteúdo
51 de gordura e valor de pH mais elevado. Tais características propiciam a
52 manutenção da integridade dos microrganismos tanto na estocagem do
53 alimento, quanto na sua passagem pelo trato gastrointestinal (Stanton *et al.*,
54 1998; Kechagia *et al.*, 2013). Neste contexto, o requeijão cremoso, que é um
55 produto típico brasileiro de grande aceitação pela população, ainda não teve sua
56 comercialização explorada como veículo de probióticos. De acordo com o
57 Padrão de Identidade e Qualidade de Requeijão (PIQ), estabelecido pelo
58 Ministério da Agricultura Brasileiro, este alimento deve atender os requisitos de
59 apresentar no mínimo 55% de matéria gorda no extrato seco e o máximo de 65%
60 de umidade (Brasil, 1997).

61 Os probióticos comumente estudados e utilizados são bactérias lácticas
62 pertencentes principalmente aos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*,
63 *Streptococcus* e *Enterococcus* e leveduras, como a *Saccharomyces boulardii*
64 (Kerry *et al.*, 2018). Neste cenário, o emprego de bactérias do gênero
65 *Lactobacillus* na dieta humana apresenta um crescimento desde o início do
66 século XX, sendo um grupo de microrganismos promissor para a utilização em
67 alimentos probióticos (Stiles *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 2011).

68 A Agência Nacional de Vigilância Sanitária no Brasil recomenda que, para
69 assegurar o efeito benéfico dos probióticos, deve-se consumir quantidade
70 mínima viável destes microrganismos na faixa de 10^8 a 10^9 UFC.g⁻¹ por dia
71 (Brasil, 2008). Já a Associação Internacional de Probióticos (IPA) recomenda
72 que o consumo diário deve ser igual ou superior a 10^7 UFC.g⁻¹
73 (www.internationalprobiotics.org).

74 Muitos estudos envolvendo a utilização de probióticos em diversos
75 alimentos vem sendo desenvolvidos recentemente, como sorvete de leite de
76 cabra suplementado com *L. acidophilus* e *B. lactis* (Akalin *et al.*, 2018),
77 chocolates na presença de *L. paracasei* e *L. acidophilus* e adicionados de
78 prebióticos como inulina (Konar *et al.*, 2018), queijo Minas acrescido de *L.*
79 *acidophilus* LA 14 e *B. longum* BL 05 (Lollo *et al.*, 2015), *cream cheese* contendo
80 *B. animalis* subsp. *Lactis* DSM 10140 e *L. reuteri* DSM 20016 (Speranza *et al.*,
81 2017), além de leite fermentado de *kefir*, no qual foram testadas leveduras
82 probióticas e também avaliada a ação sinérgica de uma enzima β -glicosidase
83 (Lima *et al.*, 2017). Todos os alimentos utilizados nesses trabalhos se
84 destacaram como boas matrizes para inoculação e manutenção das culturas
85 probióticas.

86 A adição de probióticos e prebióticos em requeijão cremoso foi
87 anteriormente avaliada por meio da utilização de *Bifidobacterium animalis* subsp.
88 *Lactis* Bb-12, na qual houve manutenção da contagem do microrganismo em 10^6
89 UFC.g⁻¹ durante 60 dias de armazenamento (Drunkler, 2009). Todavia, para
90 assegurar a contagem de probióticos indicada pela legislação, a ingestão dessa
91 formulação deveria ser de 100 g por dia, o que representa um consumo muito
92 elevado por indivíduo.

93 Tendo em vista as características vantajosas do requeijão cremoso como
94 veículo de microrganismos probióticos, atrelado ao aumento do consumo de
95 alimentos funcionais, o objetivo deste trabalho foi a elaboração de um requeijão
96 probiótico e avaliação da viabilidade de diferentes estirpes do gênero
97 *Lactobacillus*, composição físico-química e aceitação sensorial do produto. Os
98 resultados obtidos apontam que apenas 1 g das formulações desenvolvidas
99 seria suficiente para atender a demanda diária recomendada pela legislação
100 quanto ao consumo de alimentos probióticos.

101

102 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

103 2.1. *Comitê de ética*

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

108 2.2. *Microrganismos e preparo do inóculo*

109 Para o desenvolvimento do requeijão probiótico proposto no presente
110 trabalho foram empregadas seis cepas de *Lactobacillus*, a saber: *L. plantarum*
111 ATCC 8014, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. delbrueckii* UFV H2B20, *L. fermentum*
112 ATCC 9338, *L. casei* ATCC 7469 e *L. paracasei* SP11 (Nestlé).

113 O cultivo das bactérias foi realizado com 2 mL da cultura estoque, mantida
114 a -20 °C em glicerol 20 % (v/v), juntamente a 198 mL de meio Man Rogosa &
115 Sharpe – MRS (De Man *et al.*, 1960) por 24 h a 37 °C. Em seguida, o conteúdo
116 de cada frasco foi transferido para novos Erlenmeyers contendo 2 L de meio
117 MRS a pH 6,50 devidamente esterilizados e incubados em estufa a 37 °C por 18
118 h. Posteriormente, as suspensões de células foram centrifugadas 3 vezes a
119 1.246 x g por 20 min e as células ressuspendidas em solução salina 0,09 %. Em
120 seguida, centrifugou-se novamente e as células foram ressuspendidas em 50 mL
121 de leite em pó desnatado reconstituído à 10 % e transferidas para frascos
122 Erlenmeyer esterilizados, seguido de incubação a 37 °C por 2 h.

123 2.3. *Desenvolvimento do requeijão cremoso probiótico*

124 O preparo de requeijão cremoso iniciou-se com a adição de leite
125 pasteurizado tipo C, contendo 3 % de gordura (Serramar) a 82 °C. Para cada
126 formulação foram utilizados 9 L de leite. Posteriormente, foi adicionado ácido
127 láctico 85 % (Purac) grau alimentício, diluído na proporção de 1:10, sob agitação
128 lenta até completa mistura do ácido. Após a coagulação, a mistura foi resfriada
129 à temperatura ambiente (23 ± 2 °C) e foi feita a dessoragem, prensagem manual
130 da massa e sua pesagem para efeito de cálculo dos demais ingredientes a serem
131 adicionados. Em seguida, adicionou-se creme de leite, equivalente à 50 % do
132 peso da massa, seguido de homogeneização e aquecimento até 85 °C. Na
133 sequência, adicionou-se 1,3 % (m/m) de cloreto de sódio (Cisne) e 1 % (m/m) de

134 sal fundente (Citrato de sódio e polifosfatos - Rica Nata) previamente diluídos em
135 água a 80 °C, conforme orientação do fabricante, seguido de homogeneização
136 por aproximadamente 5 min e resfriamento.

137 As quantidades dos ingredientes empregadas foram ajustadas para
138 obtenção de 11900 g de requeijão cremoso. A massa de requeijão foi dividida
139 em sete partes iguais (1700 g cada). Em frascos individuais foram reservados
140 1000 g para análise sensorial e 700 g para caracterizações físicas e químicas,
141 testes de viabilidade celular e análises microbiológicas.

142 Uma das partes de requeijão (1700 g) foi embalada a quente, em pote
143 plástico de polipropileno devidamente esterilizado, selado com papel filme de
144 PVC (Wyda Pratic), vedado com tampa e armazenado à temperatura de 5 ± 1 °C,
145 o que correspondeu à formulação controle sem probióticos. As demais partes
146 foram resfriadas até atingir a temperatura de 50 °C e as culturas probióticas
147 foram adicionadas individualmente nessas frações de requeijão, de acordo com
148 metodologia descrita por Drunkler (2009), de maneira a conferir uma
149 concentração de células inicial de aproximadamente 10^{10} a 10^{13} UFC.g⁻¹ e
150 tratadas nas mesmas condições da formulação controle sem probióticos.
151 Amostras foram coletadas após 7, 30, 45 e 65 dias para as análises posteriores.

152 2.4. Métodos analíticos

153 2.4.1. Determinação da viabilidade celular

154 Para determinação da população de células viáveis nas amostras de
155 requeijão probiótico foi utilizada a técnica de plaqueamento *pour plate*, conforme
156 descrito por Silva *et al.* (2001). Foi realizada a contagem de colônias e o
157 resultado expresso em unidade formadora de colônia por g (UFC.g⁻¹),
158 considerando-se válidas as placas contendo entre 25 e 250 colônias.

159 2.4.2. Determinação do pH e acidez titulável

160 O pH foi determinado pelo método eletroanalítico (pHmetro digital
161 PG1800 GEHAKA®) no qual 2 g de amostra em temperatura ambiente ($23,0 \pm$
162 $2,0$ °C) foram previamente diluídos em 20 mL de água. A acidez titulável,
163 expressa em porcentagem de ácido lático, foi determinada de acordo com
164 Zenebon *et al.* (2008). A concentração de ácido lático foi determinada por meio
165 da Eq. (A.1).

166 As análises de pH e acidez titulável foram realizadas em duplicatas.

167 2.4.3. Determinação do teor de lipídeos

168 O teor de lipídeos foi determinado utilizando-se o método de Gerber,
169 descrito por Zenebon *et al.* (2008), na qual a determinação de gordura foi
170 realizada utilizando o butirômetro para leite. A porcentagem de lipídeos foi
171 determinada pela Eq. (A.2).

172 2.4.4. Determinação de extrato seco total (EST) e teor de Gordura no Extrato 173 seco (GES)

174 O extrato seco total do requeijão cremoso foi determinado por meio de
175 secagem da amostra em forno micro-ondas (Brastemp mod. BMP 40E SAAB),
176 conforme metodologia descrita por Van Dender *et al.* (2000). A porcentagem de
177 extrato seco foi calculada através da Eq. (A.3).

178 A partir desse cálculo, o teor de gordura no extrato seco do requeijão
179 cremoso foi determinado utilizando-se a Eq. (A.4).

180 2.5. Análises microbiológicas

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

185 2.6. Avaliação sensorial

186 As diferentes formulações de requeijão cremoso foram submetidas a duas
187 etapas de análise sensorial. A primeira etapa de análise (tempo inicial) foi
188 realizada 12 h após a inoculação dos microrganismos probióticos. Foram
189 analisadas seis amostras contendo cada lactobacilo e uma referente à
190 formulação controle sem probióticos. Já a segunda etapa de análise (tempo 65)
191 foi realizada com as mesmas amostras do tempo inicial, porém após 65 dias de
192 armazenamento a 5 °C. As avaliações contaram com a participação de 60
193 provadores de ambos os sexos, não treinados, que receberam 5 g das
194 respectivas amostras codificadas, a temperatura de 15 ± 2 °C acompanhadas de
195 água mineral e biscoito água e sal para limpeza do palato. Os provadores foram

196 instruídos quanto ao procedimento adotado e orientados para utilizarem
197 espátulas de plástico descartáveis para o manuseio das amostras.

198 A avaliação foi realizada utilizando-se uma escala hedônica de 9 pontos
199 (Figura Suplementar 1), de acordo com Zenebon *et al.* (2008) e consistiu da
200 avaliação dos seguintes atributos: impressão global, aroma, cor, sabor e textura.
201 A análise de intenção de compra foi realizada em uma escala de 5 pontos. Os
202 resultados foram avaliados estatisticamente por meio da análise de variância
203 (ANOVA) e teste de Tukey com intervalo de confiança de 95 % empregando-se
204 o software BioEstat 5.0.

205 **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

206 *3.1. Análise da viabilidade celular das bactérias probióticas*

207 Os resultados obtidos neste experimento (Figura A.1) demonstram que as
208 cepas de *L. plantarum* ATCC 8014, *L. delbrueckii* UFV H2B20 e *L. fermentum*
209 ATCC 9338 apresentaram decréscimo equivalente a três ciclos logarítmicos de
210 suas populações. Já as bactérias *L. casei* ATCC 7469, *L. paracasei* SP11 e *L.*
211 *acidophilus* ATCC4356 exibiram decaimento de apenas um ciclo, após 65 dias
212 de armazenamento a 5 °C em requeijão cremoso.

213 Dentre os fatores que podem ser citados como interferentes na
214 sobrevivência de cepas probióticas na matriz alimentícia destacam-se: a
215 qualidade da matéria prima (englobando a presença de resíduos de antibióticos
216 e de pesticidas, pH, teor de lipídeos e de sal), a cepa empregada e condições de
217 armazenamento, como temperatura e nível de oxigenação do meio (Saad *et al.*,
218 2011; Crittenden, 2009).

219 No presente trabalho, o tempo de armazenamento avaliado foi de 65 dias,
220 alcançando a mesma viabilidade celular reportada por Speranza *et al* (2017), em
221 uma formulação de *cream cheese* suplementada com *B. animalis* subsp. *lactis*
222 DSM 10140 e *L. reuteri* DSM 20016. No entanto, estes autores avaliaram sua
223 formulação por um período inferior, equivalente a 28 dias. Este fato destaca o
224 potencial do requeijão cremoso como matriz carreadora de microrganismos,
225 assegurando seu benefício por um tempo superior de prateleira.

226 Resultados inferiores ao do presente estudo foram relatados por Konar *et*
227 *al* (2018) em seu estudo utilizando como matriz chocolate branco sem açúcar,
228 no qual houve inoculação dos probióticos após o processo de fabricação do

229 chocolate. A concentração inicial de células foi de 10^9 UFC.g⁻¹ e, após 60 dias
230 de armazenamento em temperatura ambiente, foi alcançada população
231 equivalente a 10^6 UFC.g⁻¹. Os autores discutem que as principais causas do
232 decaimento da viabilidade celular de *L. paracasei* foram a baixa atividade de
233 água e alta concentração de açúcares na matriz utilizada. De forma similar,
234 Teixeira (2012) em requeijão cremoso contendo *L. acidophilus* e *B. bifidum*,
235 verificou que estas cepas se mantiveram viáveis durante o período de
236 armazenamento de 15 dias a 10 °C. Após esse período houve redução na
237 população de *Lactobacillus* equivalente a dois ciclos logarítmicos, atingindo uma
238 população de $4,0 \times 10^7$ UFC.g⁻¹.

239 Todavia, em uma formulação com viabilidade celular final de 10^7 UFC,
240 seria necessária a ingestão diária de 100 g, a fim de atender a quantidade
241 recomendada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para consumo de
242 produtos probióticos no Brasil (Brasil, 2008). Neste contexto, é válido ressaltar
243 que apenas em 1 g das formulações de requeijão cremoso inoculadas com as
244 cepas de *Lactobacillus* do estudo em questão, foi observada uma população de
245 células viáveis superior a 10^8 UFC.

246 3.2. Análise de pH e acidez titulável das formulações de requeijão cremoso

247 Durante o período de armazenamento por 65 dias a 5 °C, conforme
248 esperado, os valores de pH no requeijão cremoso probiótico ($6,20 \pm 0,10$ a
249 $6,70 \pm 0,13$) apresentaram-se inferiores aos da formulação controle sem
250 probióticos ($6,44 \pm 0,17$ a $6,73 \pm 0,18$). Em relação à variação da acidez titulável
251 (Tabela A.1), verificou-se que o teor de ácido láctico foi superior nas formulações
252 contendo as cepas de *Lactobacillus* (valores entre 0.43 % a 0.30 % após 7 dias
253 de armazenamento a 5 °C, e 0.28 % a 0.24 % após 65 dias) em relação à
254 formulação controle sem probióticos (valores de 0.17 % após 7 dias de
255 armazenamento a 5 °C e 0.12 % após 65 dias). A acidez titulável aumentou
256 durante o armazenamento das formulações, porém em quantidade insuficiente
257 para alterar o pH.

258 Tais observações podem ser decorrentes do método de inoculação das
259 bactérias no requeijão. As culturas foram pré-ativadas em leite reconstituído a
260 10 % a 37 °C por 2 h, o que possivelmente estimulou a atividade metabólica dos

261 lactobacilos, levando à produção de ácidos orgânicos e conseqüentemente ao
262 abaixamento dos valores de pH das formulações.

263 Alguns trabalhos da literatura reportam o efeito de diminuição do pH de
264 formulações probióticas em comparação às formulações controle sem
265 probióticos, ao serem empregadas culturas pré-ativadas (Drunkler, 2009; Lollo
266 *et al.*, 2013). Drunkler (2009) reportou ainda que, após o período de 60 dias de
267 armazenamento a 5 °C, o pH da formulação de requeijão cremoso simbiótico
268 (5,70) não foi alterado significativamente ($p>0.05$) em relação ao tempo inicial
269 (5,90). Este fato também foi observado no presente trabalho após 65 dias de
270 armazenamento, no qual o pH da formulação controle sem probióticos foi
271 $6,51\pm 0,19$ e das formulações probióticas se mantiveram entre $6,41\pm 0,19$ a
272 $6,69\pm 0,15$.

273 3.4. Umidade, Extrato Seco Total e Gordura no Extrato Seco

274 De acordo com os resultados apresentados na Tabela A.2, verificou-se
275 que o teor de gordura no extrato seco e umidade nas formulações estão em
276 conformidade com o padrão mínimo estabelecido no Regulamento Técnico,
277 parte da Portaria nº 359 – MAPA (Brasil, 1997) que determina que o teor de
278 gordura no extrato seco (GES) deve ser superior a 55 % e o teor máximo de
279 Extrato Seco Total (EST) de 65 %.

280 De acordo com os resultados, observou-se que os teores de umidade das
281 formulações contendo as cepas de bactérias lácticas foram superiores em relação
282 à formulação controle sem probióticos. De maneira similar, em um trabalho
283 desenvolvido a partir de queijo Feta (Angelopoulou *et al.*, 2017), os autores
284 observaram aumento de umidade nas amostras contendo os microrganismos
285 probióticos e atribuíram tal fato à possível atividade metabólica das cepas, o que
286 poderia estimular a ocorrência de proteólise. Apesar de o requeijão não ser um
287 produto maturado, conforme resultados anteriormente discutidos, a constatação
288 da variação na acidez titulável aliada às mudanças nos valores de umidade
289 corroboram a possibilidade de produção de metabólitos pelos microrganismos
290 no presente trabalho.

291

292

293 3.5. Análises microbiológicas

294 A caracterização microbiológica das diferentes formulações de requeijão
295 cremoso, após 65 dias de armazenagem a 5 °C, indicou que as referidas
296 formulações estão plenamente em conformidade com os padrões
297 microbiológicos constantes do Regulamento Técnico para Fixação de Identidade
298 e Qualidade de Requeijão abordado na Portaria nº 359 – MAPA (Brasil, 1997).

299 3.6. Perfil sensorial

300 As características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais são
301 fatores relevantes no lançamento de novos produtos alimentícios no mercado.
302 De acordo com Minim (2013), a avaliação sensorial de um alimento revela a
303 satisfação do consumidor, que, por sua vez tem o papel de avaliar os parâmetros
304 de qualidade do produto. Saad *et al.* (2011) salientam que, para alimentos
305 suplementados com culturas probióticas ou ingredientes prebióticos, essa
306 avaliação é imprescindível.

307 Desta forma, as diferentes formulações de requeijão foram submetidas à
308 avaliação sensorial, considerando o tempo inicial (após 12 h de inoculação das
309 bactérias lácticas) e após 65 dias de armazenamento a 5 °C (Tabela A.3).

310 A análise dos quesitos aparência e aroma revelou que não houve
311 diferenças significativas ($p>0.05$) entre as formulações probióticas e a
312 formulação controle sem probióticos nos tempos avaliados. Esta observação
313 indica que as cepas de *Lactobacillus* não interferiram significativamente nestes
314 atributos.

315 Considerando o quesito sabor, observou-se que no tempo inicial, a
316 avaliação das formulações de requeijão cremoso probiótico contendo *L.*
317 *plantarum*, *L. casei* ATCC 7469 e *L. fermentum* ATCC 9338 foram
318 significativamente inferiores ($p<0.01$) em relação à formulação controle sem
319 probióticos. A avaliação do sabor para as demais formulações no tempo inicial,
320 bem como após 65 dias de armazenagem a 5°C, foram estatisticamente iguais
321 ($p>0.05$).

322 No tocante ao atributo manuseio observou-se que houve diferenças
323 significativas ($p<0,01$) entre a formulação probiótica contendo *Lactobacillus*
324 *casei* ATCC 7469 e a formulação controle sem probióticos, sendo esta melhor
325 classificada. A avaliação das demais formulações nos tempos inicial e após 65

326 dias revelou falta de significância nos valores atribuídos para estes quesitos. Os
327 mesmos resultados foram obtidos quanto ao quesito impressão global (Figura
328 A.2), em nível de significância de 5 %.

329 Diferenças nas características físico-químicas devem ser consideradas
330 para justificar as diferenças estatísticas no quesito sabor nas formulações de
331 requeijão cremoso contendo *Lactobacillus casei* ATCC 7469 e *Lactobacillus*
332 *paracasei* SP 11. Verificou-se que essas formulações apresentaram maior teor
333 de umidade, o que possivelmente afetou negativamente o sabor de ambas, bem
334 como o manuseio e impressão global da formulação contendo *Lactobacillus*
335 *casei*. No entanto, ainda que a avaliação de *L. casei* ATCC 7469 no item
336 impressão global tenha diferido estatisticamente das demais, todas as
337 formulações avaliadas foram classificadas como “gostei moderadamente” (nota
338 7,0) e “gostei ligeiramente” (nota 6,0).

339 Os resultados encontrados quanto aos quesitos da análise sensorial estão
340 em conformidade com os obtidos por Speranza *et al.* (2017) que, em seu estudo
341 com adição de probiótico em *cream cheese*, constataram que o microrganismo
342 probiótico juntamente ao ingrediente prebiótico utilizado não afetaram
343 negativamente a aceitabilidade sensorial do produto.

344 A atitude de compra do requeijão cremoso probiótico também foi avaliada
345 por parte dos provadores, em uma escala de notas de 1 a 5 (Figura A.3).
346 Verificou-se que, com exceção da formulação controle sem probióticos, pelo
347 menos 80% dos provadores manifestaram que “provavelmente comprariam esse
348 produto” quando armazenado por 65 dias a 5 °C. Observou-se ainda que a
349 avaliação das formulações no tempo inicial revelou valores das notas de intenção
350 de compra inferiores, com exceção da formulação controle sem probióticos e da
351 formulação contendo *Lactobacillus paracasei* SP11, o que demonstra que a
352 incorporação das respectivas cepas de bactérias interferiu positivamente na
353 qualidade sensorial do requeijão cremoso.

354 **3. CONCLUSÃO**

355 O requeijão cremoso apresentou-se como um veículo adequado para
356 carrear as cepas de microrganismos probióticos analisadas, já que a inoculação
357 desses atendeu às características exigidas nos padrões da legislação brasileira
358 e às especificações internacionais. Além disso, em todos dos casos, foi obtida

359 uma população acima de 10^8 UFCg⁻¹ de células viáveis durante 65 dias a 5 °C.
360 Apenas 1 grama dessas formulações seria suficiente para atender às
361 necessidades diárias de ingestão de produtos com alegação probiótica. A
362 avaliação sensorial das formulações revelou, por meio da análise de intenção de
363 compra, que 80 % dos provadores provavelmente comprariam o produto.

364 4. REFERÊNCIAS

365 Akalin, A. S., Kesenkas, H., Dinkci, N., Unal, G., Ozer, E., Kınık, O. (2018).
366 Enrichment of probiotic ice cream with different dietary fibers: Structural characteristics
367 and culture viability. *J. Dairy Sci*, 101, 37–46.

368 Angelopoulou, A., Alexandraki, V., Georgalaki, M., Anastasiou, R., Manolopoulou,
369 E., Tsakalidou, E., Papadimitriou, K. (2017). Production of probiotic Feta cheese using
370 *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* as adjunct. *International Dairy*
371 *Journal*, 66, 135-139.

372 Bergamini, C.V., Wolf, I.V., Perotti, M.C. (2010). Characterization of biochemical
373 changes during ripening in Argentinean sheep cheeses. *Small Ruminant Research*. Little
374 Rock, 94, 79-89.

375 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa
376 nº 68, de 12 de dezembro de 2006 D. O. U. 14/12/2006. Dispõe dos Métodos Analíticos
377 Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos.
378 <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17472>. Acesso em 16 de maio de 2018.

380 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa
381 Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal.
382 Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Leite e Produtos Lácteos. (1997).
383 Portaria nº 359. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do
384 requeijão cremoso ou requesón. Brasília, DF.
385 [https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-ma-359-de-04-09-](https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-ma-359-de-04-09-1997,675.html)
386 [1997,675.html](https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-ma-359-de-04-09-1997,675.html). Acesso em 07 de maio de 2018.

387 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Comissões
388 e Grupos de Trabalho. Comissão Técnico-científica de Assessoramento em Alimentos
389 Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais
390 e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos.
391 (2008). <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>. Acesso em 08 de maio de 2018.

392 Buriti, F.C.A. Cardarelli, H. R., Filisetti, T. M. C. C., Saad, M. S. I. (2007) Synbiotic
393 potential of fresh cream cheese supplemented ed with inulin and *Lactobacillus paracasei*
394 in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. *Food Chemistry*, 104, 1605-1610.

395 Crittenden, R. (2009). Incorporating probiotics into foods. In Y. K. Lee, & S. Salminen
396 (Eds.). *Handbook of probiotics and prebiotics* (pp. 58–75). Hoboken, NJ: JohnWiley &
397 Sons Inc.

398 De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of
399 lactobacilli. *J. Applied Bact.*, 23, 130-135.

400 Drunkler, D. A., Sene, L., Oliveira, L. F. (2005). Probióticos, prebióticos e simbióticos:
401 alimentos funcionais em ascensão. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*,
402 60, 29-38.

403 Drunkler, D.A. (2009). Produção de requeijão cremoso simbiótico. Tese (Doutorado
404 em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. (Dados não
405 publicados)

406 Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization
407 -FAO/WHO (April, 2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London,
408 Ontario, Canada.

409 International Probiotics Association. The Global Voice of Probiotics. (2017).
410 [http://internationalprobiotics.org/wp-content/uploads/IPA-guidelines-to-qualify-a-](http://internationalprobiotics.org/wp-content/uploads/IPA-guidelines-to-qualify-a-microorganism-as-probiotic-revised-aug-2017.pdf)
411 [microorganism-as-probiotic-revised-aug-2017.pdf](http://internationalprobiotics.org/wp-content/uploads/IPA-guidelines-to-qualify-a-microorganism-as-probiotic-revised-aug-2017.pdf). Acesso em 16 de maio de 2018.

412 Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K.,
413 Skarmoutsou, N., Fakiri, E.M. (2013). Health benefits of probiotics: a review. *ISRN*
414 *Nutrition*, Article ID 481651.

415 Kerry, R. G., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S., Das, G. (2018) Benefaction
416 of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis*, 1-13.

417 Konar ,N., Palabiyikb, I., Tokerc, O. S., Polatd, D. G., Kellecid, B., Pirouziane, H. R.,
418 Akcicekc, A., Sagdicc, O. (2018). Conventional and sugar-free probiotic white chocolate:
419 Effect of inulin DP on various quality properties and viability of probiotics. *Journal of*
420 *Functional Foods*, 43, 206–213.

421 Lima, M. S. F., de Souza, K. M. S., Albuquerque, W. W. C., Teixeira, J. A. C.,
422 Cavalcanti, M. T. H., Porto A. L. F. (2017). *Saccharomyces cerevisiae* from Brazilian
423 kefir-fermented milk: An in vitro evaluation of probiotic properties. *Microbial*
424 *Pathogenesis*, doi: 10.1016/j.micpath.2017.05.010.

425 Lollo, P. C. B., Morato, P. N., Moura, C. S., Almada, C. N., Feliciob, T. L., Esmerino,
426 E. A., Barros, M. E., Farfan, J. A., Sant'Ana, A. S., Raices, R. R. S., Silva, M. C., Cruz,
427 A. G. (2015). Hypertension parameters are attenuated by the continuous consumption
428 of probiotic *Minas* cheese. *Food Research International*, 76, 611–617.

429 Minim, V. P. R. (2013) *Análise Sensorial. Estudos com consumidores (3ª ed.)* Viçosa,
430 Minas Gerais.

431 Probiotics Market by Application (Functional Food & Beverages (Dairy, Non-dairy
432 Beverages, Baked Goods, Meat, Cereal), Dietary Supplements, Animal Feed), Source
433 (Bacteria, Yeast), Form (Dry, Liquid), End User (Human, Animal), and Region - Forecast
434 to 2022. (2017). Report Code: FB 2269. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/probiotic-market-advanced-technologies-and-global-market-69.html>. Acesso
435 em 07 de maio de 2018.

437 Saad, S. M. I., Cruz, A. G., Faria, J. A. F. (2011). Probióticos e Prebióticos em
438 Alimentos: Aspectos Tecnológicos, Legislação e Segurança no Uso. (2th. Ed.) São
439 Paulo: Varela, 23-49.

440 Sanchez, B., Reyes-Gavilán, C. G. L., Margolles, A., Gueimonde, M. (2009).
441 Probiotic Fermented Milks: present and future. *International Journal of Dairy Technology*,
442 62, 1-10.

443 Shah, N.P. (2007) Functional cultures and health benefits. *Int. Dairy J*, 17, 1262-
444 1277.

445 Silva, N.; Junqueira, V. C. A.; Silveira, N. F. A. (2001). Manual de métodos de
446 análise microbiológica de alimentos. (2th ed.) São Paulo: Editora Livraria Varela.

447 Singh, k., Kallali, B., Kumar, A., Thaker, V. (2011). Probiotics: A review. *Asian
448 Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 287-290.

449 Speranza, B., Campaniello, D., Monacis, N., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M.,
450 Corbo, M. R. (2017). Functional cream cheese supplemented with *Bifidobacterium*
451 *animalis* subsp. *Lactis* DSM 10140 and *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 and prebiotics.
452 *Food Microbiology*, doi: 10.1016/j.fm.2017.11.001.

453 Stanton, C., Gardiner, G., Lynch, P. B., Collins, J. K., Fitzgerald, G., Rossa, R. P.
454 (1998). Probiotic Cheese. *Int. Dairy Journal*, 8, 491-496.

455 Stiles, M.E; Holzapfel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current
456 taxonomy. *Int J Food Microbiol*, 36,1-29.

- 457 Teixeira, L.S.B. (2012) Qualidade e viabilidade de requeijão cremoso adicionado
458 de *Lactobacillus Acidophilus* e *Bifidobacterium Bifidum*. *Dissertação (Mestrado em*
459 *Nutrição)*. *Universidade Federal do Pernambuco*. (Dados não publicados)
- 460 Van Dender, A.G.F. *et al.* (2000). Requeijão cremoso e outros queijos fundidos:
461 aspectos de qualidade, processamento, rotulagem, legislação e mercado. Seminário
462 ITAL/TECNOLAT. Campinas. (Caps. 1 e 7).
- 463 Zenebon, O., Pascuet, N. S., Tiglea, P. (2008). Métodos físico-químicos para
464 análise de alimentos. (4th. ed.) Brasília, DF: Ministério da Saúde.

465 $\% \text{ ácido lático} = \frac{V \times f \times 0,9}{m}$ Eq. (A.1)

466

467 Onde:

468 V = volume da solução de hidróxido de sódio 0,1 M gasto na titulação

469 (mL);

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

471 0,9 = fator de correção do ácido lático.

472 m = massa da amostra (g)

473

474

475

476 $\text{Lipídeos } (\% \frac{m}{m}) = \frac{V \times 11,33}{p}$ Eq. (A.2)

477

478 Onde:

479 V = valor lido na escala do butirômetro (mL)

480 11,33 = equivalente em peso a 11 mL de leite

481 p = nº de gramas da amostra (g)

482

483

484

485 $\%EST = \frac{(\text{Peso final da placa} - \text{Peso inicial da placa}) \times 100}{\text{Peso da amostra}}$ Eq. (A.3)

486

487

488

489

490 $GES = \frac{(\% \text{ de gordura})}{\% EST} \times 100$ Eq. (A.4)

491

492

493

494

495 **Tabela A.1** - Valores de acidez titulável e desvio padrão das diferentes
 496 formulações de requeijão probiótico armazenadas por 65 dias a 5 °C.

| Formulações | | | | | | | |
|--------------|--------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Tempo (dias) | Controle sem probióticos | 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 |

497 LP = *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; LC= *Lactobacillus casei* ATCC 7469; LI=
 498 *Lactobacillus paracasei* SP11; LA= *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356; LD=
 499 *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20; LF= *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338.
 500

501 **Tabela A.2** - Características físico-químicas das formulações de requeijão
 502 cremoso probiótico, após 65 dias de armazenagem a 5 °C.

| Formulação | Umidade (%m/m) | EST (%m/m) | GES (%m/m) |
|--|----------------|------------|------------|
| Controle sem probióticos | 60.00 | 40.00 | 67.22 |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 | 62.58 | 37.42 | 65.52 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014 | 62.00 | 38.00 | 63.81 |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> SP11 | 64.15 | 35.85 | 65.52 |
| <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469 | 64.95 | 35.05 | 66.30 |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2B20 | 64.03 | 35.97 | 66.49 |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338 | 63.45 | 36.55 | 65.82 |

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

504

505 **Tabela A.3** - Valores médios das notas dos atributos e impressão global da
 506 avaliação sensorial das diferentes formulações de requeijão probiótico.

| Formulações | | | | | | | | |
|---------------------|---------|----------|-------|-------|------|------|------|-------|
| ATRIBUTOS | TEMPO | CONTROLE | LP | LC | LI | LA | LD | LF |
| APARÊNCIA | INICIAL | 7.75 | 7.61 | 6.98 | 6.95 | 7.43 | 7.11 | 7.58 |
| | 65 DIAS | 7.30 | 7.73 | 7.00 | 7.48 | 7.48 | 7.55 | 7.48 |
| AROMA | INICIAL | 7.16 | 6.73 | 6.65 | 6.58 | 7.60 | 6.71 | 6.85 |
| | 65 DIAS | 7.00 | 6.88 | 6.88 | 6.83 | 6.90 | 6.80 | 6.90 |
| SABOR | INICIAL | 7.73 | 6.20* | 6.53* | 7.11 | 7.18 | 7.20 | 6.28* |
| | 65 DIAS | 7.40 | 7.33 | 7.10 | 7.38 | 7.60 | 7.10 | 7.06 |
| MANUSEIO | INICIAL | 7.18 | 7.18 | 6.09* | 7.31 | 7.35 | 6.54 | 7.68 |
| | 65 DIAS | 7.15 | 7.72 | 6.80 | 6.86 | 7.54 | 7.46 | 7.35 |
| IMPRESSÃO GLOBAL | INICIAL | 7.60 | 6.96 | 6.81* | 7.38 | 7.30 | 7.01 | 7.50 |
| | 65 DIAS | 6.96 | 7.68 | 6.95 | 7.13 | 7.31 | 7.21 | 7.25 |

507 LP = *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; LC= *Lactobacillus casei* ATCC 7469; LI=
 508 *Lactobacillus paracasei* SP11; LA= *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356; LD=
 509 *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20; LF= *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338.

510 *Indicam os tratamentos significativamente diferentes ($p < 0.05$).

511

512 **GRAPHICAL ABSTRACT**



513

514

515 MATERIAL SUPLEMENTAR

516 Figura Suplementar 1 - Modelo de ficha utilizada na avaliação sensorial.

517

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: Código da amostra: _____ ()

| | |
|--|-----------|
| 5- eu certamente compraria este produto | _____ () |
| 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 Livia Carvalho de Souza
Orientador: Prof Drº Ismael Maciel de Mancilha

518