

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

Viviane Livia Carvalho de Souza^{a1}, Ana Maria dos Santos Camargos^a e Sarah de Souza Queiroz^a

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

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

HIGHLIGHTS:

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

ABSTRACT

Alimentos probióticos são produtos que, além de possuírem alto valor nutricional, estimulam atividades fisiológicas e metabólicas no organismo. Dessa forma, os seus benefícios aliados à maior conscientização da população na busca pela reeducação alimentar impulsionam o consumo desta classe de produtos. O requeijão cremoso é um alimento que apresenta uma matriz com características físico-químicas adequadas para sua utilização como potencial carreador de microrganismos. O desenvolvimento das formulações de requeijão probiótico incorporadas com seis cepas de *Lactobacillus*: *L. plantarum* ATCC 8014, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. delbrueckii* UFV H2B20, *L. fermentum* ATCC 9338, *L. casei* ATCC 7469 e *L. paracasei* SP11 foi proposto e revelou resultados promissores. Foi constatado que durante um período de 65 dias de estocagem a 5°C, foi mantida viável uma concentração de células acima de 10^8 UFCg⁻¹, que se encontra dentro do limite estipulado para classificação como alimento funcional. Além disso, o requeijão cremoso probiótico avaliado neste trabalho revelou-se como um produto de boa aceitação global na análise sensorial e com intenção positiva de compra pelos avaliadores.

PALAVRAS CHAVE: Alimentos funcionais, Lactobacilos, Probióticos, Requeijão cremoso, Perfil sensorial.

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. 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.

2.2. Microrganismos e preparo do inóculo

Para o desenvolvimento do requeijão probiótico proposto no presente trabalho foram empregadas seis 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 (Nestlé).

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

2.3. Desenvolvimento do requeijão cremoso probiótico

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

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

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

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

2.4. Métodos analíticos

2.4.1. Determinação da viabilidade celular

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

2.4.2. Determinação do pH e acidez titulável

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

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

2.4.3. Determinação do teor de lipídeos

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

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

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

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

2.5. Análises microbiológicas

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

2.6. Avaliação sensorial

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

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

A avaliação foi realizada utilizando-se uma escala hedônica de 9 pontos (Figura Suplementar 1), de acordo com Zenebon *et al.* (2008) e consistiu da avaliação dos seguintes atributos: impressão global, aroma, cor, sabor e textura. A análise de intenção de compra foi realizada em uma escala de 5 pontos. 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. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise da viabilidade celular das bactérias probióticas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Alguns trabalhos da literatura reportam o efeito de diminuição do pH de formulações probióticas em comparação às formulações controle sem probióticos, ao serem empregadas culturas pré-ativadas (Drunkler, 2009; Lollo *et al.*, 2013). Drunkler (2009) 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). Este fato também foi observado no presente trabalho após 65 dias de armazenamento, no qual o pH da formulação controle sem probióticos foi $6,51\pm0,19$ e das formulações probióticas se mantiveram entre $6,41\pm0,19$ a $6,69\pm0,15$.



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

De acordo com os resultados apresentados na Tabela A.2, verificou-se que o teor de gordura no extrato seco e umidade nas formulações estão em conformidade com o padrão mínimo estabelecido no Regulamento Técnico, 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 %.

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



3.5. Análises microbiológicas

A caracterização microbiológica das diferentes formulações de requeijão cremoso, após 65 dias de armazenagem a 5 °C, indicou 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).

3.6. Perfil sensorial

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 do produto. Saad *et al.* (2011) salientam 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 (após 12 h de inoculação das bactérias láticas) e após 65 dias de armazenamento a 5 °C (Tabela A.3).

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

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

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

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

Diferenças nas características físico-químicas 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. Verificou-se que essas formulações apresentaram maior teor de umidade, o que possivelmente afetou negativamente o sabor de ambas, bem como o manuseio e impressão global da formulação contendo *Lactobacillus casei*. No entanto, ainda que a avaliação de *L. casei* ATCC 7469 no item impressão global tenha diferido estatisticamente das demais, todas as formulações avaliadas foram classificadas como “gostei moderadamente” (nota 7,0) e “gostei ligeiramente” (nota 6,0).

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

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

3. CONCLUSÃO

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

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

4. REFERÊNCIAS

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

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

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

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. <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17472>. Acesso em 16 de maio de 2018.

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. (1997). Portaria nº 359. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do requeijão cremoso ou requesón. Brasília, DF. <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-ma-359-de-04-09-1997,675.html>. Acesso em 07 de maio de 2018.

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. (2008). <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>. Acesso em 08 de maio de 2018.

- Buriti, F.C.A. Cardarelli, H. R., Filisetti, T. M. C. C., Saad, M. S. I. (2007) Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented ed with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. *Food Chemistry*, 104, 1605-1610.
- Crittenden, R. (2009). Incorporating probiotics into foods. In Y. K. Lee, & S. Salminen (Eds.). *Handbook of probiotics and prebiotics* (pp. 58–75). Hoboken, NJ: JohnWiley & Sons Inc.
- De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Applied Bact.*, 23, 130-135.
- Drunkler, D. A., Sene, L., Oliveira, L. F. (2005). Probióticos, prebióticos e simbióticos: alimentos funcionais em ascensão. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 60, 29-38.
- Drunkler, D.A. (2009). Produção de requeijão cremoso simbiótico. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. (Dados não publicados)
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization -FAO/WHO (April, 2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada.
- International Probiotics Association. The Global Voice of Probiotics. (2017). <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.
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., Fakiri, E.M. (2013). Health benefits of probiotics: a review. *ISRN Nutrition*, Article ID 481651.
- Kerry, R. G., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S., Das, G. (2018) Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis*, 1-13.
- Konar ,N., Palabiyikb, I., Tokerc, O. S., Polatd, D. G., Kellecid, B., Pirouziane, H. R., Akcicekc, A., Sagdicc, O. (2018). Conventional and sugar-free probiotic white chocolate: Effect of inulin DP on various quality properties and viability of probiotics. *Journal of Functional Foods*, 43, 206–213.
- Lima, M. S. F., de Souza, K. M. S., Albuquerque, W. W. C., Teixeira, J. A. C., Cavalcanti, M. T. H., Porto A. L. F. (2017). *Saccharomyces cerevisiae* from Brazilian kefir-fermented milk: An in vitro evaluation of probiotic properties. *Microbial Pathogenesis*, doi: 10.1016/j.micpath.2017.05.010.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Stiles, M.E; Holzapfel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current 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.

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

Onde:

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

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

0,9 = fator de correção do ácido láctico.

m = massa da amostra (g)

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

Onde:

V = valor lido na escala do butirômetro (mL)

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

p = nº de gramas da amostra (g)

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

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

Tabela A.1 - Valores de acidez titulável e desvio padrão das diferentes 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

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

Tabela A.2 - Características físico-químicas das formulações de requeijão 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

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

Tabela A.3 - Valores médios das notas dos atributos e impressão global da 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

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

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

512 **GRAPHICAL ABSTRACT**



MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura Suplementar 1 - Modelo de ficha 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 Livia Carvalho de Souza

Orientador: Prof Drº Ismael Maciel de Mancilha