

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

DALYANE LAÍS DA SILVA DANTAS

**DESENVOLVIMENTO DE REQUEIJÃO CREMOSO CAPRINO
SIMBIÓTICO ADICIONADO DE *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* E
INULINA**

JOÃO PESSOA – PB
2017

DALYANE LAÍS DA SILVA DANTAS

**DESENVOLVIMENTO DE REQUEIJÃO CAPRINO SIMBIÓTICO
ADICIONADO DE *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* E INULINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção de título de Mestre na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira.

Co-orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga.

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

D192d Dantas, Dalyane Laís da Silva.

DESENVOLVIMENTO DE REQUEIJÃO CREMOSO CAPRINO SIMBIÓTICO
ADICIONADO DE *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* E
INULINA / Dalyane Laís da Silva Dantas. - João Pessoa,
2019.

90 f.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT/Alimentos.

1. Leite de cabra. 2. Derivados lácteos. 3. Alimentos
funcionais. 4. TGI. I. Título

UFPB/BC

DALYANE LAÍS DA SILVA DANTAS

**DESENVOLVIMENTO DE REQUEIJÃO CAPRINO SIMBIÓTICO ADICIONADO
DE *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* E INULINA**

Dissertação Aprovada em 24/03/2017.

BANCA EXAMINADORA

Maria Elieidy Gomes de Oliveira

Profa. Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira - UAS/CES/UFCG
Presidente da Banca Examinadora
Orientadora

J. Barbosa

Profa. Dra. Juliana Késsia Barbosa Soares – UAS/CES/UFCG
Examinador Interno

Carlos Eduardo V. de Oliveira

Prof. Dr. Carlos Eduardo Vasconcelos de Oliveira – FPB
Examinador Externo

Porque Dele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas.
Glória, pois, a Ele eternamente.
A Deus,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus, pelo seu imenso amor, por ter me capacitado e me dado sabedoria para chegar até aqui, por me sustentar nos momentos mais difíceis, e me fazer forte, mesmo quando fraco, por sonhar sonhos maiores do que os meus, e ter pensamentos e caminhos bem mais altos do que os meus. Tudo é Teu, Pai!

Agradecer a minha família, meu pai Damião Elói e a minha mãe Eliane, que vestiu o jaleco, literalmente, que esteve nesse projeto tão envolvida quanto eu. Obrigada por serem porto seguro, descanso, abrigo, por me proporcionarem uma vida tão cheia de amor, aprendizado e por me ensinar o quanto cada gota de suor é válida, como cada esforço é importante na busca de chegar onde se quer, por acreditarem nos meus sonhos, e por fazerem o possível e o impossível para que eu chegasse até aqui. Agradeço também aos meus irmãos, Thalita e João Marcos, por me apoiarem e estarem sempre comigo.

Agradecer as demais pessoas da minha família que me encorajaram junto ao meu desejo de continuar estudando, que sempre me ajudaram de alguma forma, que torceram e me apoiaram de forma tão amorosa nessa trajetória, obrigada aos meus amados avós Zilda e Ivo por serem um exemplo de vida para mim, a minha avó Carminha, símbolo de força e ao meu amado avô Elói (*in memoriam*) do qual tenho muita saudade. E a todos os meus tios e tias, representados pelos meus tios Isaias, Érica e Maria do Céu (tia neném) agradeço a todos imensamente em nome de vocês! Obrigada a todos os meus primos e primas, sem restrição, pois são muitos, porém amados, que são fonte de alegria e inspiração, aos quais agradeço em nome da minha prima linda e exemplo de pessoa e profissional acadêmica Janaíra, da minha doce Halynne, do meu gentil primo Jean e da minha amada Sophia. Obrigada família!

Gostaria de agradecer imensamente a Edy, meu amor e companheiro, que esteve presente em cada decisão tomada, me apoiou, que me ouviu, me aconselhou, cuidou de mim, e foi peça fundamental na realização desse projeto acadêmico, e é base para o meu maior projeto de vida, a nossa família. Obrigada por me fazer crescer, e ver Deus através do amor, pois todo aquele que permanece no amor, permanece em Deus, e Deus nele. Amo você.

Dentre as boas surpresas que a vida me presenteou, estava você, exemplo de pessoa, profissional, uma amiga, uma orientadora, uma conselheira. Obrigada professora Maria Elieidy Gomes de Oliveira, Ely, por nesse mundo para mim e para muitos, ser sal da terra e luz do mundo ao influenciar todos com seus gestos, palavras e amor. Agradeço também a minha coorientadora, a professora Rita de Cássia Ramos Egypto Queiroga, que incentivou grandemente esta pesquisa e contribuiu de diversas maneiras.

Gostaria de agradecer ao CES/UFMG, pela acolhida durante a realização das análises e em especial a professora Juliana Késsia, por ser um exemplo de sabedoria, generosidade e respeito, por ter aberto as portas do seu laboratório e do seu conhecimento, contribuindo sempre de forma muito rica em todos os meus projetos, e nesse não foi diferente. Agradeço também a todos os funcionários, por todo apoio, atenção e carinho, em nome de Leonardo, Jaciel e Mônica, que sempre estão prontos a ajudar da melhor maneira possível.

“Há amigos, mais chegados que um irmão” Pvb 18:24... é assim que gostaria de agradecer a todos vocês que, apesar da minha ausência para muitos nos últimos anos, torcem por mim, e continuam sendo os mesmos amigos, com quem posso sempre contar, amo vocês... aos antigos e de sempre Fê, Jú, Diego, Priscilla, Barthira e Tiene, aos que a universidade me deu Heloísa, Mikaelle, as novas amigas Márcia, Elaine. E a minha amada turma de mestrado Keliana, Rodrigo, Malana, Fabrícia, Carine, Fabíola, Ana Rita e Leanderson.

Agradeço aos anjos que Deus colocou em minha vida, como auxílio, amizade, respeito, carinho, companheirismo, e que dividiram comigo momentos tão importantes nessa jornada, Érika Martins e Bruno Barbosa, meu muito obrigada a vocês por tudo!!!! E também àquelas pessoas que dividiram de forma alegre e gentil o laboratório, Prof. Heloísa, Aryane e Ana Cristina.

Ao Professor Dr. Carlos Eduardo Vasconcelos de Oliveira, que aceitou contribuir de forma rica para as correções desse trabalho.

À Universidade Federal da Paraíba, em especial ao corpo de professores, a coordenação, agradeço em nome de Lindalva, ao CTDR, e aos técnicos Bosco Amaral e Mércia Galvão, que de forma tão gentil abriram as portas dos laboratórios para compartilharmos conhecimentos, assim como o apoio da professora Marta Madruga, e a todos os colegas de laboratório que de forma tão solícita estiveram sempre prontos a ajudar, a quem em nome da colega Narciza agradeço a todos.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro e concessão da bolsa.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa, o meu muito obrigada.

*Em seu coração,
o homem planeja o seu caminho,
mas o Senhor determina os seus passos.
Provérbios 16:9*

RESUMO

A elaboração de um derivado lácteo caprino, como o requeijão cremoso, adicionado de culturas probióticas e componente prebiótico, pode intensificar a funcionalidade de um alimento e aumentar, desta maneira, o consumo de produtos à base dessa matriz. Objetivou-se elaborar e caracterizar os aspectos tecnológicos, físicos, físico-químicos, microbiológicos e sensoriais, assim como, avaliar *in vitro* o efeito protetor da matriz alimentar e da inulina sobre a sobrevivência do *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* durante a travessia do trato gastrointestinal. Inicialmente foi realizado o estudo da vida de prateleira nos tempos 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado dos requeijões que foram divididos da seguinte forma: RC (requeijão cremoso controle), sem adição de qualquer cultura; RPro, contendo apenas o micro-organismo probiótico *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei*; RPre, adicionado de inulina; RSimb constituído do *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* e do componente prebiótico inulina. Todos os requeijões testados exibiram bons resultados quanto às características tecnológicas, não apresentando sinerese. De um modo geral, as características físico-químicas (umidade, pH, proteínas, acidez total em ácido láctico, açúcares totais) e o índice de proteólise variaram entre os tratamentos empregados para a produção dos requeijões. Não foi identificado o crescimento de bolores e leveduras, como também de coliformes totais e fecais, *Staphylococcus coagulase* positiva, *Salmonella* sp., e *Listeria monocytogenes*. Quanto à viabilidade do probiótico, houve crescimento ($p < 0,05$) apresentando uma viável sobrevivência de acordo com as contagens finais para RPro e RSimb (8,0 e 7,7 log de ufc.g⁻¹ respectivamente). Durante toda a digestão sob as condições simuladas do trato gastrointestinal, foi observada uma redução ($p < 0,05$) do *L. paracasei*. Contudo, ao final do experimento, as amostras apresentaram contagens satisfatórias (6,0 log. ufc.g⁻¹ para RPro e 5,2 log.g⁻¹ para RSimb), indicando o efeito protetor da matriz sob o desenvolvimento do micro-organismo, quanto a inulina não foi comprovado o seu auxílio direto como insumo protetor, mas a presença do componente não delimitou a sobrevivência da estirpe. Portanto, requeijão caprino cremoso pode ser um alimento com potencial funcional importante, seguro e voltado a fomentar a cadeia de produtos à base de leite de cabra, a partir do seu consumo.

Palavras-chave: leite de cabra; derivados lácteos; alimentos funcionais; TGI.

ABSTRACT

The elaboration of a goat dairy derivative, such as cream cheese, added probiotic cultures and prebiotic component, can intensify the functionality of a food and increase, in this way, the consumption of products based on this matrix. The objective was to elaborate and characterize the technological, physical, physico-chemical, microbiological and sensorial aspects, as well as to evaluate in vitro the protective effect of the food matrix and inulin on the survival of *Lactobacillus casei* subsp. *Paracasei* during the passage of the gastrointestinal tract. Initially, the shelf-life study was performed at 1, 7, 14, 21 and 28 days of refrigerated storage of the curdles, which were divided as follows: RC (cream cheese curd), without addition of any culture; RPro, containing only the probiotic microorganism *Lactobacillus casei* subsp. *Paracasei*; RPre, added with inulin; RSimb consisting of *Lactobacillus casei* subsp. *Paracasei* and the prebiotic component inulin. All the curd cheese tested showed good results regarding the technological characteristics, without syneresis. In general, the physical-chemical characteristics (moisture, pH, protein, total acidity in lactic acid, total sugars) and the proteolysis index varied among the treatments used for the production of the curd. The growth of molds and yeasts, as well as of total and fecal coliforms, coagulase positive *Staphylococcus*, *Salmonella* sp., And *Listeria monocytogenes* were not identified. Regarding probiotic viability, there was a growth ($p < 0.05$) presenting a positive viability according to the final counts for RPro and RSimb (8.0 and 7.7 log of ufc.g⁻¹, respectively). At the end of the digestion under simulated conditions of the gastrointestinal tract, a reduction ($p < 0.05$) of *L. paracasei* was observed. However, at the end of the experiment, the samples had satisfactory counts (6.0 log.ufc.g⁻¹ for RPro and 5.2 log.g⁻¹ for RSimb), indicating the positive effect of goat's curd as a protective matrix of the micro Inulin has not been proven to be a protective input, but the presence of the component did not negatively affect the survival of the strain. Creamy goat cheese can be a food with important functional potential, safe and aimed at promoting the goat milk product chain from its consumption.

Keyword: goat milk; Dairy products; Functional foods; TGI.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1 – Valores médios (\pm desvio padrão) das variáveis físico-químicas do leite caprino.....	53
Tabela 2 – Valores médios (\pm desvio padrão) das variáveis físicas e físico-químicas dos requeijões caprinos com potencial funcional durante armazenamento refrigerado.....	54
Tabela 3 - Valores médios (\pm desvio padrão) para os parâmetros de proteólise dos requeijões caprinos durante armazenamento refrigerado.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da adição de substâncias em cada etapa nas amostras que foram submetidas às condições gastrointestinais simuladas..... 32

ARTIGO

Figura 2 - Valores médios de acidez (a), pH (b) e açúcares totais (c) dos requeijões caprinos durante armazenamento..... 58

Figura 3 - Viabilidade do *L. casei* subsp. *paracasei* nos requeijões cremosos caprinos com potencial funcional durante armazenamento refrigerado..... 59

Figura 4 - Número de células viáveis (média \pm desvio padrão) de *Lactobacillus paracasei* no requeijão caprino probiótico (RProb e RSimb) quando expostos e não expostos às condições simuladas do trato gastrointestinal em diferentes tempos de incubação..... 63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Condições de processamento utilizadas em cada etapa de digestão simulada.....	31
ARTIGO	
Quadro 2 - Condições de processamento utilizadas em cada etapa de digestão simulada.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aw	Atividade de água
AOAC	Association of Official Analytical Chemist
ANOVA	Análise de Variância
°C	Graus Celcius
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CES	Centro de Educação e Saúde
CT	Centro de Tecnologia
FAO	Food and Agriculture Organization
G	Gramas
H	Hora
min	Minuto
mL	Mililitro
n°	Número
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
RMF	Resíduo Mineral Fixo
RC	Requeijão controle
RPROB	Requeijão Probiótico
RPREB	Requeijão Prebiótico
RSIMB	Requeijão Simbiótico
rpm	Rotação por minuto
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
TCA	Ácido tricloroacético
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 BENEFÍCIOS DO CONSUMO DE LEITE CAPRINO.....	16
2.2 REQUEIJÃO.....	16
2.3 ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	17
2.3.1 Probióticos	18
2.3.1.1 Gênero <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>paracasei</i>	19
2.3.2 Prebióticos	20
2.3.2.1 Inulina.....	21
2.3.3. Simbióticos	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO E AMOSTRAS.....	22
3.2 CONTROLE DE QUALIDADE DA MATERIA-PRIMA.....	23
3.3 ELABORAÇÃO DOS REQUEIJÕES CREMOSOS CAPRINOS.....	24
3.4 AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO E SINERESE.....	25
3.5 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS.....	25
3.5.1 Avaliação da Textura instrumental	26
3.5.2 Avaliação da cor instrumental	26
3.6 ANÁLISES FÍSICAS E FÍSICO-QUÍMICAS.....	26
3.7 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	26
3.7.1 Avaliação da qualidade sanitária	27
3.7.2 Viabilidade das bactérias lácticas	28
3.8 ANÁLISE SENSORIAL.....	28
3.9 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DO <i>L. casei</i> subsp. <i>paracasei</i> EM CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS.....	30
3.9.1 Inoculação das matrizes dos requeijões	30
3.9.2 Simulação das condições gastrointestinais	30
3.9.3 Análises microbiológicas	32
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
REFERÊNCIAS	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
ARTIGO I	42
5 CONFLITO DE INTERESSE	72
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
APÊNDICES	82
ANEXOS	85

1 INTRODUÇÃO

Durante os últimos tempos, a população mundial tem enfrentado diversas mudanças habituais, como por exemplo, mudanças na economia, no estilo de vida, no conhecimento e, entre estas mudanças, a alimentação apresenta-se dentre as alterações mais intensas ocorridas recentemente. A busca por uma vida saudável, incluindo melhoria nos hábitos alimentares da população, tem demonstrado avanço na prevenção de várias patologias, melhora em quadros clínicos e, primordialmente, tem contribuído para o progresso da ciência e tecnologia de alimentos em várias áreas específicas.

O agronegócio brasileiro vem promovendo o destaque de várias práticas agropecuárias envolvidas com inovações na utilização de novos produtos, como é o caso da caprinocultura, sendo a região Nordeste uma das maiores envolvidas nesta prática, já que retém 94% do rebanho caprino nacional. Estima-se que existe uma representação de 14 milhões de cabras distribuídas em 436 mil estabelecimentos agropecuários do Brasil, estando este em 18º lugar do *ranking* mundial de exportações de produtos caprinos (MAPA, 2015). Muito embora a caprinocultura leiteira apresente-se como uma relevante alternativa socioeconômica, quando comparada a outros países com rebanhos bem menores, como a Turquia e a Nova Zelândia, ainda assim a produção leiteira brasileira mostra-se ainda incipiente (FAO/WHO, 2015; QUEIROGA, 2003).

Segundo a legislação brasileira, o leite de cabra é definido como “produto normal, fresco e integral, obtido da ordenha completa e ininterrupta de animais sadios, bem alimentados, em repouso” (BRASIL, 1999). Possui características específicas e relevantes em relação ao quesito nutricional, como um percentual de gordura menor, que pode ser observado em seus derivados lácteos, como queijos, bebidas lácteas, sorvetes e iogurtes. No Brasil, esta matriz mobiliza uma cadeia de 18 mil produtores (EMBRAPA, 2014).

Devido às mudanças no perfil dos consumidores, que atualmente estão interessados em alimentos que tragam benefícios à saúde através da nutrição, o leite de cabra apresenta-se como uma boa fonte de cálcio, além da alta capacidade de digestibilidade apresentada e do conteúdo de proteínas de alto valor biológico na sua composição (CENACHI, 2012). Porém, o comércio da caprinocultura leiteira enfrenta desafios, como é o caso das dificuldades na aceitação do leite e de seus derivados, seja por fatores que envolvem a sua composição, como particularidades na sua constituição química e de entraves no preço dos produtos em nível de mercado, além da ausência na qualidade destes (durante o beneficiamento e condições de manejo), onde, nem sempre pontos importantes como *marketing* adequado, acondicionamento,

apresentação, entre outros fatores são suficientes para fornecer o sucesso de vendas necessário (MARTINS, 2007; QUEIROGA, 2003).

Vários grupos de pesquisadores têm ressaltado a expressividade do uso de leite de cabra em diferentes produtos lácteos como uma proposta de inovação de insumos alimentares a partir dessa matriz alimentar. A importância da utilização de produtos desta espécie abrange muitas partes do mundo, apesar dos seus desafios que vão desde o início da cadeia produtiva, elaboração de estratégias no beneficiamento da caprinocultura leiteira até os aspectos de novas pesquisas e as novas condições tecnológicas de mercado, a fim de promover alimentos diferenciados que ofereçam benefícios à saúde (RODRIGUEZ et al., 2008; VARGAS et al., 2008; QUEIROGA et al., 2013).

Outra forma de agregar valor aos alimentos é através da inserção de culturas probióticas, que por sua vez colonizam a mucosa intestinal e formam barreira a proliferação de estirpes patogênicas, garantindo a saúde intestinal e o bom funcionamento de outros mecanismos corporais, ligados a saúde do intestino. Seu emprego tecnológico deve estar condicionado à sobrevivência das cepas durante todas as etapas de produção em um alimento, de forma que cheguem ao final da digestão, em contagens que possam promover benefícios através da sua atuação (LAVANDA et al., 2011; SAARELA, 2011). Os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis, que atuam no estímulo a proliferação de estirpes microbianas benéficas a nível intestinal, juntamente com os micro-organismos probióticos, podem atuar de forma positiva, e quando aplicados juntos em um produto, caracterizam-no como um alimento simbiótico, através dos efeitos sinérgicos ocorridos entre estes dois compostos (BURITI et al., 2007; CARDARELLI et al., 2008).

E de acordo com a ascensão da caprinocultura leiteira no Nordeste do Brasil, incluindo o Estado da Paraíba, surge à necessidade de padronização e elaboração de produtos derivados lácteos caprinos que promulguem ao consumidor a padronização e aceitação de novos insumos, como é o caso do requeijão. Diante deste contexto, o presente estudo representa uma possibilidade de aquisição de informações relevantes, no que diz respeito à tecnologia de elaboração de requeijão caprino cremoso funcional, adicionado de cultura láctica com potencial probiótico (*Lactobacillus casei* subsp. *paracasei*) e ingrediente prebiótico (inulina), dando a característica de um alimento simbiótico, verificando-se a influência destes ingredientes sobre as características tecnológicas, físicas, físico-químicas, microbiológicas e sensoriais, bem como avaliar o efeito protetor da matriz alimentar e inulina sobre a cepa adicionada.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 BENEFÍCIOS DO CONSUMO DO LEITE CAPRINO

Dentre as características benéficas que propiciam a indicação de consumo do leite de cabra em relação ao leite de vaca, além da capacidade de maior digestibilidade, está a alternativa de consumo lácteo por portadores de alergia alimentar à ingestão de leite bovino. O leite caprino possui expressiva concentração de ácidos graxos de cadeia curta como o capróico, caprílico e cáprico, além da sua elevada concentração de glóbulos de gordura de menor tamanho, o que possibilita uma rápida absorção da gordura pela mucosa intestinal através do processo de pinocitose, que serão conduzidos diretamente ao sistema circulatório, e surgem como características que diferenciam esse tipo de leite. Tais benefícios podem trazer inovações na elaboração de novos produtos a partir do leite cabra não voltando à produção apenas para comercialização de leite fluido ou em pó como na maioria dos casos, mas propiciando inovações através da inserção desse leite caprino como base de produtos variados (CORREIA et al., 2008; HAENLEIN, 2001; KNIGHTS; GARCIA, 1997).

Outras características como capacidade de melhora na absorção de alguns minerais, regionalidade e importância econômica tornam-se vantajosas quando comparadas ao leite bovino, mesmo este sendo um representante de parcela abrangente no mercado probiótico. (XANTHOPOULOS et al., 2012). A inserção de leite de cabra como base em diversos produtos pode estar voltada aos consumidores interessados na gastronomia *gourmet* envolvendo produtos alimentares com características especiais (BEZERRA et al., 2015). Levando em consideração que estudos realizados com diferentes derivados lácteos caprinos, como por exemplo o requeijão caprino como carreador de micro-organismos probióticos e ingredientes prebióticos são ainda escassos, se faz necessária à realização de estudos que fomentem a produção científica sobre este tema.

2.2 REQUEIJÃO

Os queijos artesanais têm sido mais valorizados por sua raridade e tipicidade, podendo atuar como fator indutor da ampliação da escala de produção de queijos, estimulando o aumento da qualidade desse alimento de forma geral. O seu consumo não obedece à hierarquia social ditada pela renda, indicando um grande potencial de utilização dos queijos

artesanais junto à população, conforme observa estudo realizado em São Paulo (CHALITA, 2012).

Queijos geralmente possuem um pH mais aumentado, maior teor de gordura e elevada capacidade de tamponamento, além da consistência mais firme do que muitos produtos fermentados frescos, a exemplo do iogurte. Tais características promovem a este tipo de produto uma maior manutenção das bactérias no trato gastrointestinal. Estudos têm sido realizados com a inserção de componentes probióticos para queijos como os tipos gouda, queijo caprino, fresco de pasta mole, cheddar e queijo cottage (ABADÍA-GARCÍA, 2013).

A legislação brasileira, através da Portaria nº 359, de 04 de setembro de 1997, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, define requeijão como “o produto obtido pela fusão da massa coalhada, cozida ou não, dessorada e lavada, obtida por coagulação ácida e/ou enzimática do leite, opcionalmente adicionada de creme de leite e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite ou *butteroil*. O produto poderá ser adicionado de condimentos, especiarias e/ou outras substâncias alimentícias” (BRASIL, 1997).

O requeijão, queijo tipicamente brasileiro, surgiu como forma de aproveitamento do leite coagulado devido à ação da microbiota láctica natural do leite. É fabricado a partir do leite desnatado cru ou pasteurizado, com ou sem adição de culturas lácticas. Assim, pequenas fábricas semi-artesanais, que dispunham de desnatadeira, separavam o creme, e o leite desnatado resultante era disposto para coagular espontaneamente com o intuito de obtenção da massa, depois transformada em requeijão (VAN DENDER, 2006). O requeijão cremoso é comumente depositado em pães, torradas e biscoitos, enquanto o requeijão em barra ou culinário destina-se aos mais diversos tipos de pratos, como pizzas, pastéis, esfihas, massas, pão de queijo, pão de batata. Este produto também é geralmente utilizado por redes de fast-food, restaurantes, cozinhas industriais, indústrias de alimentos congelados e semiprontos (GOMES; PENNA 2010).

Araújo et al. (2010), identificaram um perfil adequado para incorporação de células probióticas e prebióticas em requeijão, demonstrando-o como uma alternativa saudável em virtude do seu baixo teor de gordura.

2.3 ALIMENTOS FUNCIONAIS

No campo da indústria de alimentos existe uma intensa atividade tecnológica, com a utilização de novos insumos e/ou ingredientes com valor agregado para atender aos anseios dos consumidores a partir das mudanças nas escolhas da população, onde, os produtos que

evidenciam essa atividade são destacados como alimentos funcionais. Trata-se de um mercado emergente que surge com a proposta de oferecer alimentos que tragam benefícios à saúde do consumidor, ou seja, uma relação direta entre saúde e dieta, tornando-se um fenômeno mundial, que na maioria das vezes é traçado por uma demanda de normas e padrões que regulam a qualidade de elaboração destes produtos, incluindo o tipo de comércio, rotulagem e propaganda (GIANEZINI et al., 2012; BASU et al., 2007). Dentre os alimentos que têm se destacado dentro do mercado de funcionais, estão os probióticos caracterizados por serem organismos vivos que colonizam o intestino com capacidade de gerar benefícios à saúde humana através de vários mecanismos. Os prebióticos que são componentes alimentares não digeríveis, que possuem atividades bifidogênicas, sendo capazes de estimular o crescimento e/ou atividades de algumas bactérias intestinais benéficas, promovendo vantagens ao hospedeiro (GIBSON; ROBERFROID, 1995; NOMOTO, 2005).

Os derivados lácteos geralmente estão envolvidos na promoção de benefícios a saúde propiciada por alguma funcionalidade, sendo conhecidos por serem boas fontes de cálcio e agirem no combate a certas patologias, a exemplo da osteoporose, além de conter nutrientes importantes como vitaminas, minerais e carboidratos. A incorporação de micro-organismos probióticos e de prebióticos como insumos dietéticos acabam por reforçar as características funcionais de produtos lácteos, propiciando um aumento no seu consumo e ressalve as suas características sensoriais (ANTUNES et al., 2007). Outra justificativa para a inserção de estirpes benéficas em produtos à base de leite ocorre devido a sua capacidade de matriz protetora a viabilidade das cepas oferecida através da composição deste alimento, como é o caso das proteínas, gorduras ou fibras, e também por possuírem boa aceitação entre os consumidores (SAARELA, 2011; GRASSO et al., 2014).

2.3.1 Probióticos

A FAO/WHO define os probióticos como micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas afetam positivamente a saúde do hospedeiro. Devem ser inócuos, não patogênicos, manter-se viáveis após processamento tecnológico, ter vida de prateleira longa, apresentar resistência ao pH baixo do suco gástrico e à ação das secreções pancreáticas e biliares, além de possuírem a capacidade de colonizar o cólon (FAO 2001; BERGONZELLI, 2005; LAVANDA et al., 2011). A adesão dos probióticos a mucosa intestinal depende da hidrofobicidade e da composição da parede celular, como também da existência de receptores e ligantes como as adesinas e elementos de fixação que impedem sua

eliminação pelo peristaltismo intestinal, impedindo sua excreção pelas fezes (BARBOSA et al., 2005). Devido a essas características, os probióticos colonizam a mucosa intestinal, diminuindo o pH e dificultando a proliferação de bactérias patogênicas, tais achados puderam ser demonstrados a partir de algumas pesquisas que observaram o efeito de acidificação, favorecendo a absorção de minerais como o cálcio e o ferro, fortalecendo a composição óssea (LAVANDA et al., 2011).

O emprego tecnológico de probióticos está condicionado à sobrevivência destes microrganismos durante as etapas de produção, vida útil e passagem pelo trato digestório, bem como à manutenção das qualidades sensoriais do produto. Estas características estão correlacionadas com procedimentos que devem ser adotados, tais como seleção correta da cepa a ser utilizada, a forma e o momento de adição e a temperatura de produção. Atualmente, estudos já demonstram o efeito protetor que alguns queijos caprinos como queijo coalho exercem sobre algumas cepas de micro-organismos probióticos. Processamento, condições de armazenamento, além do período de vida de prateleira de produtos lácteos fermentados variam significativamente de acordo com estes fatores, onde, cada um deles possui um impacto sobre a estabilidade e viabilidade das estirpes probióticas inseridas no produto (OLIVEIRA et al., 2014; SAARELA, 2011). Dentre os tipos de micro-organismos probióticos mais utilizados estão os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, devido a boa funcionalidade apresentada no trato gastrointestinal humano, garantindo efeitos benéficos que vão além do equilíbrio da mucosa (RANADHEERA et al., 2012; SILVA, 2013).

2.3.1.1 *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei*

O grupo *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* tem grande valor comercial devido à vasta diversidade de alimentos aos quais podem ser introduzidos, conferindo aroma, sabor, textura e ainda auxiliando na bioconservação dos alimentos pelo processo de acidificação (BURITTI, SAAD 2007). As cepas de *Lactobacillus paracasei* têm sido estudadas com relação as suas propriedades de ações promotoras à saúde, a nível intestinal, como fortalecimento e equilíbrio da mucosa e barreira a atuação de micro-organismos patogênicos sendo empregadas como probióticos em alimentos lácteos (CARDARELLI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2014).

Além dos benefícios gastrointestinais, estudos experimentais demonstraram os efeitos positivos do *Lactobacillus paracasei* contra *Staphylococcus aureus* coagulase positiva,

podendo atuar na prevenção de diarreias ou de outros transtornos causados por esses agentes mediadores de infecções gastrointestinais (BENDALI et al., 2011).

Já em relação à utilização dessas estirpes em matrizes alimentares, esta pode ser observada em vários tipos de derivados lácteos como os queijos, iogurtes e leites fermentados. Estudos demonstraram a utilização dos *L. paracasei* em uma espécie de queijo de ovelhas, amadurecido e duro, denominado como Manchego a fim de promover a diminuição na produção de aminas biogênicas, geralmente responsáveis por causarem sabor e odor desagradáveis nas características organolépticas desse tipo de matriz alimentar (PROVEDA et al., 2015).

Achilleos et al. (2013) descreveram o *Lactobacillus paracasei* como uma das principais bactérias que amadurecem no interior dos queijos, onde, utilizaram tais estirpes em um estudo contendo tipos de queijo moles e duros. Outra funcionalidade atribuída a esta cultura foi no aumento da produção de ácidos carboxílicos a partir de aminoácidos, melhorando a formação do sabor dos queijos (STEELE et al., 2013). Na elaboração de queijo tipo cheddar esta e outras culturas são responsáveis por inúmeras alterações bioquímicas durante o amadurecimento e, por conseguinte influência na textura e sabor desenvolvidos ao final desde produto (DESFOSSÉS-FOUCAULT et al., 2014).

2.3.2 Prebióticos

Os prebióticos, por sua vez, são componentes alimentares não digeríveis que podem alcançar o cólon essencialmente intacto, onde irão estimular a proliferação e a atividade de bactérias desejáveis (MATTLA-SANDHOLM et al., 2002). Os fruto-oligossacáridos (FOS) e inulina estão entre os componentes prebióticos mais utilizados na formulação de alimentos simbióticos, com intuito de favorecer os efeitos sinérgicos dos dois compostos, a partir da melhoria da colonização do probiótico ou efeito metabólico (BURITI et al., 2007; CARDARELLI et al., 2008).

Para que haja a classificação de um substrato dietético como um prebiótico, este deve estar de acordo com ao menos três critérios, como: o substrato não deve ser hidrolisado ou absorvido no estômago ou intestino delgado; deve ser seletivo para bactérias comensais benéficas no cólon, tais como bifidobacteria; indução de efeitos sistêmicos/luminais para o hospedeiro através da fermentação do substrato (MANNING; GIBSON, 2004; DRUNKLER, 2009).

2.3.2.1 Inulina

A produção deste carboidrato não digerível deu-se por volta dos anos 1990 na Bélgica e nos Países Baixos, aumentando desde então. Geralmente é empregado em número crescente na indústria de alimentos, sendo comumente encontrada em produtos lácteos e de panificação, bebidas, barras de cereais, sorvetes e em produtos de confeitaria. A inulina também é utilizada em aplicações não alimentares, como é o caso do uso em comprimidos, no tratamento de águas residuais e na alimentação animal (EISSENS; BOLHUIS; HINRICHS & FRIJLINK, 2002; EUVRAD; SORBIE, 2009). Sua importância também é observada através do seu efeito positivo sobre alterações na composição específica da microbiota do cólon por parte deste componente, dispondo ao hospedeiro, efeitos benéficos à sua colonização, o chamado efeito bifidogênico (ROBERFROID, 2005; BRIGHENTI, 2007). Seus efeitos benéficos fisiológicos variam desde a melhoria de hábitos intestinais (MARTEAU et al., 2011), aumento da absorção de cálcio até redução de lipídeos séricos e efeitos positivos em razão da saciedade alimentar. Christie; Cole (2001) avaliaram o efeito potencial da inulina ao aumento da resistência a infecções (MEYER et al., 2011).

Dentre as funções tecnológicas, a adição de inulina em produtos lácteos promove mudanças nas propriedades sensoriais de textura, de derretimento de iogurtes e queijos com baixo teor de gordura (KOCA; METIN, 2004; CARDARELLI et al. 2008; TÁRREGA; COSTELL, 2006; MUSSATO; MANCILHA, 2007). A inulina pode ainda conferir cremosidade e capacidade de gelatinização, sem comprometer o sabor ou a textura, principalmente de produtos similares à manteiga, cream cheese e queijos processados (FRANCK, 2002).

Ainda dentre as inúmeras características funcionais e tecnológicas da inulina, a sua possível capacidade de substituição parcial de gordura em produtos lácteos é apresentada como um de seus potenciais de utilização na indústria alimentícia (ARANGO et al., 2015). Quando associada a estirpes probióticas, podem potencializar os atributos funcionais de um alimento, sendo caracterizados como simbióticos.

2.3.3 Simbióticos

Um alimento simbiótico deve conter tanto micro-organismos probióticos como ingredientes prebióticos. Atualmente, a definição de simbiótico inclui duas abordagens: complementariedade e sinergia. Nos produtos simbióticos complementares, o probiótico é

escolhido com base nos efeitos benéficos sobre o hospedeiro, independentemente do prebiótico escolhido, para aumentar seletivamente a concentração de micro-organismos benéficos já presentes no trato gastrointestinal. Já os sinérgicos, o prebiótico, é escolhido especificamente para estimular a multiplicação e a atividade do probiótico selecionado para adição do produto, contribuindo assim para sua sobrevivência no trato gastrointestinal (SU; HENRIKSON; MITCHELL, 2007; KOLIDA; GIBSON 2011).

Algumas pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de verificar a viabilidade de derivados lácteos simbióticos. Aragon-Alegro et al. (2007) verificaram que o mousse de chocolate pode atuar como carreador de micro-organismo probiótico (*Lactobacillus paracasei*) e ingrediente prebiótico (inulina). Buriti et al. (2007) avaliaram a viabilidade de inulina em queijo fresco cremoso adicionado de *Lactobacillus paracasei* em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* e constataram a potencialidade deste produto como simbiótico, devido ao fato de que a inulina se manteve inalterada e nas concentrações necessárias para efeito prebiótico, assim como o micro-organismo probiótico. Cardarelli et al. (2008) verificaram a potencialidade do queijo *Petit Suisse* como carreador de micro-organismos probióticos e agentes prebióticos. O leite caprino tem demonstrado o seu bom potencial, em relação a elaboração de produtos com a inserção de estirpes, com intuito de promover benefícios a saúde (SILVEIRA et al., 2015).

Apesar de se encontrar na literatura diversos trabalhos que envolvam a utilização de culturas probióticas e componentes prebióticos em derivados lácteos, como matriz simbiótica, o mercado lácteo ainda necessita da elaboração de produtos caprinos, de caráter inovador e que promovam alguma funcionalidade aos consumidores. Além disto, não existem informações significativas entre as pesquisas, para a elaboração de um requeijão cremoso caprino simbiótico, através da adição de *L. casei* subsp. *paracasei* e inulina, e seu efeito protetor da matriz sob a viabilidade da cultura inserida, bem como os efeitos da cultura láctea probiótica nas características tecnológicas, físicas, físico-químicas, microbiológicas e sensoriais dos requeijões.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO E AMOSTRAS

Os experimentos foram conduzidos na Universidade Federal de Campina Grande, *campus* de Cuité e na Universidade Federal da Paraíba, *campus* I. A elaboração do requeijão

cremoso caprino foi executada no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA/CES/UFCG). O desnate do leite para obtenção da nata foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Carnes e Pescados, do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional (CTDR/UFPB). As análises físicas e físico-químicas do produto foram realizadas no Laboratório de Bromatologia (LABROM/CES/UFCG). As análises microbiológicas e teste *in vitro* da viabilidade probiótica dos requeijões frente às condições simuladas do trato gastrointestinal foram executadas no Laboratório de Microbiologia dos Alimentos (LABMA/CES/UFCG). As análises de qualidade tecnológica foram realizadas no Laboratório de Bromatologia (LB/UFPB) e as análises sensoriais foram realizadas no Laboratório de Análise Sensorial de Alimentos (LASA/CES/UFCG).

O leite de cabra pasteurizado (65°C/30min) foi adquirido de raças nativas, pertencentes à Cooperativa de pequenos produtores da cidade de Nova Floresta-PB. Após obtenção, parte do leite foi submetido ao processo de desnate em máquina padronizadora, para obtenção da nata, a qual foi utilizada no processamento dos requeijões. O ácido láctico, o cloreto de cálcio, o coalho e a cultura probiótica, composta pelo micro-organismo *L. casei* subsp. *paracasei* (*L. casei* 01) utilizados na produção dos requeijões foram disponibilizados pela empresa Christian Hansen® (Valinhos, Minas Gerais, Brasil). O prebiótico Inulina (Orafti® inulin) foi obtido da empresa BENEIO Orafti (Tienem, Bélgica). Os demais ingredientes necessários para elaboração dos requeijões cremosos caprinos foram obtidos em redes de supermercados e lojas especializadas das cidades de Cuité/PB e João Pessoa/PB.

3.2 CONTROLE DE QUALIDADE DA MATÉRIA-PRIMA

O leite caprino utilizado na elaboração dos iogurtes foi submetido à determinação dos parâmetros de acidez em ácido láctico, pH, extrato seco total, proteínas, gordura, lactose e resíduo mineral fixo, conforme metodologia recomendada pela *Association of Official Analytical Chemist Methods* (AOAC, 2012). A determinação dos parâmetros microbiológicos seguiu as metodologias recomendadas pela *American Public Health Association* (APHA, 2001), em que a matéria prima foi submetida à determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais (NMP/g) e termololerantes (NMP/g), contagem de bolores e leveduras expressa em UFC/g, e contagem total de bactérias aeróbias mesófilas (Unidades Formadoras de Colônias por g - UFC/g).

3.3 ELABORAÇÃO DOS REQUEIJÕES CREMOSOS CAPRINOS

A partir de estudos prévios e segundo a legislação (MERCOSUL N° 134/96), para queijos fundidos, o requeijão foi elaborado em triplicata conforme metodologia descrita a seguir. Para o estudo, foram processados quatro tipos de requeijões cremosos caprinos, a citar: RC (requeijão controle, sem adição do micro-organismo probiótico e de inulina), RPro (Requeijão probiótico, adicionado apenas de *L. casei* subsp. *paracasei*), RPre (Requeijão prebiótico, adicionado unicamente de inulina) e RSimb (Requeijão simbiótico, adicionado de *L. casei* subsp. *paracasei* e da inulina).

Inicialmente, o leite já pasteurizado foi submetido a um tratamento térmico de 90°C/10 min e, em seguida, resfriou-se a 45 ±1°C. Posteriormente, adicionou o ácido láctico (85%) na proporção de 0,55% (diluído previamente na proporção de 1:10 v/v), sendo homogeneizado por 10 a 15 min. Em seguida, foram adicionados a solução de cloreto de cálcio a 50% (0,5mL/L), com a finalidade de repor o cálcio perdido durante o processo de pasteurização, e o coalho líquido (0,9mL/L), diluído na mesma quantidade de água mineral. O leite homogeneizado foi mantido a uma temperatura de 45 ±1°C até a completa coagulação da massa (aproximadamente, 40 minutos). Após verificação do ponto de corte, o coágulo formado foi cortado no sentido vertical e horizontal, com auxílio de uma lira, e em seguida se homogeneizou por cerca de 20 a 40 min. A seguir, a massa foi dessorada e submetida à lavagem com água aquecida a 45 ±1°C (três vezes) e leite caprino desnatado (uma vez), em proporção ao volume de soro anteriormente drenado. A massa foi pesada e a ela se adicionou a nata caprina (40%), sal fundente (1,9%) e 10% do peso da massa, de leite caprino desnatado. A massa com a mistura dos ingredientes foi fundida em alta rotação com um mixer multiprocessador por 30-60 segundos; seguidamente, submeteu-se a uma rotação mais baixa até atingir 95 ±1°C e, posteriormente, a uma alta rotação por mais 30 segundos. Após isso, foram adicionados mais 10% do peso da massa inicial de leite caprino desnatado, sob uma rotação baixa, até atingir 95 ±1°C. Por fim, o ponto final do requeijão foi observado com base na sua consistência e formação de filamentos compridos ao se agitar com espátula estéril. O produto foi acondicionado em embalagens de plástico sob temperatura de refrigeração (4 ±1°C) até o momento das análises, que foram feitas em triplicata.

Requeijão prebiótico

A elaboração do requeijão prebiótico seguiu o mesmo processamento do requeijão controle, diferenciando-se pela adição do ingrediente prebiótico (inulina), feita no momento de fusão da massa, na concentração de 6%.

Requeijão probiótico

A elaboração do requeijão probiótico seguiu o mesmo processamento do requeijão controle, diferenciando-se apenas pela adição do componente probiótico (*L. casei* subsp. *paracasei*), realizada após etapa de fusão na massa, em que a mesma foi resfriada para uma temperatura de $45 \pm 1^\circ\text{C}$ com posterior adição do micro-organismo numa proporção de 0,01%.

Requeijão Simbiótico

A elaboração do requeijão simbiótico também adotou o mesmo processamento do requeijão controle, diferenciando-se pela adição do componente probiótico (*L. casei* subsp. *paracasei*) e ingrediente prebiótico (inulina) conforme descrito anteriormente.

3.4 AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO E SINERESE DOS REQUEIJÕES

Após o processamento, o rendimento de cada lote de requeijão foi expresso (em g de requeijão/10 L de leite) como peso de requeijão fresco em gramas obtido a partir de 10L de leite utilizado. A sinerese (em g/100 g) foi calculada como o peso de soro de leite liberado por cada grama de requeijão em sua própria embalagem após o armazenamento em diferentes tempos de armazenamento refrigerado (1, 7, 14, 21 e 28 dias) dividido pelo peso do requeijão em gramas da mesma embalagem e multiplicado por 100 (BURITI et al., 2005). O cálculo destes parâmetros foi feito com base nas fórmulas descritas abaixo:

$$\checkmark \text{ Rendimento} = \frac{\text{Peso em gramas de requeijão produzido}}{10 \text{ L de leite utilizado}} \quad \text{Eq. 1}$$

$$\checkmark \text{ Sinerese} = \frac{\text{Peso em gramas de soro}}{\text{Peso em gramas do requeijão}} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

3.5 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS

A avaliação das propriedades tecnológicas dos requeijões produzidos foi feita baseada nos testes de textura instrumental e cor instrumental, nos tempos 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado ($4 \pm 1^\circ\text{C}$). A realização destas análises compreendeu as metodologias a seguir.

3.5.1 Avaliação da textura instrumental

A textura instrumental dos requeijões foi determinada, em triplicata, através de teste de dupla compressão, em texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems, Haslemere, Reino Unido). Os dados foram coletados através do programa *Texture Expert for Windows* – versão 1.20 (Stable Micro Systems). Foram analisados os atributos primários firmeza, coesividade, adesividade e elasticidade e o atributo secundário gomosidade e resiliência.

3.5.2 Avaliação da cor instrumental

A determinação da cor instrumental foi feita em colorímetro Minolta, modelo CR300, utilizando o sistema CIELAB (CIE, 1996). No espaço colorimétrico CIELAB, definido por L^* , a^* , b^* , a coordenada L^* corresponde à luminosidade, a^* e b^* referem-se às coordenadas de cromaticidade verde (-)/vermelho(+) e azul(-)/amarelo(+), respectivamente. As medições foram realizadas em triplicata com o aparelho previamente calibrado.

3.6 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E FÍSICO-QUÍMICAS

Após elaboração dos diferentes tipos de requeijão, estes foram submetidos às análises de determinação de pH, acidez total titulável em ácido láctico, umidade, extrato seco total (EST), cinzas, cloreto de sódio (NaCl) pelo método de Mohr, lipídios, lactose, proteína bruta e índice proteolítico, de acordo com a metodologia de AOAC (2005); a atividade de água foi determinada conforme descrição de uso do manual Aqualab (AQUALAB, 2001). Estas análises foram realizadas em triplicata nos tempos 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado ($4 \pm 1^\circ\text{C}$).

3.7 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises microbiológicas das amostras de requeijão dos diferentes tratamentos nos tempos 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado ($4 \pm 1^\circ\text{C}$), consistiram na avaliação da qualidade sanitária de processamento e avaliação da viabilidade da bactéria láctica

probiótica adicionada, segundo metodologia preconizada por (APHA, 2001). Para tal, inicialmente em cada intervalo, as amostras de requeijão foram diluídas (1:9 p/v) em água peptonada 0,1% estéril (diluição 10^{-1}), seguindo-se o processo de diluição seriada até a obtenção da diluição 10^{-7} .

3.7.1 Avaliação da qualidade sanitária

✓ *Contagem de coliformes totais e fecais*: Obtida através da técnica de tubos múltiplos, onde 1mL de cada diluição seriada foi inoculada em Caldo Lactosado com Bile e Verde Brilhante (CLBVB) e caldo EC incubados a 37°C/48 horas e 44,5°C/24 horas, respectivamente. Os resultados foram expressos em Número Mais Provável de coliformes fecais ou totais por grama da amostra (NMP/g).

✓ *Contagem de Staphylococcus coagulase positiva*: Foi realizada através da técnica de plaqueamento em superfície, utilizando-se como inóculo 0,1mL das diluições decimais e como meio de contagem o Ágar Baird-Parker adicionado de telurito de potássio a 1% e emulsão de gema de ovo e incubado a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por um período de 48 horas. Nesta análise, após o período de incubação, obtém-se a contagem do número de colônias típicas. São consideradas como colônias típicas àquelas que apresentaram as seguintes características: circulares, pretas, pequenas, lisas, convexas, com bordas perfeitas, rodeadas por uma zona opaca e/ou halo transparente. No caso de colônias típicas, estas são isoladas em Ágar Nutriente inclinado (incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas), onde, em seguida puderam ser submetidas ao teste de coagulase.

✓ *Detecção de Salmonella sp.*: A análise foi inicialmente realizada através de uma etapa de pré-enriquecimento da amostra utilizando-se Caldo Lactosado, seguido por uma etapa de enriquecimento seletivo utilizando-se Caldo Tetrionato e Caldo Selenito Cistina. Seguida do plaqueamento de alíquotas dos caldos de enriquecimento seletivo em Ágar Bismuto Sulfito e Ágar Entérico de Hektoen. As colônias com característica típicas (colônias presuntivas) de *Salmonella* foram isoladas em Ágar Nutriente, sendo finalmente realizados os testes bioquímicos confirmatórios.

✓ *Detecção de Listeria monocytogenes*: A detecção de presença ou ausência de *Listeria* foi realizada, previamente, por uma etapa de enriquecimento seletivo utilizando-se o Caldo de

Enriquecimento para *Listeria*. Após essa etapa se realizou o plaqueamento seletivo em Ágar Oxford (AO), Ágar Palcam (AP) e Ágar Triptose com Ácido Nalidíxico (ATN). A confirmação bioquímica de *Listeria* sp. foi realizada por meio da verificação da produção de catalase, observação das características morfológicas e tintoriais, verificação do crescimento típico em meio semissólido e, adicionalmente, por meio da verificação da incapacidade de redução de nitrato e verificação da positividade nas reações de Vermelho de Metila e Voges Proskauer (VM-VP). A diferenciação das espécies de *Listeria* sp. foi obtida por meio da verificação da produção de α -hemólise em Ágar Sangue de Cobaia ou Ágar Sangue de Carneiro, verificação da capacidade de produzir reação de CAMP positiva com *S. aureus* (e opcionalmente também com *Rodococcus equi*), e verificação da capacidade de fermentação dos carboidratos ramnose, xilose e manitol.

3.7.2 Viabilidade das bactérias lácticas

A viabilidade das bactérias lácticas consistiu no monitoramento das contagens de *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* nos requeijões adicionados desta cultura (Rpro e RSimb). Para tanto, transferiu-se alíquotas de 0,1mL de cada diluição das amostras para placas contendo ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS), e posteriormente incubou-se a 37 \pm 1°C por 48 horas, sob anaerobiose (BD GasPak™ EZ Anaerobe container system, Becton, Dickinson and Company, USA). Após o término do período de incubação, realizou-se a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC), sendo os resultados expressos em log de UFC/g.

3.8 ANÁLISE SENSORIAL

Após a submissão do projeto ao Comitê de Ética em Pesquisa do CCS/UFPB e obtenção da sua aprovação (Protocolo 111.523/2012, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP) (Anexo A), a avaliação sensorial dos requeijões se realizou nos tempos 1, 14 e 28 dias após a sua fabricação. Antes das análises sensoriais os requeijões foram submetidos às análises microbiológicas para garantir a qualidade higiênico-sanitária, verificando se os requeijões estavam dentro dos padrões recomendados pela legislação vigente (BRASIL, 1997).

Posteriormente, se realizaram os testes de aceitabilidade e preferência relativa entre as amostras, segundo Faria e Yotsuyanagi (2002). No teste de aceitabilidade se empregaram os critérios estabelecidos por Amerine, Pangborn e Roessler (1967). Para tanto, mediante um

questionário de identificação dos provadores (Anexo B) um painel não treinado constituído por 100 provadores (alunos, professores e funcionários do CES/UFCG) foram selecionados com base nos hábitos e interesse em consumir requeijão, sendo constituídos tanto pelo gênero feminino quanto masculino, com faixa etária variando entre 18 a 45 anos de idade, não apresentando nenhum problema de saúde ou deficiência física que viesse a comprometer a avaliação sensorial dos produtos, especificamente relacionado a três dos sentidos humano: olfato, paladar e visão. Estes provadores assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice C), aceitando participar da pesquisa e analisar as amostras de requeijão de acordo com o *Institut of Food Technologist* (IFT, 1981).

Na avaliação da aceitação sensorial foram avaliados os atributos aparência, cor, aroma, sabor, textura e aceitação global. Os provadores atribuíram valores às amostras, numa escala hedônica estruturada com nove pontos (1 = desgostei muitíssimo; 5 = nem gostei/nem desgostei; 9 = gostei muitíssimo). Os formulários destinados a este teste continham campos que possibilitaram aos provadores anotar descrições que julgassem importantes (Apêndice A). Os requeijões foram considerados aceitos quando obtiveram média = 5,0 (equivalente ao termo hedônico “gostei moderadamente”) (LIMA et al., 2010).

A preferência relativa entre as amostras de requeijão foi conduzida segundo delineamento de ordenação em blocos casualizados com os 100 provadores não treinados, empregando-se o teste de ordenação preferência, com notas que variaram de 1 (“amostra mais preferida”) a 4 (“amostra menos preferida”) (Apêndice B). Com a finalidade de se obter maiores informações sobre as características sensoriais de cada requeijão, os provadores relataram os atributos sensoriais que contribuíram para a escolha das amostras “mais preferidas” e “menos preferidas”.

Paralelamente, também se avaliou a intenção de compra. Para tanto, foi empregado uma escala hedônica estruturada com cinco pontos (1 = jamais compraria; 3 = talvez comprasse/talvez não comprasse; 5 = compraria), conforme formulário em Apêndice A.

Em ambos os testes, as amostras foram padronizadas e servidas, simultaneamente, e de forma aleatória, a uma temperatura de, aproximadamente, $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$, em copos de plásticos de cor branca codificados com números aleatórios de 3 dígitos. Juntamente com as amostras foram oferecidos aos provadores bolacha e água e estes foram orientados a entre uma amostra e outra fazer o uso da bolacha e da água, para remoção do sabor residual e a provarem estas da esquerda para direita. Os testes foram realizados em cabines individuais utilizando-se luz branca, longe de ruídos e odores, em horários que não compreendessem uma hora antes e duas horas após o almoço.

3.9 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DO *L. casei* subsp. *paracasei* EM CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS

Após processamento dos requeijões, conforme metodologia descrita em 3.2, e armazenamento por 7 dias sob temperatura de refrigeração ($4 \pm 1^\circ\text{C}$), se procedeu da seguinte forma:

3.9.1 Inoculação das matrizes dos requeijões

Apenas os requeijões adicionados de *L. casei* subsp. *paracasei* foram submetidos a essa análise (Rprob e Rsimb). Para tanto, um conjunto de cinco amostras rotuladas como C1, C2, C3, S1 e S2 foram produzidas. C1 e C2 foram os requeijões controles duplicados, que foram inoculados com a cepa testada, mas não foram expostos às condições simuladas gastrointestinais; C3 tratou-se de um requeijão controle que não foi inoculado com a bactéria, mas foi exposto às condições simuladas gastrointestinais (usado para realizar assepticamente os ajustamentos de pH nas etapas sequenciais da digestão simulada). S1 e S2 foram requeijões inoculados e expostos às condições simuladas gastrointestinais. Todas as amostras acima mencionadas foram preparadas em frascos estéreis de 50mL. Nestes recipientes, os requeijões com a bactéria testada foram distribuídos em quantidades de 25 g cada.

3.9.2 Simulação das condições gastrointestinais

A via gastrointestinal que foi utilizada é descrita no Quadro 1, incluindo os compostos e concentrações utilizadas, o tempo de exposição e as intensidades de agitação em todas as etapas. As agitações simularam os movimentos peristálticos.

- **Etapa 1 (Antes da simulação):** o requeijão foi avaliado sob condições antes de sua ingestão;
- **Etapa 2 (Boca):** A mastigação foi simulada de acordo com Hold et al. (1995) e Choi et al. (2007), utilizando uma solução de saliva preparada com 100 U/mL de 1- α -amilase diluída em solução de CaCl_2 a 1mM, onde o pH foi ajustado para 6,9, utilizando solução de NaHCO_3 a 1mM. Esta solução foi adicionada em 25 g das amostras a uma taxa de 0,6mL/min, durante 2 minutos;
- **Etapas 3 a 8 (Esôfago-estômago):** Na etapa que simula as condições do esôfago-estômago foi adicionada solução de pepsina a uma taxa de 0,05mL/mL durante 90

minutos. A solução de pepsina foi preparada em HCl a 0,1N numa proporção de 25mg/mL. Nesta etapa, o pH foi reduzido para 2, utilizando solução de HCl a 1M (MAINVILLE et al., 2005);

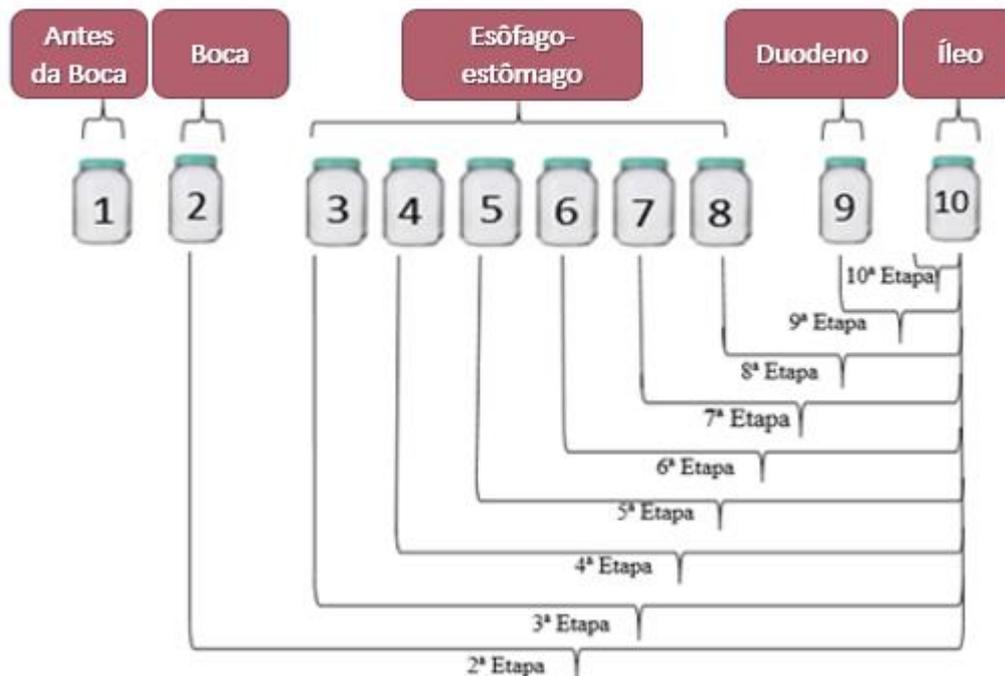
- **Etapa 9 (Duodeno):** As condições do duodeno foram simuladas utilizando 2g/L de pancreatina e 12g/L de sais biliares, diluídos em solução de NaHCO₃ a 0,1M. Esta solução foi adicionada no início da etapa a uma taxa de 0,25mL/mL (LAURENT; BESANÇON; CAPORICCIO, 2007);
- **Etapa 10 (Íleo):** Foi provocada por um aumento do pH para 6,5, utilizando solução de NaHCO₃ a 0,1M. A simulação se tornou contínua, de modo que o volume de trabalho total aumentou (como acontece durante uma digestão real).

Quadro 1 - Condições de processamento utilizadas em cada etapa de digestão simulada.

Compartimento	Condição	Agitação (rpm)	pH final	Tempo (min)
1. Antes da boca	-	-	-	-
2. Boca	Saliva	200	6,9	2
3 - 8 Esôfago-estômago	Pepsina	130	5,5	10
			4,6	10
			3,8	10
			2,8	20
			2,3	20
			2,0	20
9. Duodeno	Pancreatina + Sais biliares	45	5,0	30
10. Íleo	-----	45	6,5	60

Todas as soluções das enzimas foram preparadas em frascos e esterilizadas por filtração, usando membrana filtrante de 0,22µm (Milipore, Billerica MA, USA) antes de serem utilizadas. Após esterilização, todas as soluções foram mantidas em banho de gelo durante todo o período de simulação. Utilizou-se um banho maria a 37 ±1°C e agitação mecânica para simular a temperatura do corpo humano e os movimentos peristálticos, com intensidades semelhantes às atingidas em cada compartimento digestivo. A Figura 2 representa um esquema referente à adição das substâncias de cada etapa nas amostras que foram submetidas às condições gastrointestinais simuladas.

Figura 1. Representação esquemática da adição das substâncias em cada etapa nas amostras que foram submetidas às condições gastrointestinais simuladas



Fonte: Oliveira et al. (2014).

3.9.3 Análises microbiológicas

As contagens das células viáveis da bactéria láctica adicionada aos requeijões expostos a cada condição gastrointestinal simulada foram determinadas através da preparação de diluições seriadas decimais com água peptonada esterilizada [0,1g/100mL (Sigma, St. Louis MO, EUA)]. Estas diluições foram semeadas, posteriormente, conforme método proposto por Miles, Misra e Irwin (1938). *L. casei* subsp. *paracasei* foi plaqueado em ágar MRS (Sigma-Aldrich) suplementado com cisteína-HCl (0,05g/100mL) e incubado a $37 \pm 1^\circ\text{C}/48$ h sob condições anaeróbicas (BD GasPakTM EZ Anaerobe container system, Becton, Dickinson and Company, USA). Os resultados foram expressos como o log das unidades formadoras de colônias por cada grama de requeijão (log de UFC/g). O pH de cada amostra foi medido em cada etapa de simulação das condições gastrintestinais com um medidor de pH (Modelo 021/15; Quimis, São Paulo, Brasil), que foi periodicamente esterilizado com etanol (90mL/100mL).

3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados das análises tecnológicas, físicas, físico-químicas, análises microbiológicas, aceitação sensorial e teste *in vitro* da viabilidade próbiótica dos requeijões frente às condições simuladas do trato gastrointestinal dos requeijões elaborados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), realizando-se teste de média de Tukey ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Para o cálculo dos dados, foi utilizado o programa - Statistics Analy Systems, versão 8.12 (SAS Institute, Inc., Cary, NC.) (SAS, 1999). Os resultados dos testes sensoriais de ordenação preferência foram analisados de acordo com o teste de Friedman, utilizando-se a tabela de Newell Mac Farlane, para determinar se as amostras diferiram significativamente entre si (FARIA; YOTSUYANAGI, 2002).

REFERÊNCIAS

ABADÍA-GARCIA, L.; CARDATOR, A.; CAMPO, S. T. M.; ARVÍZU, S. M.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; REGALADO-GONZÁLEZ, C.; GARCÍA ALMENDAREZ, B.; AMAYALANO, S. L. Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. **International Dairy Journal**, v. 33, p. 191-197, 2013.

ACHILLEOS, C.; BERTHIER F. Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples. **Food Microbiology**, v. 36, p. 286-295, 2013.

APHA. American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4^a ed., cap. 7, p. 63 – 67, 2001.

AMERINE, A. M.; PANGBORN, R. M.; ROESSLER, E. B. **A Principles of Sensory Evaluation of food**. N. York. Ac. Press. 1967.

ANTUNES, A. E. C.; SILVA, E. R. A.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I.; LERAYER, A. L. S. Probióticos: agentes promotores de saúde. **Journal Brazilian Society of Food and Nutrition**, v.32, n.3, p. 103-122, 2007.

AOAC. **Official Methods of Analysis**. 14th ed. Ass. Off. Analytical. Chem., Washington, USA, 2005.

AQUALAB. **Analizador de atividade de água para avaliar biodegradação (alimentos e fármacos): Modelo CX-2**. Decagon Devices, Inc. 950 NE Nelson Court Pullman, WA 99163USA, 2001.

ARAÚJO, E. A.; CARVALHO, A. F.; LEANDRO, E. S.; FURTADO, M. M.; MORAES, C. A. Development of a symbiotic cottage cheese added with *Lactobacillus delbrueckii* H2b20 and inulin. **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 85-89, 2010.

ARAGON-ALEGRO, A, C. L.; ALEGRO, J. H. A.; CARDARELLI, H. R.; CHIU, M. C.; SAAD, S. M. I. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 4, p. 669-675, 2007.

ARANGO, O.; TRUJILLO, A. J.; CASTILLO, M. Predicting coagulation and syneresis parameters of milk gels when inulin is added as fat substitute using infrared light backscatter. **Journal of Food Engineering**, v. 157, p. 63-69, 2015.

Association of Official Agricultural Chemists. (2012). **Official methods of analysis of Association of Official Agricultural Chemists**. 19th ed., AOAC.

BARBOSA, F. H.; SILVA, A. M.; MARTINS, F. S.; NICOLI, J. R. Perfil de hidrofobicidade da superfície celular de *Bifidobacterium lactis* Bb12 e *Bifidobacterium longum* Bb46 em função do meio de cultura. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n.2, p.1-11, 2005.

BARROS, A. J. P.; LEHFELD, N. S. **Fundamentos da metodologia**: um guia para iniciação científica. São Paulo: Makron, 2000. 122 p.

BENDALI, F.; MADI, N.; SADOON, D. Beneficial effects of a strain of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* in *Staphylococcus aureus*-induced intestinal and colonic injury. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p. 787-794, 2011.

BERGONZELLI, G. E.; BLUM, S.; BRUSSOW, H.; CORTHESEY-THEULAZ, I. Probiotics as a treatment strategy for gastrointestinal diseases? **Digestion**, v. 72, n.1, p. 57-68, 2005.

BASU, S. K.; THOMAS, J. E. ARACHAYA, S. N. Prospects for growth in global nutraceutical and functional food markets: a Canadian perspective. **Australian journal of basic and applied sciences**, v. 1, p. 637-649. 2007.

BEZERRA, M.; ARAÚJO, A.; SANTOS, K.; CORREIA, R. Caprine frozen yoghurt produced with fresh and spray dried jambolan fruit pulp (*Eugenia jambolana* Lam) and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BI-07. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 2, p. 1099-1104, 2015.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; ASSIS, E. G.; SAAD, S. M. I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **Lebensmittel Wissenschaft & Technologie**, v. 38, n. 2, p. 173-180, 2005.

BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.57, n.4, p.373-380, 2007.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. Portaria nº 359, de 04 de setembro de 1997. Aprova Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Requeijão ou Requesõn. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 08 set. 1997. Seção 1, p. 43.

BRASIL. Secretaria de Agricultura. Portaria nº. 56 de 17 de dezembro de 1999. Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Diário Oficial da república Federativa do Brasil**. 1999.

BRIGHENTI, F. Dietary fructans and sérum triacylglycerols: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of Nutrition**, v. 11, p. S2552-S2556, 2007.

CARDARELLI, H. R.; BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially symbiotic *petit-suisse* cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 1037-1046, 2008.

CHALITA, M. A. N. O consumo de queijo como referência para a análise do mercado de qualidade do produto. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 50, n. 3, p. 545-562, 2012.

CENACHI, D. B. **Desenvolvimento de leite de cabra fermentado prebiótico com baixo teor de lactose adicionado beta-ciclodextrina**. 2012. 115 f. Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) - Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, 2012.

CIE - Commission Internationale de l'Éclairage. **Colorimetry**. Vienna: CIE publication, 2. ed., 1996.

CORREIA, R. T.P.; MAGALHÃES, M. M. A.; PEDRINI, M. R. S.; CRUZ, V. F.; CLEMENTINO, I. Sorvetes elaborados com leite caprino e bovino: composição química e propriedades de derretimento. **Revista Ciências Agrônomas**, v. 39, n. 2, p. 251-256, 2008.

CHOI, S. Y.; CHUNG, M. J.; LEE, S. J.; SHIN, J. H.; SUNG, N. J. N-nitrosamine inhibition by strawberry, garlic, kale, and the effects of nitrite-scavenging and N-nitrosamine formation by functional compounds in strawberry and garlic. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 485-491. 2007.

DESFOSSÉS-FOUCAULT, E.; LAPOINTE, G.; ROY, D. Transcription profiling of interactions between *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 and *Lactobacillus paracasei* ATCC 334 during Cheddar cheese simulation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 178, p. 76-86, 2014.

DRUNKLER, D. A. **Produção de requeijão cremoso simbiótico**. 2009. 180 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2009.

EMBRAPA. **LEITE DE CABRA FUNCIONAL OFERECE VANTAGENS ADICIONAIS PARA A SAÚDE**. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1982494/leite-de-cabra-funcional-oferece-vantagens-adicionais-para-a-saude> > Acesso em: Jul, 2014.

EISSENS, A. C.; BOLHOUIS, G. K.; HINRICHS, W. L. J.; FRIJLINK, H. W. Inulin as filler-binder for tablets prepared by direct compaction. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, p. 31-38, 2002.

EUVRAD, M.; SORBIE, K. Electodeposition of a calcareous layer: Effects of green inhibitors. **Chemical Engineering Science**, v. 64, p. 2413-2421, 2009.

FAO/WHO. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. Disponível em: < <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/y6398e.pdf> >. Acesso em: 6 jul. 2015. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation].

FAO/WHO. **Statistical pocketbook world food and agriculture**. Report. Roma: FAO/WHO. p. 236, 2015.

FARIA, E. V.; YOTSUYANAGI, K. **Técnicas de Análise Sensorial**. Campinas: ITAL/LAFISE, 116 p. 2002.

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

GIANEZINI, M.; ALVES, A. B.; TECHEMAYER, C. A.; RÉVILLION, J. P. P. Diferenciação de produto e inovação na indústria agroalimentar: a inserção de alimentos funcionais no Brasil. **Revista de Administração, Contabilidade e Economia**, v.11, p.9, 2012.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GOMES, A.; G. PENNA, A.; L.; B. Caracterização de requeijão cremoso potencialmente prebiótico pela adição de inulina e proteína de soja. **Boletim do CEPPA**, v. 28, n. 2, p. 289-302, 2010.

GRASSO, S. et al. Healthy processed meat products - Regulatory, reformulation and consumer challenges. **Trends in Food Science & Technology**, v. 39, n. 1, p. 4-17, 2014.

HAENLEIN, G. Past, present and future perspectives of small ruminant research. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2097-2115, 2001.

HOLD, K. M.; DE BOER, D.; ZUIDEMA, J.; MAES, R. A. A. Saliva as an analytical tool in toxicology. **International Journal of Drug Testing**, v. 1, n. 1, p. 1-36. 1995.

IFT – INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. Sensory evaluation guide for testing food and beverage products. **Food Technology**, v. 35, n. 11, p. 50-59, 1981.

KOCA, N.; METIN, M. Textural, melting and sensory properties of low-fat fresh kashar cheeses produced by using fat replacers. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 4, p. 365-373, 2004.

KOLIDA, S.; GIBSON, G.R. Synbiotics in health and disease. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 2, p.377-393, 2011.

KNIGHTS, M.; GARCIA, G. The status and characteristics of the goat (*Capra hircus*) and its potential role as significant milk producer in the tropics: a review. **Small Ruminant Research**, v. 26, p. 203-215, 1997.

LANARA - Laboratório Nacional de Referência Animal. **Métodos de análises oficiais par controle de produtos de origem animal e seus ingredientes**. Brasília, DF, 1981.

LAVANDA, I.; SAAD, S. M. I.; LOBO, A. R.; COLLI, C. Prebióticos y su efecto em la biodisponibilidad del cálcio. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 2, p. 333-344, 2011.

LAURENT, C.; BESANÇON, P.; CAPORICCIO, B. Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an *in vitro* digestion/caco-2 cell culture model. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1704-1712. 2007.

- LIMA, J.C.R.; FREITAS, J.B.; CZEDER, L.P.; FERNANDES, D.C.; NAVES, M.M.V. Qualidade microbiológica, aceitabilidade e valor nutricional de barras de cereais formuladas com polpa e amêndoa de baru. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 331-343, 2010.
- MANNING, T. S.; GIBSON, G. R. Prebiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, n. 2, p. 287-298, 2004.
- MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E BASTECIMENTO. **Caprinos e Ovinos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/caprinos-e-ovinos>> Acesso em: Jul. 2015.
- MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G., FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 173-182, 2002.
- MAINVILLE, I.; ARCAND, Y.; FARNWORTH, E. R. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 287-296. 2005.
- MARTEAU, P.; JACOBS, H.; CAZAUBIEL, M.; SIGNORET, C.; PREVEL, J. P.; HOUSEZ, B. Effects of chicory inulin in constipated elderly people: a double-blind controlled trial. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 62, p. 164-170, 2011.
- MARTINS, E. C.; WANDER, A. E.; CHAPAVAL, L.; BOMFIM, M. A. D. O MERCADO E AS POTENCIALIDADES DO LEITE DE CABRA NA CIDADE DE SOBRAL: A VISÃO DO CONSUMIDOR. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS DE PRODUÇÃO**. 7, 2007, Fortaleza. Agricultura familiar, políticas públicas e inclusão social: anais. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 15 f.
- MEYER, D.; BAIARRI, S.; TÁRREGA, A.; COSTELL, E. Inulin as texture modifier in dairy products. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1881-1890, 2011.
- MERCOSUL/GMC/RES.Nº 134/96. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade de Queijo Processado ou Fundido, Processado, Pasteurizado e Processado ou Fundido U.H.T (UAT). 1996.
- MILES, O.; MISRA, S. S.; IRWIN, J. O. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, v. 38, n. 6, p. 732-749. 1938.
- MUSSATO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 3, p. 587-597, 2007.
- NOMOTO, K. Prevention of infections by probiotics. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 6, p. 583-592, 2005.
- OLIVEIRA, M. E. G.; GARCIA, E. F.; OLIVEIRA, C. E. V.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. M. E.; MADUREIRA, A. R. M. F.; CONCEIÇÃO, M. L.; QUEIROGA, R. C. R. E.; SOUZA, E. L. Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): Survival to

simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 241-247, 2014.

PROVEDA, J. M.; CHICÓN, R.; CABEZAS, L. Biogenic amine content and proteolysis in Manchego cheese manufactured with *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* as adjunct and other autochthonous strains as starts. **International Dairy Journal**, v. 47, p. 94-101, 2015.

QUEIROGA, R. C. R. E.; SANTOS, B. M.; GOMES, A. M. P.; MONTEIRO, M. J.; TEIXEIRA, S. M.; SOUZA, E. L.; PEREIRA, C. J. D.; PINTADO, M. M. E. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats' milk and their mixture. **LWT – Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 538-544, 2013.

QUEIROGA, R. de C. R. de E.; COSTA, R. G. Qualidade nutricional e sensorial de leite caprino e seus derivados. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 2.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE AGRONEGÓCIO DA CAPRINOCULTURA LEITEIRA, 1., 2003, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: EMEPA-PB, 2003. P. 313-328.

RANADHEERA, C.S. et al. Probiotic viability and physico-chemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. **Food Chemistry**, v.135, n. 3, p. 1411–1418, 2012.

ROBERFROID, M. B. Featuring fructan inulin type. **British Journal of Nutrition**, v. 93, p. S13-S25, 2005.

RODRIGUEZ, V. A.; CRAVERO, B. F.; ALONSO, A. Proceso de elaboración de yogur deslactosado de leche de cabra. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28 (Supl.), p. 109-115, 2008.

SAARELA, M. H. Probiotic Functional Foods. **Functional Foods**, v. 2, p. 425-448, 2011.

SAS Institute. **SAS User's Guide: Statistics**; Version 8.0. SAS Institute, Cary, NC, USA. 1999.

SILVA, A. M. T. **Elaboração de Iogurte com Propriedades Funcionais Utilizando Bifidobacterium Lactis e Fibra Solúvel**. 2013. 60f. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, 2013.

SILVEIRA, E.O.; NETO, J. H. L.; SILVA, L.A.; RAPOSO, A. E. S.; MAGNANI, M.; CARDARELLI, H. R. The effects of inulin combined with oligofructose and goat cheese whey on the physicochemical properties and sensory acceptance of a probiotic chocolate goat dairy beverage. **Food Science and Technology – LWT**. v. 52, n 1, p. 445- 451, 2015.

STEEGMANS, M.; ILIAENS, S.; HOEBREGS, H. Enzymatic, Spectrophotometric Determination of Glucose, Fructose, Sucrose, and Inulin/Oligofructose in Foods. **Journal of AOAC International**, [S.l], v. 87, n. 5, p. 1200-1207, 2004.

SU, P.; HEMRIKSSON, A.; MITCHELL, H. Prebiotics enhance survival and prolong the retention period of specific probiotic inocula in a *in vivo* murine model. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2392-2400, 2007.

STEELE, J.; BROADBENT, J.; KOK, J. Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, p. 135-141, 2013.

TÁRREGA, A.; COSTELL, E. Effect of inulin addition on rheological and sensory properties of fat-free starchbased dairy desserts. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 1104-1112, 2006.

VAN DENDER, A. G. F. Requeijão: aspectos gerais. IN: VAN DENDER, A. G. F. **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: tecnologia de fabricação, controle do processo e aspectos de mercado**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora Ltda, 2006.

VARGAS, M.; CHÁFER, M.; ALBORS, A.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Physicochemical and sensory characteristics of yogurt produced from mixtures of cows' and goats' milk. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 1146-1152, 2008.

XANTHOPOULOS, V.; IPSILANDIS, C. G.; TZANETAKIS, N. Use of a selected multi-strain potential probiotic culture for the manufacture of set-type yogurt from caprine milk. **Small Ruminant Research**, v. 106, p. 145– 153, 2012

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do presente estudo, um artigo original foi elaborado e submetido ao periódico **LWT – Food Science and Technology** da sbCTA, que possui fator de impacto de 2.711, sendo classificada como Qualis A1, na área de Ciência de Alimentos, pela Capes ano 2015.

ARTIGO

Requeijão cremoso caprino funcional: Efeitos do *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* e inulina na qualidade e avaliação *in vitro* da sobrevivência da cepa testada ao longo do trato gastrointestinal

Dalyane Laís da Silva Dantas^a, Juliana Késsia Barbosa Soares^a, Marta Suelly Madruga^a,
Mércia de Souza Galvão^b, Rita de Cássia Ramos do Egipto Queiroga^a, Maria Elieidy Gomes
de Oliveira^{a*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900, João Pessoa, Paraíba, Brasil

^bLaboratório de Análises de *Flavor*/DTQA/CT, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900, João Pessoa, Paraíba, Brasil

*Autor a quem a correspondência deve ser endereçada; E-mail: elieidynutri@yahoo.com.br; Tel.: + 55 83 33721809; Fax: + 55 83 33721922.

Resumo: Requeijões caprinos cremosos com potencial funcional foram elaborados e avaliados quanto aos parâmetros tecnológicos, físicos, físico-químicos, e microbiológicos durante armazenamento refrigerado entre os tempos 1, 7, 14, 21 e 28 dias. Foi verificado ainda o potencial protetor da matriz alimentar sobre a sobrevivência do *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* ao longo das condições simuladas do trato gastrointestinal. Nenhuma das amostras apresentou sinerese ($p < 0,05$). Foi observado que houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) com aumento do teor cloretos (para o RC), proteínas, acidez total em ácido láctico (RSimb) e açúcares totais (RPre e Rsimb) ao longo do armazenamento

refrigerado. De um modo geral, houve redução da umidade (RPro e RPre) e pH (RPro e RSimb). Quanto à viabilidade do probiótico (*L. casei* subsp. *paracasei*) houve crescimento ($p < 0,05$) logo após o início do armazenamento, finalizando com números de 8,0 e 7,7 log de ufc.g⁻¹ para as amostras probiótica (RPro) e simbiótica (RSimb), respectivamente, estando de acordo com as recomendações de contagens para esse tipo de produto. Ao longo da digestão simulada foi observada uma redução ($p < 0,05$) no número das estirpes entre os dois tratamentos (RPro e RSimb), porém, ao fim do experimento as amostras permaneceram com contagens satisfatórias através da população final dos micro-organismos ao percorrer o trajeto (6,0 log. ufc.g⁻¹ para RPro e 5,2 log.g⁻¹ para RSimb), indicando o efeito positivo dos requeijões cremosos caprinos como matriz protetora, sendo um alimento com potencial funcional importante, seguro e voltado a fomentar a cadeia de produtos à base de leite de cabra.

Palavras-chave: derivado lácteo caprino; caracterização; condições gastrointestinais.

1. Introdução

A introdução de alimentos que possuam alguma funcionalidade está relacionada a promoção de bem-estar e longevidade a partir da sua ingestão. O leite de cabra é um produto oriundo da ordenha ininterrupta de animais sadios, que possui em sua rica composição a presença de nutrientes potencialmente importantes, como o ácido linoleico conjugado (CLA), ácidos graxos de cadeia curta, vitaminas essenciais como as do complexo B (riboflavina, tiamina e B12), caroteno, precursor da vitamina D, oligossacarídeos e cálcio, além de ser uma excelente fonte proteica, o que o classifica como um alimento funcional, sendo esta uma matriz bem tolerada por quase todos os consumidores (Haelein; Anke, 2011).

A elaboração de derivados lácteos caprinos adicionados de micro-organismos probióticos e componentes prebióticos tem sido tema de estudos, com o intuito de estimular a

indústria alimentícia a investir em tecnologias de processamentos de fácil acesso, disponibilizando, para o mercado consumidor em potencial, produtos diferenciados e que promovam saúde aos consumidores (Bezerra et al., 2016).

Pesquisas relacionam o consumo de probióticos com benefícios promovidos ao organismo, através da melhoria do sistema imunológico, gastrointestinal, redução na dislipidemia sanguínea, promovendo atividades antioxidantes, microbianas e anticancerígenas, além da melhora em quadros patológicos, como na doença inflamatória intestinal, via fortalecimento da flora bacteriana (Zhang et al., 2014; Lollo, et al., 2015; Nilsson et al., 2016; Assis et al., 2016).

A bem-sucedida inserção de estirpes microbianas, com atuação benéfica no organismo a partir de matrizes lácteas caprinas pode estar relacionada a identidade protetora de lácteos sobre a viabilidade das cepas, seja por sua composição estrutural ou pela presença de componentes como proteínas, gorduras ou fibras. Observa-se que derivados lácteos, a exemplo dos queijos, possuem características específicas peculiares em sua matriz, como pH mais elevado, demasiada capacidade de tamponamento, além da firmeza em sua consistência, mais acentuada do que em grande parte de produtos fermentados, como o iogurte. Estas propriedades promovem a esse tipo de produto uma melhor entrega e maior manutenção de bactérias lácticas no trato gastrointestinal (Abadía-García, 2013; Desfossés-Foucault et al., 2014; Proveda et al., 2015).

O emprego tecnológico de probióticos está condicionado à sobrevivência destes micro-organismos durante as etapas de produção, vida útil e passagem pelo trato digestório, que devem estar em quantidades satisfatórias (Oliveira et al., 2014; Silva et al., 2012). O *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* tem sido intensamente estudado, devido as suas propriedades de promoção a saúde, com atuação na melhora do sistema imune, redução dos níveis de triglicerídeos e colesterol, inibição de estirpes patogênicas seja como co-cultura ou

através da inserção em derivados lácteos (Buriti et al., 2007; Cardarelli et al., 2008; Bendalli et al., 2011; Oliveira et al., 2014; Jones, 2017; Bezerra et al., 2017).

O requeijão é caracterizado por ser um queijo fundido (Van Dender et al., 2008; Almanza-Rubio et al., 2016) devido a seu tipo de processamento. Esta matriz mostra-se como um veículo ideal para inserção de bactérias probióticas, podendo possuir propriedade simbiótica, desde que adicionado de estirpes probióticas e de componentes prebióticos, como a inulina, no entanto são necessários estudos que avaliem a viabilidade probiótica influenciada pela degradação da inulina (Buriti et al., 2007).

Considerando tais aspectos, objetivou-se nesse estudo elaborar requeijões cremosos caprinos com potencial funcional e analisar suas características tecnológicas, físicas, físico-químicas, microbiológicas e sensoriais durante armazenamento refrigerado, bem como verificar o potencial protetor da matriz alimentar sobre a sobrevivência do *L. casei* subsp. *paracasei* ao longo do trato gastrointestinal.

2. Material e Métodos

2.1 Matérias primas

O leite de cabra (65 °C/30 min) foi obtido através de raças nativas, da espécie toggenburg, proveniente de uma cooperativa de pequenos produtores, localizada na cidade de Nova Floresta/PB. Partindo do leite caprino, obteve-se o creme/nata utilizado no processamento dos requeijões, como fonte de gordura, a partir do desnate em máquina padronizadora. O ácido láctico e o coalho (Christian Hansen[®], Valinhos, Minas Gerais, Brasil), o componente prebiótico inulina (BENEIO Orafiti[®] inulin, Tienem, Bélgica), a cultura probiótica (L-casei 01, Christian Hansen[®], Valinhos, Minas Gerais, Brasil) composta por *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, foi obtida comercialmente. Os demais ingredientes

necessários para execução do projeto foram obtidos em redes de supermercados e lojas especializadas das cidades de Cuité/PB e João Pessoa/PB.

2.2 Controle de qualidade da matéria-prima

O leite caprino utilizado na elaboração dos iogurtes foi submetido à determinação dos parâmetros de acidez em ácido láctico, pH, extrato seco total, proteínas, gordura, lactose e resíduo mineral fixo, conforme metodologia recomendada pela *Association of Official Analytical Chemist Methods* (AOAC, 2012). A determinação dos parâmetros microbiológicos seguiu as metodologias recomendadas pela *American Public Health Association* (APHA, 2001), em que a matéria prima foi submetida à determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais (NMP/g) e termololerantes (NMP/g), contagem de bolores e leveduras expressa em UFC/g, e contagem total de bactérias aeróbias mesófilas (Unidades Formadoras de Colônias por g - UFC/g).

2.3 Elaboração dos requeijões cremosos caprinos

A partir de estudos prévios e segundo a legislação (MERCOSUL N°134/96), para queijos fundidos, o requeijão foi elaborado em triplicata, a partir do processamento de quatro tipos de requeijões cremosos caprinos, a citar: RC (requeijão controle, sem adição do micro-organismo probiótico e de inulina), RPro. (Requeijão probiótico, adicionado apenas de *L. paracasei* subsp. *paracasei*), RPre. (Requeijão prebiótico, adicionado unicamente de inulina) e RS (Requeijão simbiótico, adicionado de *L. paracasei* subsp. *paracasei* e da inulina).

O leite caprino foi submetido a um tratamento térmico (90°C/10 min) e, em seguida, foi arrefecido a 45 ±1°C. Posteriormente, adicionou ácido láctico (85%) na proporção de 0,55% (diluído previamente na proporção de 1:10v/v), sendo homogeneizado por 10 a 15 min. Em seguida, foram adicionados a solução de cloreto de cálcio a 50% (0,5mL/L), com a finalidade

de repor o cálcio perdido durante o processo de pasteurização, e o coalho líquido (0,9mL/L), diluído na mesma quantidade de água mineral. O leite homogeneizado, se manteve a uma temperatura de $45 \pm 1^\circ\text{C}$ até a completa coagulação da massa (aproximadamente, 40 minutos). Após verificação do ponto de corte, o coágulo formado foi cortado no sentido vertical e horizontal, com auxílio de uma lira, e em seguidas se homogeneizou por cerca de 20 a 40 min. Em seguida, a massa pôde ser dessorada e submetida à lavagem com água aquecida a $45 \pm 1^\circ\text{C}$ (três vezes) e leite caprino desnatado (uma vez), em proporção ao volume de soro anteriormente drenado. A massa foi pesada e a ela se adicionou o creme de leite/nata caprina (40%), sal fundente (1,9%) e 10% do peso da massa de leite caprino desnatado. A massa com a mistura dos ingredientes foi efundida em alta rotação com um mixer multiprocessador por 30-60 segundos; seguidamente, submeteu-se a uma rotação mais baixa até atingir $95 \pm 1^\circ\text{C}$ e, posteriormente, a uma alta rotação por mais 30 segundos. Após isso, foram adicionados mais 10% do peso da massa inicial de leite caprino desnatado, sob uma rotação baixa, até atingir $95 \pm 1^\circ\text{C}$. Por fim, o ponto final do requeijão foi observado com base na sua consistência e formação de filamentos compridos ao se agitar com espátula estéril. Com exceção do RC após o resfriamento a temperatura ambiente, procedeu-se então a adição dos componentes pro e prebióticos, RPre. (6% de inulina); RPro. (0,01% do *L. paracasei*) RSimb. (Adição dos dois componentes prebiótico e probiótico nas proporções citadas anteriormente). Os produtos foram acondicionados em embalagens de plástico sob temperatura de refrigeração ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) até o momento das análises.

2.4 Avaliação do rendimento e sinerese dos requeijões

Após o processamento, o rendimento de cada lote de requeijão foi expresso (em g de requeijão/10L de leite) como peso de requeijão fresco em gramas obtido a partir de 10L de leite utilizado. A sinerese (em g/100 g) foi calculada como o peso de soro de leite liberado por

cada grama de requeijão em sua própria embalagem após o armazenamento em diferentes tempos de armazenamento refrigerado (1, 7, 14, 21 e 28 dias) dividido pelo peso do requeijão em gramas da mesma embalagem e multiplicado por 100 (BURITI et al., 2005). O cálculo destes parâmetros foi feito com base nas fórmulas descritas abaixo:

$$\checkmark \text{ **Rendimento** } = \frac{\text{Peso em gramas de requeijão produzido}}{10 \text{ L de leite utilizado}} \quad \text{Eq. 1}$$

$$\checkmark \text{ **Sinerese** } = \frac{\text{Peso em gramas de soro} \times 100}{\text{Peso em gramas do requeijão}} \quad \text{Eq. 2}$$

2.5 Avaliação das propriedades tecnológicas

A avaliação das propriedades tecnológicas dos requeijões produzidos foi feita baseada nos testes de textura instrumental e cor instrumental, nos tempos 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado ($4 \pm 1^\circ\text{C}$). A realização destas análises compreendeu as metodologias a seguir.

2.5.1 Avaliação da textura instrumental

A textura instrumental dos requeijões foi determinada, em triplicata, através de teste de dupla compressão, em texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems, Haslemere, Reino Unido). Os dados foram coletados através do programa *Texture Expert for Windows* – versão 1.20 (Stable Micro Systems). Foram analisados os atributos primários firmeza, coesividade, adesividade e elasticidade e o atributo secundário gomosidade e resiliência.

2.5.2 Avaliação da cor instrumental

A determinação da cor instrumental foi feita em colorímetro Minolta, modelo CR300, utilizando o sistema CIELAB (CIE, 1996). No espaço colorimétrico CIELAB, definido por L^* , a^* , b^* , a coordenada L^* corresponde à luminosidade, a^* e b^* referem-se às coordenadas de cromaticidade verde (-)/vermelho(+) e azul(-)/amarelo(+), respectivamente. As medições foram realizadas em triplicata com o aparelho previamente calibrado.

2.6 Avaliação das características físicas e físico-químicas

Após elaboração dos diferentes tipos de requeijão, estes foram submetidos às análises de determinação de pH, acidez total titulável em ácido lático, umidade, extrato seco total (EST), cinzas, cloreto de sódio (NaCl) pelo método de Mohr, lipídios, lactose, proteína bruta e índice proteolítico, de acordo com a metodologia de AOAC (2005); a atividade de água foi determinada conforme descrição de uso do manual Aqualab (AQUALAB, 2001). Estas análises foram realizadas em triplicata nos tempos 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado ($4 \pm 1^\circ\text{C}$).

2.7 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas constaram na avaliação da qualidade higiênico sanitária e na avaliação da viabilidade da bactéria láctica. No controle de qualidade foram realizados os seguintes ensaios: contagem de coliformes totais e termotolerantes expressa em NMP/g, contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, detecção de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, cujos resultados foram expressos em UFC/g (APHA 2001). No que se refere à avaliação da viabilidade das bactérias lácticas, a contagem de *L. casei* subsp. *paracasei* foi feita de acordo com a APHA (2001).

2.8 Análise Sensorial

Após a submissão do projeto ao Comitê de Ética em Pesquisa do CCS/UFPB e obtenção da sua aprovação (Protocolo 111.523/2012, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP) (Anexo A), a avaliação sensorial dos requeijões se realizou nos tempos 1, 14 e 28 dias após a sua fabricação. Antes das análises sensoriais os requeijões foram submetidos às análises microbiológicas para garantir a qualidade higiênico-sanitária, verificando se os requeijões estavam dentro dos padrões recomendados pela legislação vigente (BRASIL, 1997).

Posteriormente, se realizaram os testes de aceitabilidade e preferência relativa entre as amostras, segundo Faria e Yotsuyanagi (2002). No teste de aceitabilidade se empregaram os critérios estabelecidos por Amerine, Pangborn e Roessler (1967). Para tanto, mediante um questionário de identificação dos provadores (Anexo B) um painel não treinado constituído

por 100 provadores (alunos, professores e funcionários do CES/UFCG) foram selecionados com base nos hábitos e interesse em consumir requeijão, sendo constituídos tanto pelo gênero feminino quanto masculino, com faixa etária variando entre 18 a 45 anos de idade, não apresentando nenhum problema de saúde ou deficiência física que viesse a comprometer a avaliação sensorial dos produtos, especificamente relacionado a três dos sentidos humano: olfato, paladar e visão. Estes provadores assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice C), aceitando participar da pesquisa e analisar as amostras de requeijão de acordo com o *Institut of Food Technologist* (IFT, 1981).

Na avaliação da aceitação sensorial foram avaliados os atributos aparência, cor, aroma, sabor, textura e aceitação global. Os provadores atribuíram valores às amostras, numa escala hedônica estruturada com nove pontos (1 = desgostei muitíssimo; 5 = nem gostei/nem desgostei; 9 = gostei muitíssimo). Os formulários destinados a este teste continham campos que possibilitaram aos provadores anotar descrições que julgassem importantes (Apêndice A). Os requeijões foram considerados aceitos quando obtiveram média = 5,0 (equivalente ao termo hedônico “gostei moderadamente”) (LIMA et al., 2010).

A preferência relativa entre as amostras de requeijão foi conduzida segundo delineamento de ordenação em blocos casualizados com os 100 provadores não treinados, empregando-se o teste de ordenação preferência, com notas que variaram de 1 (“amostra mais preferida”) a 4 (“amostra menos preferida”) (Apêndice B). Com a finalidade de se obter maiores informações sobre as características sensoriais de cada requeijão, os provadores relataram os atributos sensoriais que contribuíram para a escolha das amostras “mais preferidas” e “menos preferidas”.

Paralelamente, também se avaliou a intenção de compra. Para tanto, foi empregado uma escala hedônica estruturada com cinco pontos (1 = jamais compraria; 3 = talvez comprasse/talvez não comprasse; 5 = compraria), conforme formulário em Apêndice A.

Em ambos os testes, as amostras foram padronizadas e servidas, simultaneamente, e de forma aleatória, a uma temperatura de, aproximadamente, $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$, em copos de plásticos de cor branca codificados com números aleatórios de 3 dígitos. Juntamente com as amostras foram oferecidos aos provadores bolacha e água e estes foram orientados a entre uma amostra e outra fazer o uso da bolacha e da água, para remoção do sabor residual e a provarem estas da esquerda para direita. Os testes foram realizados em cabines individuais utilizando-se luz branca, longe de ruídos e odores, em horários que não compreendessem uma hora antes e duas horas após o almoço.

2.9 Avaliação da sobrevivência do *L. casei* subsp. *paracasei* em condições gastrointestinais simuladas

Apenas os requeijões adicionados de *L. casei* subsp. *paracasei* foram submetidos a essa análise (RPro e RSimb). Para tanto, um conjunto de cinco amostras rotuladas como C1, C2, C3, S1 e S2 foram produzidas. C1 e C2 foram os requeijões controles duplicados, que foram inoculados com a cepa testada, mas não foram expostos às condições simuladas gastrointestinais; C3 tratou-se de um requeijão controle que não foi inoculado com a bactéria, mas foi exposto às condições simuladas gastrointestinais (usado para realizar assepticamente os ajustamentos de pH nas etapas sequenciais da digestão simulada). S1 e S2 foram requeijões inoculados e expostos às condições simuladas gastrointestinais. Todas as amostras acima mencionadas foram preparadas em frascos estéreis de 50mL. Nestes recipientes, os requeijões com a bactéria testada foram distribuídos em quantidades de 25g cada.

2.9.1 Simulação das condições gastrointestinais

A via gastrointestinal que foi utilizada é descrita na Tabela 1, incluindo os compostos e concentrações utilizadas, o tempo de exposição e as intensidades de agitação em todas as etapas. As agitações simularam os movimentos peristálticos. A mastigação foi simulada de acordo com Hold et al. (1995) e Choi et al. (2007), utilizando uma solução de saliva preparada com 100U/mL de 1- α -amilase diluída em solução de CaCl₂ a 1mM, onde o pH foi ajustado para 6,9, utilizando solução de NaHCO₃ a 1 mM. Esta solução foi adicionada em 25g das amostras a uma taxa de 0,6mL/min, durante 2 minutos. Na etapa que simula as condições do esôfago-estômago foi adicionada solução de pepsina a uma taxa de 0,05mL/mL durante 90 minutos. A solução de pepsina foi preparada em HCl a 0,1N numa proporção de 25 mg/mL. Nesta etapa, o pH foi reduzido para 2, utilizando solução de HCl a 1 M (Mainville et al., 2005). As condições do duodeno foram simuladas utilizando 2g/L de pancreatina e 12g/L de

sais biliares, diluídos em solução de NaHCO_3 a 0,1M. Esta solução foi adicionada no início da etapa a uma taxa de 0,25 mL/mL (Laurent; Besaçon; Caporiccio, 2007). Finalmente, a etapa do íleo foi provocada por um aumento do pH para 6,5, utilizando solução de NaHCO_3 a 0,1M. A simulação se tornou contínua, de modo que o volume de trabalho total aumentou (como acontece durante uma digestão real).

Quadro 2 - Condições de processamento utilizadas em cada etapa de digestão simulada.

Compartimento	Condição	Agitação (rpm)	pH final	Tempo (min)
Boca	Saliva	200	6,9	2
Esôfago-estômago	Pepsina	130	5,5	10
			4,6	10
			3,8	10
			2,8	20
			2,3	20
			2,0	20
Duodeno	Pancreatina + Sais biliares	45	5,0	30
Íleo	-----	45	6,5	60

Todas as soluções das enzimas foram preparadas em frascos e esterilizadas por filtração, usando membrana filtrante de $0,22\mu\text{m}$ (Milipore, Billerica MA, USA) antes de serem utilizadas. Após esterilização, todas as soluções foram mantidas em banho de gelo durante todo o período de simulação. Utilizou-se um banho maria a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ e agitação mecânica para simular a temperatura do corpo humano e os movimentos peristálticos, com intensidades semelhantes às atingidas em cada compartimento digestivo.

2.9.2 Análises microbiológicas

As contagens das células viáveis da bactéria láctica adicionada aos requeijões expostos a cada condição gastrointestinal simulada foram determinadas através da preparação de diluições seriadas decimais com água peptonada esterilizada [0,1 g/100 mL (Sigma, St. Louis MO, EUA)]. Estas diluições foram semeadas, posteriormente, conforme método proposto por Miles, Misra e Irwin (1938). *L. casei* subsp. *paracasei* foi plaqueado em ágar MRS (Sigma-Aldrich) suplementado com cisteína-HCl (0,05g/100mL) e incubado a $37 \pm 1^\circ\text{C}/48$ h sob condições anaeróbicas (BD GasPak™ EZ Anaerobe container system, Becton, Dickinson and Company, USA). Os resultados foram expressos como o log das unidades formadoras de colônias por cada grama de requeijão (log de UFC/g). O pH de cada amostra foi medido em cada etapa de simulação das condições gastrintestinais com um medidor de pH (Modelo 021/15; Quimis, São Paulo, Brasil), que foi periodicamente esterilizado com etanol (90mL/100mL).

2.10 Análises estatísticas

Os resultados das análises tecnológicas, físicas, físico-químicas, quantificação do prebiótico, análises microbiológicas, aceitação sensorial e teste *in vitro* da viabilidade próbiótica dos requeijões frente às condições simuladas do trato gastrointestinal dos requeijões elaborados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), realizando-se teste de média de Tukey ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Para o cálculo dos dados, foi utilizado o programa - Statistics Analy Systems, versão 8.12 (SAS Institute, Inc., Cary, NC.) (SAS, 1999). Os resultados dos testes sensoriais de ordenação preferência foram analisados de acordo com o teste de Friedman, utilizando-se a tabela de Newell Mac Farlane, para determinar se as amostras diferiram significativamente entre si (FARIA; YOTSUYANAGI, 2002).

3 Resultados e Discussão

3.1 Qualidade do leite caprino

A partir das análises da qualidade microbiológica do leite de cabra, utilizado na confecção dos requeijões, observou-se a ausência de *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes*, assim como também se obteve números inferiores a $< 3\text{NMP/g}$ para a contagem de coliformes totais e termotolerantes e valor $< 1 \times 10^1$ UFC/g na contagem de bolores e leveduras. Estando assim, esta matriz, apta ao consumo humano, ou para o desenvolvimento de produtos, como o requeijão cremoso caprino.

Os dados obtidos na caracterização física e físico-química do leite de cabra utilizado como matéria-prima são observados na Tabela 1. Os resultados encontrados nesta pesquisa, foram similares aos de Toral et al. (2015), Shi et al., (2015) e Gomes et al. (2013), ao analisar leite caprino para elaboração de derivados lácteos.

Tabela 1 – Valores médios das variáveis físico-químicas do leite caprino.

Variáveis	Leite Caprino
pH	6,79 \pm 0,00
Acidez em ácido láctico (g/100g)	0,12 \pm 0,02
EST* (g/100g)	13,55 \pm 0,40
ESD** (g/100g)	10,40
Proteína (g/100g)	3,95 \pm 0,03
Gordura (g/100g)	3,15 \pm 0,05
Lactose (g/100g)	3,83 \pm 0,00

*Extrato Seco Total; ** Extrato Seco Desengordurado.

3.2 Avaliação do rendimento e sinerese dos requeijões

De acordo com as análises para rendimento dos requeijões cremosos caprinos, a média e desvio padrão obtida através da elaboração dos produtos, foi de 15,33% (\pm 0,12), o que expressa que a cada 100 mL de leite, se produz em torno de 15,33 g de requeijão. Para Ong et al. (2006), a produção de queijos através da inserção direta de ácido láctico ao leite, resulta

em rendimentos mais elevados, e texturas de característica melhoradas, devido a acidificação retardada que é promovida ao produto, que acaba promovendo uma maior durabilidade.

Ao longo do tempo de armazenamento, não houve desprendimento de soro por parte dos requeijões cremosos caprinos, o que impossibilitou a realização de um cálculo significativo para a sinerese, portanto, não houve sinerese ao longo dos tratamentos. Em fermentados elaborados a partir do leite de cabra, observa-se um menor teor de sinerese, isto pode ser justificado, através da formação de um gel mais consistente durante o armazenamento (Vargas et al., 2008). A formação da sinerese se dá através da contração do gel, que acaba por expulsar o líquido, seja pelo rearranjo de proteínas, ou até mesmo pelo agrupamento de micelas na rede de textura do produto (Lee & Lucey, 2010).

3.2 Avaliação das propriedades tecnológicas

Na Tabela 2 são apresentados os valores médios dos parâmetros de cor e textura de requeijões cremosos caprinos. Tais aspectos tecnológicos podem estar relacionados a outros como a capacidade de retenção de água, sinerese, viscosidade, e juntos constituem importantes parâmetros que influenciam na qualidade do produto (Rinaldone; Campderrós; Padilla 2012).

Tabela 2 – Valores médios (\pm desvio padrão) das variáveis tecnológicas dos requeijões caprinos durante armazenamento refrigerado.

VARIÁVEIS	DIAS	REQUEIJÕES			
		RC	RProb	RPreb	RSimb
<i>Cor</i>					
Cor L	1	87,87 \pm 0,00 ^{BC}	83,93 \pm 2,29 ^B	86,70 \pm 4,09	85,16 \pm 0,02 ^B
	7	85,18 \pm 1,87 ^C	87,00 \pm 2,42 ^A	87,13 \pm 0,84	84,33 \pm 3,10 ^B
	14	91,53 \pm 0,18 ^{Ab}	88,48 \pm 0,21 ^{Abc}	94,75 \pm 0,24 ^a	91,52 \pm 0,21 ^{Ab}
	21	90,57 \pm 0,41 ^{AB}	92,48 \pm 2,11 ^A	91,53 \pm 2,08	92,37 \pm 0,92 ^A
	28	89,86 \pm 0,14 ^{AB}	91,58 \pm 1,08 ^A	92,13 \pm 2,33	91,45 \pm 0,30 ^A
Cor a	1	-3,08 \pm 0,00 ^{BC}	-2,46 \pm 0,20	-2,36 \pm 0,49	-2,66 \pm 0,13 ^A
	7	-3,00 \pm 0,09 ^{ABb}	-2,33 \pm 0,09 ^a	-2,70 \pm 0,18 ^{ab}	-2,60 \pm 0,05 ^{Aab}
	14	-3,52 \pm 0,17 ^{Cb}	-2,85 \pm 0,15 ^a	-2,93 \pm 0,02 ^a	-3,49 \pm 0,13 ^{Bb}
	21	-2,57 \pm 0,11 ^A	-2,64 \pm 0,11	-2,31 \pm 0,16	-2,55 \pm 0,04 ^A
	28	-2,82 \pm 0,18 ^{AB}	-2,88 \pm 0,33	-2,78 \pm 0,08	-3,24 \pm 0,07 ^B
Cor b	1	13,79 \pm 0,00 ^{Ba}	13,87 \pm 0,18 ^a	11,86 \pm 0,16 ^b	12,17 \pm 0,60 ^{Bb}

	7	14,32 ±0,00 ^{AB}	13,52 ±0,96	12,59 ±1,01	11,90 ±0,04 ^B
	14	15,45 ±0,41 ^{Aba}	14,11 ±1,03 ^{ab}	11,75 ±0,30 ^b	12,39 ±0,23 ^{Bb}
	21	14,42 ±0,38 ^{AB}	14,26 ±0,57	13,86 ±0,04	13,28 ±0,93 ^{AB}
	28	16,65 ±1,27 ^{Aa}	14,78 ±0,05 ^{ab}	13,25 ±0,79 ^b	15,05 ±0,01 ^{Aab}
<i>Textura</i>					
Dureza	1	115,31 ±11,82 ^c	355,05 ±31,98 ^a	225,70 ±6,64 ^{bB}	115,53 ±5,18 ^{cC}
	7	131,15 ±10,58 ^c	355,05 ±31,98 ^a	225,70 ±6,64 ^{bB}	115,53 ±5,18 ^{cC}
	14	126,24 ±0,23 ^b	762,49 ±201,23 ^a	208,61 ±48,44 ^{bB}	335,50 ±41,19 ^{bA}
	21	150,31 ±45,88 ^c	756,87 ±43,49 ^a	337,17 ±9,81 ^{bA}	191,788 ±6,81 ^{cB}
	28	150,30 ±1,24 ^b	602,92 ±122,00 ^a	202,29 ±38,16 ^{bB}	284,82 ±10,12 ^{bA}
Adesividade	1	-732,01 ±50,90 ^{aA}	-1979,42 ±0,88 ^c	-1749,45 ±99,95 ^b	-869,59 ±2,01 ^{aA}
	7	-732,01 ±50,90 ^{aA}	-1969,91 ±16,49 ^c	-1601,97 ±108,63 ^b	-869,59 ±2,01 ^{aA}
	14	-1080,74 ±97,26 ^{ab}	-1953,05 ±31,09 ^b	-1946,00 ±15,25 ^b	-1867,94 ±12,80 ^{bD}
	21	-1730,23 ±45,62 ^{cC}	-1935,55 ±41,40 ^b	-1802,15 ±44,02 ^{bc}	-1360,73 ±64,22 ^{aB}
	28	-1270,98 ±74,79 ^{ab}	-2063,47 ±73,17 ^c	-1788,16 ±137,51 ^{bc}	-1698,36 ±127,65 ^{bc}
Elasticidade	1	0,92 ±0,00 ^{aA}	0,05 ±0,01 ^c	0,47 ±0,12 ^b	0,95 ±0,00 ^{aA}
	7	0,93 ±0,01 ^{aA}	0,09 ±0,03 ^c	0,47 ±0,12 ^b	0,95 ±0,01 ^{aA}
	14	0,93 ±0,00 ^{aA}	0,07 ±0,01 ^b	0,87 ±0,15 ^a	0,30 ±0,02 ^{bC}
	21	0,93 ±0,00 ^{aA}	0,06 ±0,01 ^b	0,80 ±0,23 ^a	0,61 ±0,06 ^{aB}
	28	0,60 ±0,06 ^{ab}	0,06 ±0,02 ^c	0,42 ±0,04 ^b	0,33 ±0,03 ^{bC}
Coesividade	1	0,75 ±0,03 ^{aA}	0,07 ±0,02 ^{Cb}	0,24 ±0,10 ^b	0,82 ±0,00 ^{aA}
	7	0,73 ±0,02 ^{aA}	0,07 ±0,02 ^{Cb}	0,42 ±0,14 ^b	0,82 ±0,00 ^{aA}
	14	0,77 ±0,01 ^{aA}	0,07 ±0,01 ^{Bb}	0,75 ±0,12 ^a	0,24 ±0,06 ^{bB}
	21	0,79 ±0,00 ^{aA}	0,07 ±0,01 ^{Bb}	0,82 ±0,10 ^a	0,68 ±0,10 ^{aA}
	28	0,57 ±0,06 ^B	0,69 ±0,18 ^A	0,55 ±0,30	0,38 ±0,08 ^B
Gomosidade	1	83,25 ±8,50 ^{aA}	29,21 ±0,15 ^{Bb}	109,61 ±13,27 ^{aA}	94,05 ±3,65 ^{aB}
	7	83,25 ±8,50 ^{aA}	29,21 ±0,15 ^{Bb}	92,47 ±10,84 ^{aAB}	94,05 ±3,65 ^{aB}
	14	84,14 ±5,79 ^{aA}	49,15 ±5,54 ^{Ba}	69,11 ±13,94 ^{abAB}	86,43 ±2,73 ^{aBC}
	21	46,02 ±1,05 ^{bB}	46,87 ±4,34 ^{Ba}	110,88 ±2,03 ^{aA}	119,80 ±1,85 ^{aA}
	28	85,58 ±10,29 ^A	59,96 ±2,90 ^A	50,77 ±12,66 ^B	71,11 ±9,16 ^C
Mastigabilidade	1	77,80 ±8,33 ^{aA}	2,46 ±0,40 ^b	56,18 ±13,91 ^{aAB}	89,15 ±2,75 ^{aAB}
	7	84,71 ±13,33 ^{abA}	2,31 ±0,39 ^c	46,34 ±27,83 ^{bcAB}	100,59 ±19,91 ^{aA}
	14	59,26 ±4,02 ^{bA}	2,67 ±0,00 ^d	91,64 ±6,01 ^{aA}	25,99 ±2,63 ^{cC}
	21	11,08 ±0,57 ^{bcB}	3,46 ±0,54 ^c	56,12 ±22,16 ^{abAB}	73,63 ±8,02 ^{aAB}
	28	55,16 ±5,48 ^{aA}	3,15 ±0,60 ^c	24,63 ±8,59 ^{bB}	46,88 ±7,11 ^{aBC}
Resiliência	1	0,01 ±0,01 ^{ab}	0,01 ±0,00 ^b	0,07 ±0,01 ^{aA}	0,05 ±0,04 ^{abA}
	7	0,02 ±0,01 ^a	0,01 ±0,00 ^{ab}	0,01 ±0,00 ^{bB}	0,01 ±0,00 ^{abB}
	14	0,02 ±0,00 ^a	0,01 ±0,00 ^b	0,01 ±0,00 ^{bB}	0,01 ±0,00 ^{bAB}
	21	0,02 ±0,00 ^a	0,01 ±0,00 ^b	0,01 ±0,00 ^{bB}	0,01 ±0,00 ^{bAB}
	28	0,02 ±0,00 ^a	0,01 ±0,00 ^b	0,01 ±0,00 ^{bB}	0,02 ±0,00 ^{aAB}

RC – Requeijão Caprino Controle; RProb - Requeijão Caprino Probiótico; RPreb - Requeijão Caprino Prebiótico; RSimb - Requeijão Caprino Simbiótico.

^{a-d}Média ±desvio-padrão com letras minúsculas diferentes na mesma linha diferiram entre si pelo teste de Tukey (p<0,05) entre os tratamentos.

^{A-D}Média ±desvio-padrão com letras maiúscula diferentes na mesma coluna diferiram entre si pelo teste de Tukey (p<0,05) ao longo do tempo.

Os requeijões elaborados apresentaram alta luminosidade (L*), com predomínio do componente amarelo (b*), sobre o componente verde (a*), mesmo no requeijão controle, como pode ser observado na tabela 2. De acordo com Lucas (2008) a produção de insumos a

partir do leite caprino convencionalmente, são mais brancos se comparados ao produzidos com leite de vaca devido à característica de que as cabras convertem o betacaroteno em vitamina A, e através da produção de glóbulos de gordura de menor tamanho.

Se compararmos todos os tratamentos entre os dias 1 e 28, observa-se que houve um aumento ($p < 0,05$) no componente b^* o que pode ser justificado devido à oxidação dos ácidos graxos e uma possível atividade proteolítica decorrente do armazenamento de matrizes lácteas. A formação de compostos amarronzados é uma característica em produtos lácteos durante o tempo de armazenagem, atribuída a reações de escurecimento não enzimático pela reação de Maillard (Farkye; Smith; Schönrock 2001).

Os valores médios para os parâmetros de textura dos requeijões cremosos caprinos durante 28 dias de armazenamento a 10°C estão também representados na tabela 2. Após 28 dias de armazenamento observou-se aumento ($p < 0,05$) na dureza para dos requeijões RC, RProb, RSimb. A adesividade aumentou de acordo com o tempo de armazenamento para todas as amostras, onde pode ser observado através da comparação entre os tempos 1 e 28 dias, sendo o requeijão RC o que maior obteve aumento neste parâmetro.

A coesividade aumentou ($p < 0,05$) ao longo do tempo (entre 1 e 28 dias), para todas as amostras, com exceção apenas para o requeijão RSimb. A gomosidade reduziu ($p < 0,05$) para os requeijões (RPreb e RSimb) e aumentou ($p < 0,05$) apenas para o requeijão RProb. Comparando o tempo de armazenamento do 1º ao 28º dia, para a mastigabilidade, houve diferença ($p < 0,05$), com redução apenas para o requeijão RS, porém, quanto a resiliência ao compararmos a esta mesma faixa de tempo, não houve diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre todas as amostras.

O aumento do teor de dureza para as amostras RProb e RSimb, corroborou com os maiores índices de acidez (descrito abaixo) analisados para essas amostras do 1º ao 28º dia de armazenamento, demonstrando que o aumento nos níveis de acidez pode contribuir para um

aumento da dureza dos requeijões. Segundo Drunkler (2009), a dureza, elasticidade e gomosidade de requeijões diminuem de acordo com o teor de sal emulsificante adicionado durante a elaboração desse tipo de matriz. Outros parâmetros como pH e umidade, são fatores determinantes para a caracterização na obtenção final de um requeijão.

3.3 Características físicas e físico-químicas

Na Tabela 3 são apresentados os valores médios das variáveis físicas e físico-químicas dos requeijões cremosos caprinos durante a vida de prateleira sob armazenamento refrigerado.

Tabela 3 – Valores médios (\pm desvio padrão) das variáveis físicas e físico-químicas dos requeijões caprinos com potencial funcional durante armazenamento refrigerado.

VARIÁVEIS	DIAS	REQUEIJÕES CREMOSOS CAPRINOS			
		RC	RPro	RPre	RSimb
Aa*	1	0,98 \pm 0,00	0,98 \pm 0,00	0,98 \pm 0,00	0,98 \pm 0,00
	7	0,98 \pm 0,00	0,98 \pm 0,00	0,98 \pm 0,00	0,98 \pm 0,00
	14	0,98 \pm 0,00	0,98 \pm 0,00	0,98 \pm 0,00	0,98 \pm 0,00
	21	0,98 \pm 0,00	0,98 \pm 0,00	0,98 \pm 0,00	0,98 \pm 0,00
	28	0,98 \pm 0,00	0,98 \pm 0,00	0,98 \pm 0,00	0,98 \pm 0,00
Cloretos	1	0,82 \pm 0,00 ^{Ea}	0,61 \pm 0,00 ^{Cb}	0,61 \pm 0,00 ^{Bb}	0,52 \pm 0,00 ^{Cc}
	7	1,23 \pm 0,00 ^{Da}	1,02 \pm 0,01 ^{Cb}	1,02 \pm 0,01 ^{Ab}	1,03 \pm 0,01 ^{Bb}
	14	1,34 \pm 0,01 ^{Cb}	1,04 \pm 0,00 ^{Ba}	1,04 \pm 0,01 ^{Ab}	1,02 \pm 0,01 ^{Bb}
	21	1,36 \pm 0,00 ^{Ba}	1,03 \pm 0,01 ^{Cb}	1,03 \pm 0,01 ^{Ab}	1,03 \pm 0,01 ^{Bb}
	28	1,45 \pm 0,00 ^{Aa}	1,19 \pm 0,07 ^{Ab}	1,04 \pm 0,01 ^{Ac}	1,14 \pm 0,00 ^{Ab}
Umidade (g/100 g)	1	65,98 \pm 0,22 ^{Ab}	68,38 \pm 0,16 ^{Aa}	68,09 \pm 0,12 ^{Aa}	64,28 \pm 0,05 ^c
	7	64,97 \pm 0,15 ^{ABb}	68,16 \pm 0,09 ^{Aa}	67,91 \pm 0,01 ^{Aa}	63,96 \pm 0,12 ^c
	14	64,39 \pm 0,51 ^{Bb}	67,97 \pm 0,13 ^{Aa}	68,33 \pm 0,19 ^{Aa}	64,19 \pm 0,46 ^b
	21	64,12 \pm 0,24 ^{Bc}	66,61 \pm 0,13 ^{Bb}	67,34 \pm 0,19 ^{Ba}	63,97 \pm 0,09 ^c
	28	64,66 \pm 0,57 ^{ABb}	66,92 \pm 0,02 ^{Ba}	64,23 \pm 0,02 ^{Cb}	63,61 \pm 0,31 ^b
EST** (g/100 g)	1	34,02 \pm 0,22 ^{Bb}	31,62 \pm 0,16 ^{Bc}	31,91 \pm 0,12 ^{Cc}	35,72 \pm 0,05 ^a
	7	35,03 \pm 0,15 ^{ABb}	31,84 \pm 0,09 ^{Bc}	32,09 \pm 0,01 ^{Cc}	36,04 \pm 0,12 ^a
	14	35,61 \pm 0,51 ^{Aa}	32,04 \pm 0,13 ^{Bb}	31,67 \pm 0,19 ^{Cb}	35,81 \pm 0,46 ^a
	21	35,88 \pm 0,24 ^{Aa}	33,40 \pm 0,13 ^{Ab}	32,66 \pm 0,19 ^{Bc}	36,03 \pm 0,09 ^a
	28	35,34 \pm 0,57 ^{Aba}	33,08 \pm 0,02 ^{Ab}	35,77 \pm 0,02 ^{Aa}	36,40 \pm 0,31 ^a
RMF*** (g/100 g)	1	3,64 \pm 0,05 ^{BCa}	3,57 \pm 0,03 ^{Bab}	3,19 \pm 0,03 ^{Bc}	3,45 \pm 0,02 ^b
	7	3,76 \pm 0,00 ^{Ba}	3,66 \pm 0,01 ^{Aa}	3,18 \pm 0,02 ^{Bc}	3,48 \pm 0,06 ^b
	14	3,94 \pm 0,07 ^{Aab}	3,65 \pm 0,02 ^{ABb}	3,35 \pm 0,04 ^{Ac}	3,60 \pm 0,04 ^a
	21	3,65 \pm 0,02 ^{BCa}	3,58 \pm 0,01 ^{Ba}	3,27 \pm 0,03 ^{ABb}	3,59 \pm 0,05 ^a
	28	3,56 \pm 0,04 ^{Ca}	3,66 \pm 0,01 ^{Aa}	3,21 \pm 0,01 ^{Bb}	3,63 \pm 0,05 ^a
Proteína (g/100 g)	1	13,85 \pm 0,14 ^{Aa}	12,18 \pm 0,08 ^{Ac}	8,74 \pm 0,06 ^{Cd}	12,99 \pm 0,03 ^{Bb}
	7	10,64 \pm 0,01 ^{Cab}	11,10 \pm 0,16 ^{Ba}	9,83 \pm 0,53 ^{Bb}	11,66 \pm 0,20 ^{Ca}
	14	12,80 \pm 0,46 ^{Bab}	12,26 \pm 0,26 ^{Ab}	10,40 \pm 0,05 ^{ABc}	13,67 \pm 0,03 ^{Aa}

	21	14,13 ±0,01 ^{Aa}	12,55 ±0,11 ^{Ac}	10,83 ±0,00 ^{Ad}	13,34 ±0,01 ^{ABb}
	28	13,28 ±0,21 ^{Aba}	12,50 ±0,21 ^{Ab}	10,84 ±0,06 ^{Ac}	13,23 ±0,11 ^{Ba}
Gordura (g/100 g)	1	12,31 ±0,05 ^{Aa}	10,68 ±0,06 ^{Ac}	11,48 ±0,22 ^{Ab}	10,48 ±0,08 ^{Ac}
	7	10,39 ±0,10 ^{Ca}	9,07 ±0,07 ^{Cb}	9,30 ±0,12 ^{Cb}	8,49 ±0,03 ^{Cc}
	14	10,28 ±0,06 ^{Ca}	9,95 ±0,05 ^{Bb}	10,01 ±0,06 ^{Bb}	9,02 ±0,08 ^{Bc}
	21	11,29 ±0,17 ^{Ba}	10,23 ±0,03 ^{Bb}	9,52 ±0,14 ^{BCc}	7,80 ±0,00 ^{Dd}
	28	8,26 ±0,02 ^D	8,40 ±0,12 ^D	8,48 ±0,09 ^D	8,35 ±0,03 ^C
Calorias (Kcal/100 g)	1	183,08 ±0,81 ^{Aba}	165,56 ±0,43 ^{Bc}	172,27 ±1,68 ^{Ab}	181,46 ±0,14 ^{Aa}
	7	177,04 ±1,12 ^{Ba}	158,09 ±0,06 ^{Dd}	162,16 ±0,46 ^{Bc}	172,69 ±0,91 ^{BCb}
	14	178,08 ±2,01 ^{Ba}	163,29 ±0,35 ^{Cb}	163,32 ±0,58 ^{Bb}	173,92 ±1,62 ^{Ba}
	21	185,34 ±1,89 ^{Aa}	170,41 ±0,68 ^{Ab}	165,17 ±0,01 ^{Bc}	168,80 ±0,15 ^{Cbc}
	28	168,38 ±2,53 ^{Ca}	159,69 ±0,66 ^{Db}	172,63 ±0,38 ^{Aa}	172,83 ±1,34 ^{BCa}

* Atividade de Água; ** Extrato Seco Total; *** Resíduo Mineral Fixo.

RC – Requeijão Caprino Controle; RProb - Requeijão Caprino Probiótico; RPreb - Requeijão Caprino Prebiótico; RSimb - Requeijão Caprino Simbiótico.

^{a-d}Média ±desvio-padrão com letras minúsculas diferentes na mesma linha diferiram entre si pelo teste de Tukey (p<0,05) entre os tratamentos.

^{A-E}Média ±desvio-padrão com letras maiúscula diferentes na mesma coluna diferiram entre si pelo teste de Tukey (p<0,05) ao longo do tempo.

Os níveis experimentais de atividade de água não apresentaram diferença significativa (p>0,05) para todas as amostras, nem tampouco ao longo da vida de prateleira. Com valores representados por 0,98 ±0,00, verifica-se que se trata de um produto com um nível acentuado de água disponível para utilização de estirpes microbianas, tornando o produto perecível, por se tratar de um produto fresco e sem maturação, características peculiares da tecnologia do seu processamento, a exemplo da adição de nata ou creme de leite.

O teor de umidade diminuiu (p<0,05) com o passar do período de armazenamento para as amostras RPro e RPre, corroborando com o aumento da matéria seca. Valores semelhantes para umidade foram encontrados por Soares et al. (2002) em requeijão com teor reduzido de gordura e por Oliveira et al. (2014) em queijo de coalho caprino de potencial probiótico. Entre os tratamentos, de RPro e RPre não houve diferença (p>0,05) de acordo com os tempos 1, 7 e 14 dias de armazenamento, porém, quando em comparação aos demais produtos, nestes mesmos tempos, observa-se diferença (p<0,05). Quanto ao resíduo mineral fixo (RMF), os níveis experimentais não apresentaram diferença significativa (p>0,05) para todas as amostras.

Segundo Guamis et al. (1997), o conteúdo de sal em queijos define a viabilidade e desenvolvimento dos micro-organismos, assim como a cinética das reações enzimáticas durante o período de armazenagem. Em relação ao teor de cloretos, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre todas as demais amostras e o requeijão do grupo controle (RC). Ao longo do tempo, verificou-se que houve um aumento ($p < 0,05$) da concentração do NaCl nas amostras, principalmente entre o tempo 1 e 28 dias de armazenamento refrigerado. Kondyli, Pappa & Svarnas (2016) obtiveram resultados semelhantes aos encontrados nesta pesquisa, quando avaliaram as alterações causadas pelo armazenamento de queijo branco fabricado partir do leite de cabra, quando observaram um desequilíbrio na concentração de NaCl a partir dos estágios iniciais (logo após a fabricação), até o fim da vida de prateleira.

Na elaboração de queijos, o tipo de sal adicionado influencia na peptização da caseína e no grau de emulsificação de gordura, parâmetros que afetam as características do produto final. A peptização, consta na separação dos maiores agregados hidrofóbicos de caseína e expõe os seus grupos polares e apolares, permitindo que a caseína atue como um emulsionante na interface água e óleo (Guinee; Caric; Kalab, 2004; Cunha; Alcântara; Viotto et al., 2012).

Em relação ao aumento no teor de proteínas, esse foi observado apenas para RPre, isso, quando comparado o tempo 1 e 28 ($p < 0,05$), em relação aos demais tempos e as demais amostras, não houve um aumento ($p < 0,05$), apenas uma manutenção nas concentrações, corroborando com os dados obtidos por Drunkler (2009), em requeijões cremosos caprinos simbióticos. De um modo geral também não houve diferença significativa para o teor de gordura ($p > 0,05$).

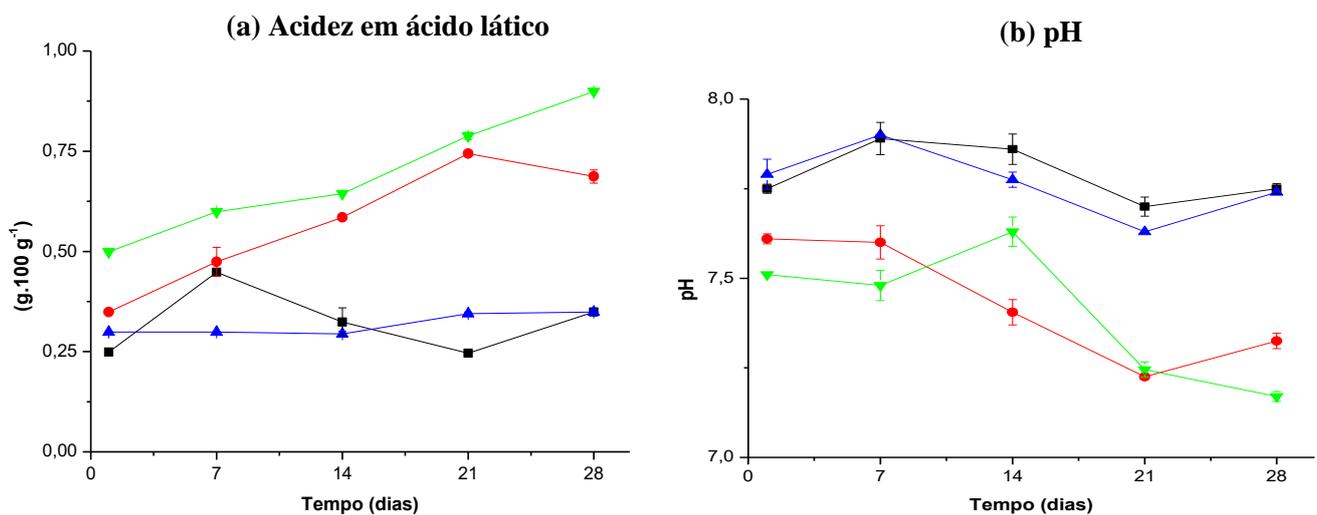
Os valores médios de acidez, pH e açúcares totais dos requeijões cremosos caprinos com potencial funcional durante armazenamento refrigerado são apresentados na Fig. 1. Foi observado um aumento da acidez de forma significativa ($p < 0,05$) para os requeijões

probiótico (RPro) e simbiótico (RSimb) ao longo da vida de prateleira, quando comparados aos requeijões controle (RC) e prebiótico (RPre), de forma que o requeijão simbiótico (RSimb), pela presença da inulina na sua composição, apresentou maior concentração de ácido láctico, quando comparado ao requeijão adicionado apenas do *L. casei* subsp. *paracasei*. Tal comportamento é atribuído devido ao efeito prebiótico promovido pela inulina, promovendo uma maior atuação das bactérias naturais do leite e, conseqüentemente, maior metabolismo da lactose e demais açúcares presentes em açúcares mais simples, com formação de maior quantidade de ácido láctico nesta amostra, detectados pelo método analítico utilizado. Segundo Macedo et al. (2008), a formação de ácidos em um produto contribui para desestabilização das micelas de caseína e proporcionam um sabor e odor ácido característico da matriz. O armazenamento de produtos lácteos fermentados refrigerados pode promover um aumento da acidez titulável, de acordo com a ação dos micro-organismos presentes e seu poder de acidificação do meio, ou através da temperatura de estocagem ou tempo de exposição do produto a estas condições.

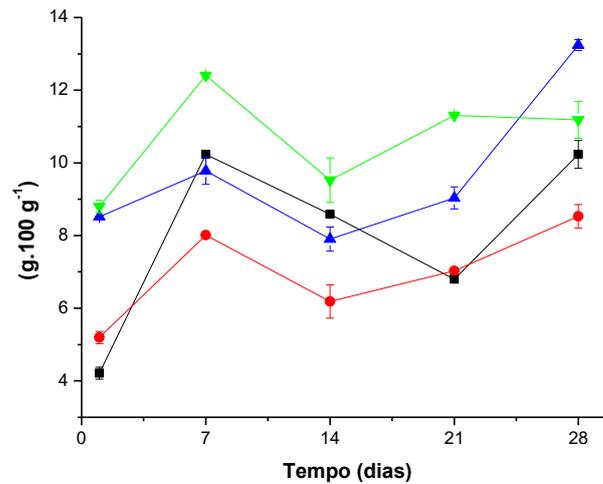
Em relação aos valores de pH, estes obtiveram um leve aumento para RC e RPre e uma leve redução para as demais amostras no primeiro tempo de armazenamento sob refrigeração; porém, observaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) para os requeijões que continham o *L. casei* subsp. *paracasei* (RPro e RSimb) com uma redução de pH intensa, a partir do 7° e 14° dia de armazenamento refrigerado, respectivamente, atingindo valores inferiores a 7,5 g/100 g. Já os requeijões que não continham a estirpe probiótica (RC e RPre) mantiveram seus valores de pH acima de 7,5 g/100 g, apesar de também apresentarem uma redução significativa ($p < 0,05$) a partir do 14° e 7° dias de armazenamento refrigerado, respectivamente. Geralmente, os produtos são mais duráveis quando possuem uma acidificação retardada (Ong; Henriksson; Shah, 2006), porém, queijos com altos níveis de pH e umidade, tornam-se mais susceptíveis à degradação por micro-organismos deteriorantes

(Cunha; Viotto; Viotto, 2006). A presença de culturas benéficas (bactérias lácticas probióticas) pode causar alterações no alimento de forma positiva em detrimento da flora patogênica ou deteriorante, como reduções no pH, promovendo uma modificação do meio via mecanismo de competição. Resultados semelhantes ao dessa pesquisa foram encontrados por Buriti et al. (2005), Souza (2006), Ribeiro et al. (2009), Buriti; Cardarelli; Saad (2009) e Teixeira (2012), que mostraram a ação de probióticos ao promover um maior consumo de lactose, elevando a acidez e diminuindo o pH de derivados lácteos, em comparação ao queijo tradicional (controle).

Figura 2 - Valores médios de acidez em ácido láctico (a), pH (b) e açúcares totais (c) dos requeijões cremosos caprinos com potencial funcional durante armazenamento. IC (■) – requeijão controle; RProb (●) – Requeijão probiótico adicionado de *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei*; RPreb (▲) – Requeijão prebiótico adicionado de inulina e RSimb (▼) – Requeijão simbiótico adicionado de *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* e inulina.



(c) Açúcares Totais



Comparando o 1º com o 28º dia de armazenamento refrigerado, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) no teor de açúcares totais, principalmente para as amostras RPre e RSimb, possivelmente em virtude da presença do prebiótico inulina nas suas formulações, cujos açúcares foram quantificados pelo método utilizado para determinação deste parâmetro físico-químico.

Os valores médios para os parâmetros de proteólise de requeijões cremosos caprinos com potencial funcional durante 28 dias de armazenamento refrigerado são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores médios (\pm desvio padrão) para os parâmetros de proteólise dos requeijões cremosos caprinos com potencial funcional durante armazenamento refrigerado.

VARIÁVEIS	DIAS	REQUEIJÕES CREMOSOS CAPRINOS			
		RC	RPro	RPre	RSimb
IEP	1	2,83 \pm 0,00 ^{Bb}	3,01 \pm 0,03 ^{Ba}	2,47 \pm 0,01 ^{Cc}	2,46 \pm 0,01 ^{Ec}
	7	3,61 \pm 0,05 ^{Aa}	2,24 \pm 0,05 ^{Cd}	2,52 \pm 0,03 ^{Cc}	2,91 \pm 0,01 ^{Bb}
	14	2,37 \pm 0,02 ^{Cc}	3,54 \pm 0,07 ^{Aa}	3,05 \pm 0,02 ^{Ab}	3,65 \pm 0,01 ^{Aa}
	21	1,77 \pm 0,06 ^{Dc}	2,49 \pm 0,10 ^{Cb}	2,95 \pm 0,00 ^{Ba}	2,81 \pm 0,01 ^{Ca}
	28	2,24 \pm 0,03 ^{Cc}	2,37 \pm 0,04 ^{Cb}	2,26 \pm 0,02 ^{Dc}	2,74 \pm 0,02 ^{Da}
IPP	1	1,42 \pm 0,00 ^{Cc}	1,51 \pm 0,01 ^{Bb}	1,66 \pm 0,01 ^{Ca}	1,64 \pm 0,01 ^{Ca}
	7	1,44 \pm 0,02 ^{Cc}	1,48 \pm 0,02 ^{Bc}	1,69 \pm 0,02 ^{Cb}	2,16 \pm 0,01 ^{Aa}
	14	1,19 \pm 0,01 ^{Dd}	1,42 \pm 0,03 ^{Bc}	1,56 \pm 0,01 ^{Db}	1,72 \pm 0,01 ^{Ba}
	21	1,78 \pm 0,06 ^{Bb}	1,24 \pm 0,05 ^{Cd}	2,15 \pm 0,00 ^{Ba}	1,41 \pm 0,00 ^{Dc}
	28	2,24 \pm 0,03 ^{Aa}	1,78 \pm 0,03 ^{Ab}	2,26 \pm 0,02 ^{Aa}	1,37 \pm 0,01 ^{Ec}

IEP – Índice de Extensão da Proteólise; IPP – Índice de Profundidade da Proteólise.

^{a-d} Média \pm desvio-padrão com letras minúsculas diferentes na mesma linha diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

^{A-E} Média \pm desvio-padrão com letras maiúscula diferentes na mesma coluna diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ao longo do tempo.

A proteólise caracteriza-se por ser um dos eventos bioquímicos primordiais para o surgimento de características peculiares dos queijos durante o armazenamento, isto ocorre devido à produção de aminoácidos e peptídeos, além de outras substâncias (Souza et al., 2001).

O tempo de armazenamento dos requeijões promoveu diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todas as amostras, de acordo com os tempos 1, 7, 14, 21 e 28 dias, onde, o Índice de Extensão da Proteólise (IEP) aumentou apenas para a amostra RSimb, possivelmente pode ter ocorrido em virtude da presença da inulina que pode ter induzido uma maior síntese por parte da flora natural do leite e do *L. casei* subsp. *paracasei*, em conjunto, de proteinases, favorecendo a degradação das proteínas em peptídeos de alto peso molecular (Nartimatsu et al., 2003).

Quanto ao Índice de Profundidade da Proteólise (IPP), também foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) para todas as amostras e de acordo com o tempo de armazenamento, com maior índice para os requeijões RPre nos tempos 21° e 28° dias e para a amostra RSimb, nos dias 7° e 14°. Houve aumento da proteólise em profundidade ($p < 0,05$) ao longo da vida de prateleira para todas as amostras, com exceção do RSimb que diminuiu ($p < 0,05$). Bergamini et al. (2006) ao avaliar queijos semiduros suplementados com *L. acidophilus* e *L. paracasei* observaram resultados antagônicos ao encontrado nesta pesquisa, ou seja, não houve diferença estatística ($p > 0,05$), o que pode estar atribuído a característica física de um queijo duro ou semiduro para desenvolvimento dos micro-organismos, já que para Araújo et al. (2010), o requeijão ou queijo cremoso possui um perfil adequado para incorporação e ação de células probióticas e prebióticas.

O índice de profundidade da proteólise está relacionado, principalmente, com a atividade das endoenzimas e exoenzimas da cultura láctica empregada na fabricação do produto fermentado e de possíveis contaminantes, que degradam os peptídeos de alto peso molecular e de baixo peso molecular. Neste estudo, não se observou a influência da inulina quando em conjunto com o *L. casei* subsp. *paracasei* (RSimb) no aumento da degradação desses peptídeos. Desta forma, acredita-se que a proteólise ocorrida nas demais amostras foi mais em função das bactérias lácticas naturalmente presentes no leite (RC e RPre), bem como da ação conjunta desta flora natural com o *L. casei* subsp. *paracasei* (RPro). De acordo com Buriti et al. (2005), as enzimas possuem uma maior probabilidade de influenciar a proteólise secundária em queijos, do que o tipo de bactéria láctica adicionada, corroborando com os dados encontrados nesta pesquisa para IPP, em que independe da presença ou ausência do probiótico, houve aumento desse índice ao longo do armazenamento refrigerado.

A formação de compostos de azoto solúveis durante a maturação do queijo é um índice indicativo das taxas de extensão e profundidade da proteólise. Os peptídeos e caseínas de massa molecular elevada e média são progressivamente discriminados por enzimas para peptídeos de massa molecular mais baixa e aminoácidos que são solúveis em TCA a 12% e, por conseguinte, a quantidade de 12% de azoto solúvel em TCA aumenta com a idade de maturação do queijo (Fox et al., 1993; Kondyli; Pappa; Svarnas, 2016), confirmando ao que foi observado para as amostras RC, RPro e RPre.

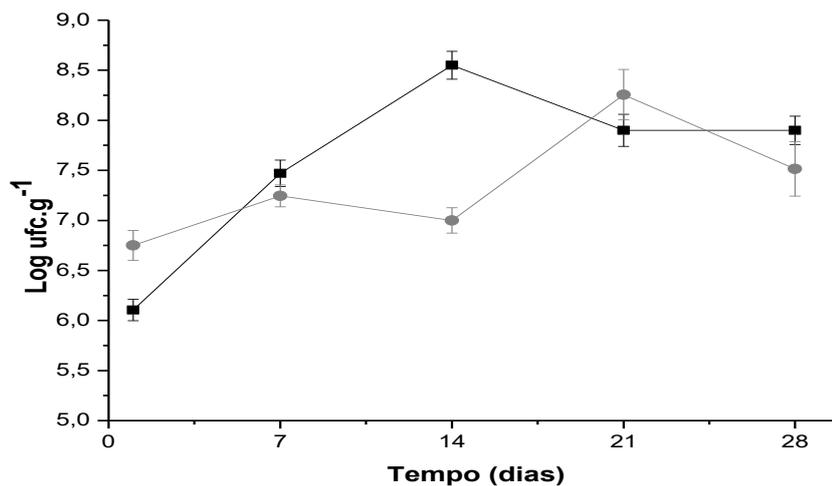
3.4 Qualidade sanitária dos requeijões e viabilidade do L. casei subsp. paracasei adicionado ao requeijão RPro e RSimb durante armazenamento refrigerado

De acordo com os dados obtidos nas análises de qualidade microbiológica, constatou-se que não houve crescimento de micro-organismos indesejáveis, comprovando que os requeijões cremosos caprinos estavam aptos ao consumo humano, e de acordo com o que

preconiza a legislação vigente pra coliformes totais e fecais, bolores e leveduras. Houve ainda, a ausência de contagens acima do limite estabelecido para *Staphylococcus coagulase* positiva e ausência na detecção de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* (BRASIL, 2007).

Na Figura 3 é apresentada a viabilidade do *L. casei* subsp. *paracasei* durante a vida de prateleira do requeijão probiótico e simbiótico sob temperatura de refrigeração.

Figura 3 - Viabilidade do *L. casei* subsp. *paracasei* nos requeijões cremosos caprinos com potencial funcional durante armazenamento refrigerado. RPro (■) - Requeijão caprino probiótico e RSimb (●) - Requeijão caprino simbiótico.



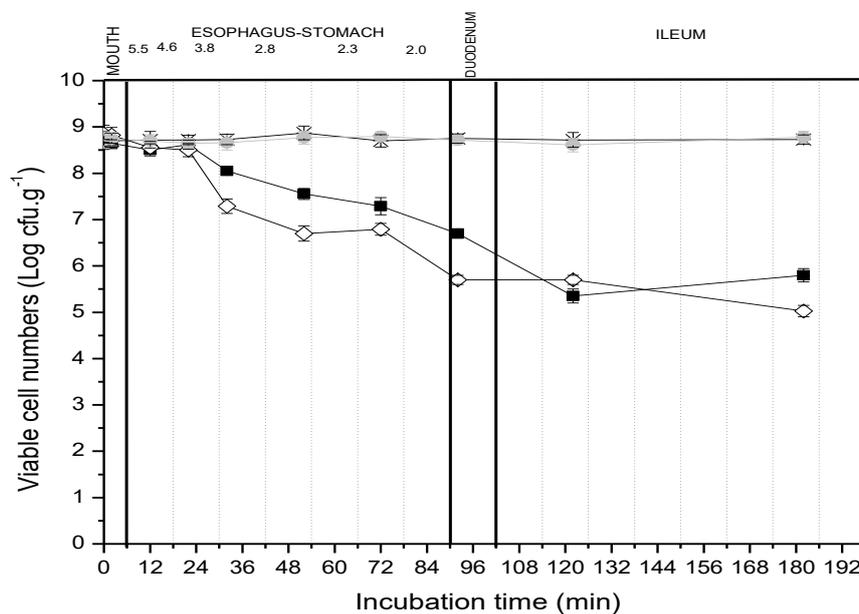
Em relação à viabilidade das amostras adicionadas do micro-organismo *L. casei* subsp. *paracasei*, houve crescimento pouco depois do início do armazenamento e um aumento significativo ($p < 0,05$) a partir do 7º dia, onde, as amostras RPro e RSimb, passaram de contagens iniciais a 6,0 e 6,7 log ufc.g⁻¹ para 7,5 a 7,3 log ufc.g⁻¹ respectivamente. A partir do 14º dia a amostra RPro volta a crescer ($p < 0,05$), atingindo contagens próximas a 8,5 ufc.g⁻¹ já a amostra RSimb, tende a cair ($p > 0,05$) próximo a suas contagens iniciais. Com 21 dias de armazenamento, há um aumento no número de estirpes RSimb ($p < 0,05$), que se recupera e atinge contagens maiores que 8,0 log ufc.g⁻¹, porém, RPro reduz a sua população, mantendo-se estável até o 28º dia ($p > 0,05$), contudo, a amostra RSimb após atingir um pico de

crescimento, como visto anteriormente, volta a cair no último dia de armazenamento ($p > 0,05$). As contagens finalizam com números por volta de 8,0 a 7,7 log de ufc.g⁻¹ para RPro e RSimb, apresentando uma viabilidade positiva, de acordo com o número final de contagens apresentado.

3.5 Avaliação da sobrevivência do *L. casei* subsp. *paracasei* em condições gastrointestinais simuladas

Na Figura 4, pode ser observado a viabilidade do *L. casei* subsp. *paracasei* nos requeijões cremosos caprinos probiótico (RPro) e simbiótico (RSimb) quando expostos e não expostos as condições simuladas do trato gastrointestinal (TGI).

Figura 4 - Número de células viáveis (média \pm desvio padrão) de *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* no requeijão caprino probiótico (RPro) quando expostos (■) e não expostos (×) e no requeijão caprino simbiótico (RSimb) quando expostos (◇) e não exposto (●) às condições simuladas do trato gastrointestinal em diferentes tempos de incubação. Os valores de pH que o micro-organismo foi exposto estão indicados no canto superior esquerdo do gráfico.



Desde o curso inicial das condições simuladas da digestão, a partir da boca, já é possível observar a redução das contagens do *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* para as duas amostras quando submetidas às condições simuladas, principalmente a partir da etapa ácida (Etapa 3 do esôfago-estômago) do ensaio *in vitro*, chegando a contagens de 6,7 log ufc.g⁻¹ na amostra RPro e 5,7 log ufc.g⁻¹ para a amostra RSimb. Entre o fim da etapa ácida e as duas primeiras sequencias da etapa entérica (duodeno e íleo), esses valores continuam a cair, com contagens finais na etapa do íleo de 5,4 log ufc.g⁻¹ para o RPro e 5,7 log ufc.g⁻¹ para o RSimb.

Em uma pesquisa realizada com *mousses* armazenados sob refrigeração, acrescidos de *L. acidophilus* e submetidos as condições gastrointestinais *in vitro*, observou-se uma redução similar após as duas primeiras horas, igualmente as contagens obtidas neste estudo, podendo ser observada diminuição na viabilidade mesmo durante minutos iniciais e nesta fase do estudo (Buriti, 2008).

Para as amostras probióticas analisadas (RPro e RSimb) foi permitido observar a sensibilidade do *L. casei* subsp. *paracasei* ao HCL e pepsina, tendo em vista que nesta etapa houve uma grande redução da viabilidade para as duas formulações propostas. Esses achados corroboram com Buriti (2008) ao verificar comportamento similar para *L. acidophilus*, e também com Teixeira (2012), ao avaliar o comportamento de *L. acidophilus* e *B. bifidum* em amostras de requeijão cremoso sob simulação de digestão ácida. Oliveira et al. (2014), ao verificar a sobrevivência de *L. paracasei* frente as condições gastrointestinais simuladas, em um queijo caprino, tipo coalho verificou uma redução bastante significativa da estirpe a um pH 2,8. Condições semelhantes foram observadas para essa mesma estirpe, porém, com uma matriz diferente, um queijo bovino português (Madureira et al., 2005); ambas as pesquisas corroboram com os resultados obtidos neste estudo, de acordo com a contagem de *L. paracasei* para esse tipo e etapa da análise.

A sequência do intestino delgado promoveu reduções significativas ($p < 0,05$) nas amostras. Entende-se que houve uma sensibilidade a etapa correspondente ao duodeno, onde a cepa já fragilizada pela ação do ácido, ao entrar em contato com a solução intestinal, composta pelos sais de bile e pancreatina, contribuiu para a continuidade da sua redução. Desse modo, reforça-se que pelo fato dos sais de bile na digestão alimentar serem responsáveis pela emulsificação e solubilização das gorduras, possivelmente houve um comprometimento das proteínas e fosfolípídeos da membrana celular das bactérias, causando um desequilíbrio homeostático (Begley et al., 2005), corroborando para redução das suas contagens. Todavia, ao final da digestão simulada *in vitro* (Etapa do Íleo), observa-se uma recuperação do micro-organismo adicionado ao RPro, finalizando com uma contagem de $6,0 \log \text{ ufc.g}^{-1}$; enquanto que o RSimb apresentou contagens menores, $5,2 \log \text{ ufc.g}^{-1}$, demonstrando que houve redução significativa ($p < 0,05$).

Para alguns pesquisadores a sensibilidade das bactérias probióticas à acidez e a bile depende em maior ou menor grau da espécie e gênero, dificultando a sobrevivência dessas estirpes sobre os testes simulados com sucos gástricos e entéricos (Truelstrup Hansen et al., 2002; Takahashi et al., 2004; Collado et al., 2006).

Apesar da redução significativa observada na simulação *in vitro* do TGI, o *L. casei* subsp. *paracasei* permaneceu viável, em ambas amostras, principalmente no requeijão sem inulina (RProb), mostrando que a proteção da estirpe se deu principalmente em função da matriz alimentar (requeijão) do que da presença do prebiótico (inulina) em si. Assim, o requeijão cremoso caprino destaca-se por ser um excelente alimento para veicular este tipo de probiótico, de forma suficiente para exercer benefícios à saúde, de modo que segundo a legislação brasileira, é necessário que ao final da digestão haja uma população suficiente (independente da contagem) para causar um efeito probiótico após a passagem por sistemas simulados, não especificando a redução máxima aceitável (Brasil, 2008). Oliveira et al.

(2014) ao estudar a viabilidade de micro-organismos probióticos em queijo caprino, tipo coalho, observaram que no início da digestão simulada todas as estirpes ensaiadas (incluindo o *L. casei* subsp. *paracasei*) apresentaram contagens viáveis entre 7-8 log UFC/g. Embora no estudo supracitado, ao passar do tempo de digestão tenha sido visto queda nas contagens dos micro-organismos adicionados, ao final do processo digestório, as contagens foram satisfatórias, corroborando com a presente pesquisa.

4 Conclusão

A elaboração de diferentes tipos de requeijão cremoso, a partir do leite de cabra e com provável potencial funcional demonstrou alterações significativas em algumas características físicas e físico-químicas, como umidade, pH, acidez em ácido lático, cloretos, teor de açúcares totais entre outros resultados obtidos de acordo com as variáveis, o que em alguns casos foi atribuído tanto pela inserção do componente prebiótico, a inulina, quanto do probiótico (*L. casei* subsp. *paracasei*). A viabilidade da cultura adicionada, foi observada de forma positiva, considerando o desenvolvimento e o número final da população de micro-organismos ao longo dos 28° dias de armazenamento refrigerado, que alcançou contagens suficientes para desempenhar funções de promoção a saúde. Segundo o perfil de matriz protetora do requeijão, e principalmente no que está relacionado à sobrevivência da estirpe estudada quando exposta às condições gastrointestinais simuladas obteve-se uma redução significativa ($p < 0,05$) do número de micro-organismos nas duas amostras, porém, ao final da análise houve a presença da estirpe em contagens satisfatórias, indicando que o produto pode proporcionar benefícios a saúde dos consumidores através da sobrevivência e atuação da cultura adicionada. A presença da inulina, não resultou significativamente em uma viabilidade diferenciada do micro-organismo adicionado, tanto de acordo com o crescimento durante o

armazenamento refrigerado, quanto sob a sobrevivência da estirpe as condições simuladas do TGI.

Considerando tais aspectos, esse estudo destaca o desenvolvimento bem-sucedido de um derivado lácteo com potencial funcional, a partir do leite caprino, podendo representar uma iniciativa para produção de um novo produto que impulse a comercialização de alimentos à base dessa matéria prima, fomentando a cadeia econômica a qual está inserida, e agradando os consumidores que buscam um produto saudável.

5 Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

Referências

- Abadía-García, L., Cardator, A., Campo, S. T. M., Arvízu, S. M., Castãno-Tostado, E., Regalado-González, C., García Almendarez, B., Amaya-Lano, S. L. (2013). Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. *International Dairy Journal*, 33 (1), 191-197, 2013.
- Aoac. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. (2005) Official methods of analysis of Association of Official Agricultural Chemists. 18ª ed., Gaithersburg, AOAC.
- Almanza-Rubio, J.L., Gutiérrez-Méndez, N., Leal-Ramos, N.Y., Sepulveda, D., Salmeron, I. (2016) Modification of the textural and rheological properties of cream cheese using thermosonicated milk. *Journal of Food Engineering*, 168 (1), 223-230.
- Antunes, A. E. C., Silva, E. R. A., Marasca, E. T. G., Moreno, I., Lerayer, A. L. S. (2007) Probióticos: agentes promotores de saúde. *Journal Brazilian Society of Food and Nutrition*, 32 (3), 103-122.
- APHA. American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4ª ed., cap. 7, p. 63 – 67, 2001.
- Aqualab. Analisador de atividade de água para avaliar biodegradação (alimentos e fármacos) (2001): Modelo CX-2. Decagon Devices, Inc. 950 NE Nelson Court Pullman, WA 99163USA.
- Araújo, E. A., Carvalho, A. F., Leandro, E. S., Furtado, M. M., Moraes, C. A. (2010). Development of a symbiotic cottage cheese added with *Lactobacillus delbrueckii* H2b20 and inulin. *Journal of Functional Foods*, 2 (1), 85-89.
- Assis, P.O.A, Guerra, G.C.B., Araújo, D.F.S., Júnior, R.F.A., Machado, T.A.D.G. (2016) Intestinal anti-inflammatory activity of goat milk and goat yoghurt in the acetic acid model of rat colitis. *International Dairy Journal*, 53 (1), 45-54.
- Begley, M., Gahan, C.G.M., Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, 29 (1), 625-651.
- Bendali, F., Madi, N., Sadoun, D. (2011). Beneficial effects of a strain of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* in *Staphylococcus aureus*-induced intestinal and colonic injury. *International Journal of Infectious Diseases*, 15, 787-794.
- Bergamini, C.V., Hynes, E.R., Zalazar, C.A. (2006). Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi-hard cheese. *International Dairy Journal*, 16, 856–866.
- Bezerra, T.K.A., Arcanjo, N.M.O., Araújo, A.R.R., Queiroz, A.L.M., Oliveira, M.E.G., Gomes, A.M.P.; Madruga, M.S. (2017). Volatile profile in goat coalho cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. *LWT. Food Science and Technology*, 76, 209-215.

aBuriti, F. C. A., Rocha, J. S., Saad, S. M. I. (2005). Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *International Dairy Journal*, 38, 173-180.

bBuriti, F.C.A., Rocha, J.S., Assis, E.G., Saad, S.M.I. (2005). Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. *LWT. Food Science and Technology*, 38,173–180.

Buriti F.C.A, Komatsu, T.R., Saad, S.M.I. (2007). Activity of passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*) pulps on *Lactobacillus acidophilus* in refrigerated mousses. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 315-317.

Buriti, F. C. A., Cardarelli, H. R., SAAD, S. M. I. (2008). Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco cremoso simbiótico: implicações da adição de *Lactobacillus paracasei* e inulina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44 (1), 75-84.

Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.(2007). Departamento de inspeção de produtos de origem animal. Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados. Instrução Normativa N.º 46.

Brasil. Ministério da Saúde. (2008). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 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 02 Fev. 2017.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (1997). Secretaria da Defesa Agropecuária. Portaria nº 359, de 04 de setembro de 1997. Aprova Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Requeijão ou Requesõn. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 08 set. 1997. Seção 1, p. 43.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2000). Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Resolução N° 5. Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados. Disponível em:
<www.agricultura.gov.br/sislegis> Acesso em 02 de Fevereiro 2017.

Brighenti, M., Govindasamy-Lucey, S., Lim, K., Nelson, K., Lucey, J.A. (2008). Characterization of the rheological, textural, and sensory properties of samples of commercial USA cream cheese with different fat contents. *Journal Dairy Science*, 91, 4501-4517.
Cardarelli, H. R., Buriti, F. C. A., Castro, I. A., Saad, S.M.I. (2008). Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially symbiotic *petit-suisse* cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 41 (6), 1037-1046.

Collado, M. C., Meriluoto, J., Salminen, S. (2006). In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Research International*, 15, 570-575.

CIE - Commission Internationale de l'Éclairage. (1996). Colorimetry. Vienna: CIE publication, 2. ed.

Choi, S. Y., Chung, M. J., Lee, S. J., Shin, J. H., Sung, N. J. (2007). N-nitrosamine inhibition by strawberry, garlic, kale, and the effects of nitrite-scavenging and N-nitrosamine formation by functional compounds in strawberry and garlic. *Food Control*, 18 (5), 485–491.

Cunha, C.R., Alcântara, M. R., Viotto, W. H. (2012). Effect the Type of Emulsifying Salt on Microstructure and Rheological Properties of “Requeijão Cremoso” Processed Cheese Spreads. *Journal of Food Science*, 77 (8), 176-181.

Cunha, C.R., Viotto, W.H., Viotto, L.A. (2006). Use of low concentration factor ultrafiltration retentates in reduced fat “Minas Frescal” cheese manufacture: effect on composition, proteolysis, viscoelastic properties and sensory acceptance. *International Dairy Journal*, 16 (1), 215–224.

Desfossés-Foucault, E., Lapointe, G., Roy, D. (2014). Transcription profiling of interactions between *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 and *Lactobacillus paracasei* ATCC 334 during Cheddar cheese simulation. *International Journal of Food Microbiology*, 178, 76-86.

Drunkler, D. A. (2009). Produção de requeijão cremoso simbiótico. (Tese de doutorado) Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

Faria, E. V.; Yotsuyanagi, K. *Técnicas de Análise Sensorial*. Campinas: ITAL/LAFISE, 2002, 116 p.

Farkye N, Smith K, Schonrock F T (2001). An overview of changes in the characteristics, functionality and nutritional value of skim milk powder (SMP) during storage. Wisconsin, USA: U.S. Dairy Export Council.

Folch, J., Less, M., Stanley, S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.

Food and Agriculture Organization. (2015). United Nations/World Health Organization Statistical pocketbook world food and agriculture. Report. Roma, p. 236.

Fox, P.F., Law, J., McSweeney, P. L.H., Wallace, J. (1993). Biochemistry of cheese ripening. *Chemistry, Physics and Microbiology*, 1, 389-438.

Gomes, J. J. L., et al. (2013). Physicochemical and sensory properties of fermented dairy beverages made with goat's milk, cow's milk and a mixture of the two milks. *LWT-Food Science and Technology*. 54 (1), 18-24.

Guamis, S., Trujillo, A.J., Chiralt, A., Andres, A., Fito, P. (1997). Ripening control of Manchego type cheese salted by brine vacuum impregnation. *Journal Dairy International*, 7, 185-192.

Guinee, T.P., Caric, M.; Kal'ab, M. (2004). Pasteurized processed cheese and substitute/imitation cheese products. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, 2 (3), 349–94.

Haenlein, G.F.W., Anke, M. (2011). Mineral and trace element research in goats: A review. *Small Ruminant Research*, 95, 2–19.

Hold, K. M., De Boer, D., Zuidema, J., Maes, R. A. A. (1995). Saliva as an analytical tool in toxicology. *International Journal of Drug Testing*, 1 (1), 1–36.

JONES, R. M. (2017). The Use of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* in Clinical Trials for the Improvement of Human Health. *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*, 9, 99-108.

Kurmann, J. A., Rasic, J. L., (1991). The health potential of products containing bifidobacteria. *Therapeutic properties of fermented milks*, Elsevier, 1, 117-158.

Kondyli, E., Pappa, E.C., Svarnas, C. (2016). Ripening changes of the chemical composition, proteolysis, volatile fraction and organoleptic characteristics of a White-brined goat milk cheese. *Small Ruminant Research*, 146, 1-6.

LANARA - Laboratório Nacional de Referência Animal. (1981). Métodos de análises oficiais par controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. Brasília, DF.

Laurent, C., Besançon, P., Caporiccio, B. (2007). Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an *in vitro* digestion/caco-2 cell culture model. *Food Chemistry*, 100 (4), 1704–1712.

Lee, W. J, Lucey, J. (2010). Formation and physical properties of yogurt. *Journal of Animal Science*, 23 (9), 1127-1136.

Lucas A, Rock E, Agabriel C, Chilliard Y, Coulon, J. B. (2008) Relationships between animal species (cow versus goat) and some nutritional constituents in raw milk farmhouse cheeses. *Small Ruminant Research* 74: 243-248

Lollo, P.C.B., Cruz, A.G., Morato, P.N., Moura, C.S., Almada, C.N., Felicio, T.L., Esmerino, E.A. (2015). Hypertension parameters are attenuated by the continuous consumptions of Probiotic minas cheese. *Food Research International*, 76, 611-617.

Macedo L.N., Luchese, R.H., Guerra, A.F.; Barbosa, C.G. (2008). Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, 935-942.

Madureira, A. R., Soares, J. C., Amorim, M., Tavares, T., Gomes, A. M., Pintado, M. M., Malcata, F. X. (2012). Bioactivity of probiotic whey cheese: characterization of the content of peptides and organic acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93.

Mainville, I., Arcand, Y., Farnworth, E. R. (2005). A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 99 (3) 287–296.

MERCOSUL/GMC/RES.Nº 134/96. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade de Queijo Processado ou Fundido, Processado, Pasteurizado e Processado ou Fundido U.H.T (UAT). 1996.

Narimatsu, A., Dornellas, J. R. F., Spadoti, L. M., Pizaia, P. D., Roig, S. M. (2003). Avaliação da proteólise e do derretimento do queijo prato obtido por ultrafiltração. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23 (0).

Nilsson, A., Johansson-Boll, E., Sandberg, J., Bjork, I. (2016). Gut microbiota mediated benefits of barley kernel products on metabolism, gut hormones, and inflammatory markers as affected by co-ingestion of commercially available probiotics: a randomized controlled study in healthy subjects. *Clinical Nutrition ESPN*, 15, 49-56.

Oliveira, M. E. G., Garcia, E. F., Oliveira, C. E. V., Gomes, A. M. P., Pintado, M. M. E., Madureira, A. R. M. F., Conceição, M. L., Queiroga, R. C. R. E., Souza, E. L. (2014). Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): Survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. *Food Research International*, 64, 241-247.

Ong, L., Henriksson, A., Shah, N.P. (2006). Development of probiotic cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *International Dairy Journal*, 16, 446–456.

Penna, A., L. B.; Gomes, A.G. (2010). Caracterização de requeijão cremoso potencialmente prebiótico pela adição de inulina e proteína de soja. *Boletim do CEPPA*, 28 (2), 289-302.

Proveda, J. M., Chicón, R., Cabezas, L. (2015). Biogenic amine content and proteolysis in Manchego cheese manufactured with *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* as adjunct and other autochthonous strains as starts. *International Dairy Journal*, 47, 94-101.

Queiroga, R. C. R. E., Santos, B. M., Gomes, A. M. P., Monteiro, M. J., Teixeira, S. M., Souza, E. L., Pereira, C. J. D., Pintado, M. M. E. (2013). Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. *LWT – Food Science and Technology*, 50 (2), 538-544.

Ribeiro, E. P., Simoes, L. G.; Jurkiewicz, C.H. (2009). Desenvolvimento de queijo minas frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzido a partir de retentados de ultrafiltração. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29, 1.

Rinaldoni A N, Campderrós M E, Padilla A P (2012) Physico-chemical and sensory properties of yogurt from ultrafiltered soy milk concentrate added with inulin. *LWT – Food Science and Technology* 45:142-147

SAS Institute. (1999). *SAS User's Guide: Statistics; Version 8.0*. SAS Institute, Cary, NC, USA.

Silva, R.A., Lima, M.S.F., Viana, J.B.M., Bezerra, V.S., Pimentel, M.C.B., Porto, A.L.F. (2012) Probiotic caprine coalho cheese naturally enriched in conjugated linoleic acid as a vehicle for *Lactobacillus acidophilus* and beneficial fatty acid. *International Dairy Journal*, 24, 107-112.

- Silvab, R.C.S.N., Minim, V.P.R., Vidigal, M.C.R.T., Teixeira, J.A., Moraes, L.E.S., Lima, L.P., Minim, L.A. (2012). Teor de gordura e de água: fatores determinantes na textura e na aceitabilidade de requeijão light. *Revista do Instituto Adolf Lutz*, 71 (1), 118-126.
- Soares, F.M., Fonseca, L.M., Martins, R.T., Machado, E.C., Pereira Jr., F.N., Fonseca, C.S.P. (2002). Influência do concentrado proteico de soro na composição do requeijão em barra com teor reduzido de gordura. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 54, 1-7.
- Sousa, M.J., Ardo, Y., Mcsweeney, P.L.H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11, 327–345.
- Souza, C.H.B. (2006) Influência de uma cultura 'starter' termofílica sobre a viabilidade de “*Lactobacillus acidophilus*” e as características de queijo minas frescal probiótico. (Dissertação de mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- Teixeira, G.L.S.B. (2012). Qualidade e viabilidade de requeijão cremoso adicionado de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum*. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.
- Shi, H., Luo, J., Zhang, W., Sheng, H. (2015). Using safflower supplementation to improve the fatty acid profile in milk of dairy goat. *Small Ruminant Research*, 127, 68-73.
- Steegmans, M., Iliens, S., Hoebregs, H. (2004). Enzymatic, Spectrophotometric Determination of Glucose, Fructose, Sucrose, and Inulin/Oligofructose in Foods. *Journal of AOAC International*, 87 (5), 1200-1207.
- Stone, H., Sidel, J. L. Sensory evaluation practices. (1993). 2. ed. New York-USA: Academic Press, p. 338.
- Takahashi, N., Xiao, J. Z., Miyaji, K., Yaeshiima, T., Hiramatsu, A., Iwatsuki, K. (2004) Selection of acid tolerance of bifidobacteria and evidence for a low – pH-inducible and acid tolerance response in *Bifidobacterium longum*. *Journal of Dairy Research*, 71, 340-345.
- Toral, P. G., et al. (2015). Comparison of the nutritional regulation of milk fat secretion and composition in cows and goats. *Journal of dairy Science*, 98 (10), 7277-7297.
- Truelstrup-Hansen L., Allan-Wojtas P.M., Jin, Y.L., Paulson, A.T. (2002). Survival of free and calcium-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in simulated gastro-intestinal conditions. *Food Microbiology*, 19, 35-45.
- Vargas, M., Chafer, M., Albors, A., Chiralt, A., Gonzalez-Martinez, C. (2008). Physicochemical and sensory characteristics of yoghurt produced from mixtures of cows' and goats' milk. *International Dairy Journal*, 18, 1146-1152.
- Van Dender, A. G. F. (2006). Requeijão: aspectos gerais. In: VAN DENDER, A. G. F. (Ed), Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: tecnologia de fabricação, controle do processo e aspectos de mercado. São Paulo.

Zhang, L., Zhang, X., Liu, C., Li, C., Li, S., Li, T... Yang, Z. (2013). Manufacture of Cheddar cheese using probiotic *Lactobacillus plantarum* K25 and its cholesterol-lowering effects in a mice model. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 127-135

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização desta pesquisa permitiu as seguintes considerações finais a respeito do tema estudado:

- ✓ Relacionado às análises físico-químicas, observou-se um aumento dos teores de acidez, com concomitante redução do pH, para as amostras RPro e RSimb, de acordo com a atuação dos micro-organismos nestes tratamentos. O aumento da concentração de açúcares totais foi maior para as amostras RPre e RSimb, cujas formulações continham o componente prebiótico, a inulina, que influenciou na quantificação total dos açúcares. Contudo, ao final da análise, a amostra RSimb, possuiu valores inferiores na contagem de açúcares em comparação a amostra RPre, devido a presença do *L. paracasei*, que contribuiu para o consumo dos açúcares no produto;
- ✓ Quanto às propriedades tecnológicas, a amostra RSimb apresentou aumento em relação ao IEP durante a vida de prateleira, possivelmente em virtude da presença da inulina que pode ter induzido uma maior síntese de proteinases por parte da flora natural do leite e do *L. casei* subsp. *paracasei*, em conjunto, favorecendo a degradação das proteínas em peptídeos de alto peso molecular. No IPP foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) para todas as amostras e de acordo com o tempo de armazenamento, com maior índice para os requeijões RPreb nos tempos 21° e 28° dias e para a amostra RSimb, nos tempos 7° e 14°;
- ✓ Ao longo do armazenamento, nenhum dos requeijões cremosos caprinos apresentou sinerese, além disso, os produtos demonstraram um rendimento significativa de acordo com a proporção de leite utilizada na elaboração e a quantidade final produzida;
- ✓ Os requeijões cujo micro-organismo foi adicionado (*L. paracasei*) apresentaram potencial probiótico, visto que foram observadas contagens de bactérias lácticas, ao longo do seu armazenamento, acima do que é preconizado pela legislação vigente ($7,0 \log \text{ufc.g}^{-1}$) para que um alimento seja considerado probiótico;
- ✓ Quanto à viabilidade do *L. paracasei* frente às condições do trato gastrointestinal, *in vitro*, o requeijão cremoso caprino mostrou um efeito protetor sobre a sobrevivência

da estirpe, com contagens superiores a $5,0 \log \text{ufc.g}^{-1}$ para as duas amostras testadas, Rpro e RSimb.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Formulário de avaliação sensorial – Teste de Aceitação e Intenção de compra de requeijões caprinos cremosos.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE, CES/UFCG
Teste de Aceitação e Intenção de compra

Idade: _____ **Sexo:** _____ **Escolaridade:** _____ **Data:** _____

Você está recebendo 04 amostras de requeijões cremosos caprinos. Prove-os da esquerda para direita e escreva o valor da escala que você considera correspondente à amostra (código). Antes de cada avaliação, você deverá fazer uso da água e da bolacha.

- 9 – gostei muitíssimo
- 8 – gostei muito
- 7 – gostei moderadamente
- 6 – gostei ligeiramente
- 5 – nem gostei/nem desgostei
- 4 - desgostei ligeiramente
- 3 – desgostei moderadamente
- 2 – desgostei muito
- 1 – desgostei muitíssimo

ATRIBUTOS	AMOSTRAS (Código)			
Aparência				
Textura				
Sabor				
Cor				
Aroma				
Avaliação Global				

Agora indique sua atitude ao encontrar estes produtos no mercado.

- 5 – compraria
- 4 – possivelmente compraria
- 3 – talvez comprasse/ talvez não comprasse
- 2 – possivelmente não compraria
- 1 – jamais compraria

ATRIBUTOS	AMOSTRAS (Código)			
Intenção de Compra				

Comentários: _____

Obrigada!

APÊNDICE B - Formulário de avaliação sensorial – Teste de Ordenação-Preferência das barras de cereais.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE, CES/UFCG
Teste de Ordenação-Preferência

Nome: _____ Data _____

Você está recebendo 04 amostras codificadas de requeijões cremosos caprinos. Por favor, prove as amostras, da esquerda para direita, e ordene-as em ordem decrescente de **preferência geral (escreva o código da amostra no espaço reservado)**. Espere 30 segundos antes de consumir a próxima amostra e utilize bolacha e água entre cada avaliação.

	Mais preferida	—————→		Menos preferida
Posto	1º Lugar	2º Lugar	3º Lugar	4º Lugar
Amostra				

Comentários: _____

Agora, por favor, responda as seguintes questões:

Qual característica sensorial você mais apreciou na amostra mais preferida?

Qual característica sensorial você não apreciou na amostras menos preferida?

Obrigada!

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do comitê de ética.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA
PARAÍBA - CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE



PROJETO DE PESQUISA

Título: Produção de derivados lácteos: tecnologias e agregação de valor a produtos da caprinocultura leiteira
Área Temática:
Versão: 3
CAAE: 02226912.0.0000.5168
Pesquisador: Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga
Instituição: Universidade Federal da Paraíba

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 111.523
Data da Relatoria: 25/09/2012

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa tem por objetivo desenvolver e adaptar tecnologias de produtos lácteos caprinos (queijos, iogurte, bebidas lácteas), como também, aproveitar resíduos de indústrias de laticínios e frutos da biodiversidade regional, visando o aumento da produção e agregação de valor, para que contribuam na sustentabilidade da agricultura familiar da região Semiárida, procurando-se atender aos requisitos de segurança alimentar. Serão elaborados produtos lácteos com qualidade satisfatória os quais serão submetidos a testes sensoriais. Os procedimentos realizados na pesquisa serão explicados aos indivíduos e, em seguida, caso aceitem participar da mesma, assinarão o termo de consentimento livre e esclarecido. Serão convidados e selecionados a formar o grupo de provadores estudantes e servidores da instituição maiores de 18 anos. As análises sensoriais serão realizadas no Laboratório de Técnicas Dietética DN/CCS/UFPB e para a realização das mesmas serão aplicados Testes de Aceitação (100 provadores) e de Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) (12 provadores) de acordo com metodologia descrita por Faria & Yotsuyanagi (2002). Para participação do painel sensorial serão recrutados voluntários entre estudantes, funcionários e professores da UFPB. Os dados obtidos serão tabulados e submetidos à análise de variância (ANOVA). As diferenças entre os grupos estudados serão analisados utilizando o teste de média Tukey para comparação de médias ao nível de 5% de significância. Com relação à análise sensorial, os dados serão tabulados em gráfico de planilha eletrônica EXCEL, sendo os valores médios de cada atributo sensorial comparado através de teste de Friedman. Para a comparação entre os tratamentos será realizada a análise de variância (ANOVA) dos provadores e comparação ao teste de Tukey com nível de 5 % de significância.

Objetivo da Pesquisa:

Desenvolver e adaptar tecnologias de produtos lácteos caprinos, como também, aproveitar resíduos de indústrias de laticínios e frutos da biodiversidade regional, visando o aumento da produção e agregação de valor, para que contribuam na sustentabilidade da agricultura familiar da região Semiárida, procurando-se atender aos requisitos de segurança alimentar.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos previsíveis, e o pesquisador relata que os benefícios gerados com a pesquisa são para a área de conhecimento, mas não ao participante diretamente. Também pode contribuir para a expansão da agroindústria especializada nestes produtos, pela valorização da caprinocultura leiteira brasileira e contribuição para o desenvolvimento sustentável do Semiárido brasileiro.

Endereço: UNIVERSITÁRIO S/N
Bairro: CASTELO BRANCO **CEP:** 58.051-000
UF: PB **Município:** JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 **Fax:** (83)3216-7791 **E-mail:** eticacos@ccs.ufpb.br, eticademurta@hotmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DA
PARAÍBA - CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE



Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante na sua área do conhecimento e atende a todas as considerações éticas da resolução 196/96.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados.
Todas as recomendações solicitadas no parecer da versão 01 foram acatadas pelo pesquisador e realizadas.

Recomendações:

Como todas as recomendações solicitadas no parecer da versão 02 foram acatadas pelo pesquisador, não temos mais recomendações a fazer.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Conforme acima relatado, salvo melhor juízo, somos de parecer que este Projeto deve ser considerado APROVADO.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

JOAO PESSOA, 01 de Outubro de 2012

Assinado por:
Eliane Marques Duarte de Sousa
(Coordenador)

ANEXO B – Questionário de identificação dos provadores.

<i>QUESTIONÁRIO DE IDENTIFICAÇÃO</i>	
Nome:	_____
DATA	__/__/__
Idade	_____
Atividade	_____
Endereço:	_____
Telefone p/ contato:	_____
1. O que você entende por “análise sensorial”?	

2. Qual dia da semana e o turno de sua disponibilidade para participar das sessões sensoriais?	

3. Você tem algum tipo de problema (alergia, desconforto, não gosta, etc) com alguns alimentos? Especifique quais.	

4. Quais os seus alimentos preferidos? _____	

5. Você está fazendo alguma dieta especial? _____ Qual? _____	
6. Indique marcando com um X se tem os seguintes problemas de saúde :	
<input type="checkbox"/> Prótese dentária <input type="checkbox"/> Problemas de percepção de cor (daltonismo, ...) <input type="checkbox"/> Diabetes <input type="checkbox"/> Colesterol <input type="checkbox"/> Hipoglicemia <input type="checkbox"/> Hipertensão <input type="checkbox"/> Frequentes estados febris <input type="checkbox"/> (sinusites) <input type="checkbox"/> Frequentes inflamações da cavidade bucal <input type="checkbox"/> Quadros asmáticos leves ou agudos <input type="checkbox"/> Problemas respiratórios	
<input type="checkbox"/> Problemas cardíacos	
7. Você está tomando algum remédio? Qual? _____	
8. Fumante? em caso afirmativo indicar a quantidade. _____	
Marque na escala abaixo sobre o seu consumo médio de queijo.	
<input type="checkbox"/> Quase sempre (quase todo dia)	
<input type="checkbox"/> Muito (pelo menos 4 vezes por semana)	
<input type="checkbox"/> Moderado (pelo menos 2 vezes por semana)	
<input type="checkbox"/> Pouco (pelo menos 1 vez por semana)	
<input type="checkbox"/> Não consumo	

ANEXO C – Modelo de Termo do Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Prezado (a) Senhor (a)

Esta pesquisa é sobre avaliação sensorial de requeijão cremoso caprino com potencial funcional e está sendo desenvolvida por Dalyane Laís da Silva Dantas, aluna de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, sob a orientação da Professora Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira.

A realização desta pesquisa é justificada pela necessidade de avaliar as características sensoriais, intenção de compra e grau de preferência de quatro preparações de requeijões caprinos cremosos.

Objetivos do estudo:

Elaborar e caracterizar os aspectos tecnológicos e de qualidade, bem como o potencial simbiótico de requeijão cremoso caprino adicionado de *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* e inulina.

Para tanto, V. Sra. receberá 04 amostras de requeijões caprinos cremosos, onde deverá avaliar a aceitação sensorial dos atributos aparência, cor, aroma, sabor, textura e fará uma avaliação da aceitação global dos produtos. Além disso, deverá expressar sua intenção de compra das referidas amostras. Por fim, deverá ordenar em ordem decrescente de preferência geral (amostra mais preferida para a amostra menos preferida) as amostras submetidas à avaliação sensorial.

Informamos que essa pesquisa não oferece riscos previsíveis para a sua saúde. Todavia, na ocasião da aplicação das análises sensoriais, as preparações deverão estar isentas de qualquer risco de contaminação para os provadores. Estas contaminações poderão ser provenientes, principalmente, do processamento das amostras, condições de armazenamento e manipulação. Para avaliar este fator de contaminação, antes da aplicação das análises sensoriais as amostras serão submetidas às análises microbiológicas que deverão demonstrar a qualidade higiênico-sanitária dos produtos comercializados, sendo descartados e não submetidos aos testes sensoriais quando os resultados estiverem acima dos valores permitidos pela legislação específica.

Desta forma, o protocolo metodológico utilizado antes da aplicação da análise sensorial, garantirá que o provador estará recebendo amostras sem nenhum risco de contaminação microbiológica.

Igualmente, os benefícios que a pesquisa poderá trazer para os consumidores em potencial, como a oferta de um alimento com propriedades nutritivas e boas características sensoriais, superam todos os possíveis riscos que possam ocorrer, mas que serão a todo o momento contornados e controlados.

Solicitamos a sua colaboração na avaliação sensorial, como também sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica, bem como da realização de imagens (fotos). Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo. Só deve participar desta pesquisa quem for consumidor de requeijão.

Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador(a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição.

Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido (a) e dou o meu consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados. Estou ciente que receberei uma cópia desse documento.

Dalyane Laís da Silva Dantas
Assinatura do Responsável pela Pesquisa

Profa. Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira
Assinatura da Pesquisadora orientadora

Contato com o Pesquisador (a) Responsável:

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para o (a) Pesquisador(a)
Maria Elieidy Gomes de Oliveira

Endereço (Setor de Trabalho): Universidade Federal de Campina Grande-UFCG. Centro de Educação
e Saúde. Unidade Acadêmica de Saúde. Rua Olho D'Água da Bica, s/n. Cuité/PB.

Telefone: (83) 99688-6068 // (83) 98830-4927

Atenciosamente,

Assinatura do Pesquisador Responsável

Assinatura do Pesquisador Participante