UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

ALUIZIO ALFREDO DA SILVA JÚNIOR

Desenvolvimento de requeijão cremoso adicionado de probióticos e prebiótico

Vitória de Santo Antão
2022

ALUIZIO ALFREDO DA SILVA JUNIOR

Desenvolvimento de requeijão cremoso adicionado de probióticos e prebiótico

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Graduação em Nutrição do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco em cumprimento a requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Nutrição, sob orientação da Professora Dra. Christine Lamenha Luna Finkler.

Vitória de Santo Antão

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva Júnior , Aluizio Alfredo da .
Desenvolvimento de requeijão cremoso adicionado de probióticos e prebiótico / Aluizio Alfredo da Silva Júnior . - Vitória de Santo Antão, 2022.
45 : il., tab.

Orientador(a): Christine Lamenha Luna Finkler
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Nutrição - Bacharelado, 2022.
Inclui referências, apêndices, anexos.

1. Requeijão cremoso. 2. Probióticos . 3. Prebiótico. 4. Frutooligossacarídeos. 5. Simbiótico. ?. I. Finkler, Christine Lamenha Luna . (Orientação). II. Título.

610 CDD (22.ed.)

ALUIZIO ALFREDO DA SILVA JUNIOR

Desenvolvimento de requeijão cremoso adicionado de probióticos e prebiótico

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Graduação em Nutrição do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco em cumprimento a requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Nutrição, sob orientação da Professora Dra. Christine Lamenha Luna Finkler.

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Keila Fernandes Dourado (Examinadora Interna)

Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco

_____

Prof. Roberta de Albuquerque Bento (Examinadora Interna)

Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco

_____

Prof. Renata Emmanuele Assunção Santos (Examinadora Interna)

Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho a minha mãe, Dona Maria, que sempre me apoiou e me motivou.

AGRADECIMENTOS

Aos amigos e familiares, por todo o apoio e pela ajuda, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

A professora Dra. Christine Lamenha Luna Finkler. por ter sido minha orientadora e ter desempenhado tal função com dedicação e pelas correções e ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação profissional ao longo do curso.

Às professoras Vanessa Sá Leal e Michele Carvalho, por terem me proporcionado a experiência do projeto de extensão.

Às professoras Erilane de Castro Lima Machado e Keila Fernandes Dourado, pela experiência gratificante da monitoria.

Ao técnico do laboratório de bioprocessos e tecnologia de alimentos, Gabriel Locatelli, por todo conhecimento e contribuição ao longo de todos os experimentos.

Ao técnico do laboratório de bromatologia, Silvio Ferreira, por todo conhecimento, boa vontade e disposição em ajudar ao longo de todas as análises físico-químicas.

A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

“Para ser grande, sê inteiro: nada

Teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa. Põe quanto és

No mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda

Brilha, porque alta vive.”

(Fernando Pessoa)

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CTCAF - Comissão Técnico-Científica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos.

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

ISAPP - Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos

OMS - Organização Mundial da Saúde (OMS)

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

LISTA DE SÍMBOLOS

NaCl - Cloreto de sódio

mL - mililitro

µL- microlitro

^{o}C - graus Celcius

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma de preparação do requeijão cremoso 22
Figura 2: Concentração de células viáveis no requeijão probiótico e no requeijão simbiótico pelo método de incubação *spread plate* ao longo de armazenamento sob refrigeração a 10 °C durante 80 dias..... 26
Figura 3: Concentração de células viáveis no requeijão probiótico e no requeijão simbiótico pelo método de incubação *pour plate* ao longo de armazenamento sob refrigeração a 10 °C durante 80 dias..... 27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição centesimal das amostras de requeijão tradicional e requeijão simbiótico no tempo inicial e após 80 dias de armazenamento a 10 ^{o}C..... 25

RESUMO

A crescente preocupação da população com a saúde tem aumentado a procura por alimentos com propriedades funcionais, que além do valor nutritivo agregado, estimulam atividades fisiológicas e/ou metabólicas, trazendo benefícios ao indivíduo. Entre eles estão os produtos probióticos, prebióticos e simbióticos. O requeijão é um alimento que pode ser portador de espécies de microrganismos probióticos, pois sua matriz possui propriedades que contribuem para a sua sobrevivência, sendo um produto bem aceito no Brasil. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um requeijão cremoso adicionado de probióticos e frutooligossacarídeo (FOS). A composição centesimal das amostras de requeijão tradicional (amostra controle) e requeijão simbiótico foi determinada para o tempo inicial (dia 0) e após 80 dias de armazenamento a 10 ^{o}C. A concentração de células viáveis dos microrganismos probióticos foi investigada nos tempos 0, 20, 40, 60 e 80 dias de armazenamento a 10 ^{o}C, fazendo-se o plaqueamento das amostras pelos métodos *pour plate* e *spread plate*. Os resultados de composição centesimal indicaram que para o tempo inicial (tempo 0), o requeijão simbiótico apresentou um maior teor de carboidratos e menores concentrações de lipídios e proteínas quando comparado ao requeijão tradicional. Após 80 dias de armazenamento, foi observada uma diminuição do teor de lipídios e um aumento do teor de carboidratos para ambas as amostras. Os resultados de umidade do produto requeijão tradicional (67,80 ± 0,21 logo após o preparo e 67,53 ± 0,90 após 80 dias de armazenamento) estão acima do preconizado pela legislação, que recomenda valores entre 60 e 65%, enquanto que os resultados de umidade para o requeijão simbiótico (60,87 ± 0,18 logo após o preparo e 61,24 ± 0,12 após 80 dias de armazenamento) atendem à legislação vigente. Os resultados de análise microbiológica indicam que as amostras de requeijão apresentaram concentrações celulares abaixo dos valores recomendados para o produto considerado probiótico, que de acordo com a legislação vigente é de 10^{8} a 10^{9} UFC/g. No entanto, a presença do FOS permitiu a obtenção de um requeijão cremoso prebiótico que apresentou um aumento na concentração de microrganismos probióticos após 80 dias de armazenamento refrigerado.

Palavras-chave: Requeijão cremoso. Probiótico. Prebiótico. Frutooligossacarídeos. Simbiótico.

ABSTRACT

Increasing population concern about health has increased the demand for foods with functional properties, which beyond the added nutritional value, stimulate physiological and/or metabolic activities, bringing benefits to the individual. Among them are probiotic, prebiotic and synbiotic products. Curd cheese is a food that can be a carrier of species of probiotic microorganisms, because its matrix has properties that contribute to its survival, being a well accepted product in Brazil. The present work aimed to develop a curd cheese added with probiotics and fructooligosaccharide (FOS). The centesimal composition of samples of traditional curd cheese (control sample) and symbiotic curd cheese was determined for the initial time (day 0) and after 80 days of storage at 10 ^{o}C. The concentration of viable cells of the probiotic microorganisms was investigated at 0, 20, 40, 60 and 80 days of storage at 10 ^{o}C, by plating the samples using the pour plate and spread plate methods. Results of centesimal composition indicated that for the initial time (time 0), the symbiotic curd cheese presented a higher carbohydrate content and lower concentrations of lipids and proteins when compared to the traditional curd cheese. After 80 days of storage, a decrease in lipid content and an increase in carbohydrate content was observed for both samples. The moisture results of the traditional curd cheese product (67.80 ± 0.21 % immediately after preparation and 67.53 ± 0.90 % after 80 days of storage) are above the recommended by the legislation, which recommends values between 60 and 65 %, while the moisture results for the symbiotic curd cheese (60.87 ± 0.18 % immediately after preparation and 61.24 ± 0.12 % after 80 days of storage) comply with current legislation. Results of microbiological analysis indicate that samples of curd cheese presented values of cellular concentrations below the recommended values for the product considered probiotic, which according to the current legislation is from 10^8 to 10^9 CFU/g. However, the presence of FOS allowed obtaining a prebiotic curd cheese that showed an increase in the concentration of probiotic microorganisms after 80 days of refrigerated storage.

Keywords: Curd cheese. Probiotic. Prebiotic. Fructooligosaccharides. Synbiotic.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO *11*
OBJETIVOS *13*
2.1. Geral **13**
2.2. Específicos **13**
3. JUSTIFICATIVA *14*
4. HIPÓTESE *15*
5. REVISÃO DA LITERATURA *16*
5.1. Leite e requeijão **16**
5.2. Alimentos funcionais **17**
5.3. Prebióticos **18**
5.4. Probióticos **19**
5.5. Simbióticos **20**
6. MATERIAIS E MÉTODOS *21*
6.1. Consórcio microbiano e prebiótico **21**
6.2. Descrição do processamento do requeijão simbiótico **21**
6.3. Determinação da composição centesimal **24**
6.4. Contagem de microrganismos probióticos viáveis **24**
6.5. Análise estatística **24**
7. RESULTADOS *26*
8. DISCUSSÃO *29*
8.1. Composição centesimal **29**
8.2. Análise microbiológica **30**
9. CONCLUSÃO *32*
REFERÊNCIAS *33*
APÊNDICE *39*

INTRODUÇÃO

Segundo Roberfroid (2007), alimentos funcionais são aqueles que agem por meio de mecanismos que não são obtidos pela nutrição convencional e que atuam de forma a promover a saúde e não à cura de doenças. Os consumidores têm sido atraídos pelo consumo desses alimentos, o que tem estimulado a inovação no desenvolvimento de novos produtos (ARES et al., 2009).

A legislação brasileira (BRASIL, 1999), regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA por meio da Resolução nº 18 de 30/04/1999, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde no Brasil, define como alimento funcional: “todo alimento ou ingrediente, que além das funções nutricionais básicas, quando consumido diariamente, produz efeitos metabólicos, fisiológicos e benéficos à saúde, sendo seguro sua ingestão sem supervisão médica”. Em 2016, a ANVISA atualizou a lista de alimentos considerados funcionais e os probióticos permitidos para uso em alimentos e suplementos (ANVISA, 2016).

Dentre os alimentos funcionais estão incluídos aqueles contendo probióticos, que são microrganismos com capacidade de afetar de maneira benéfica o organismo pela melhora do seu balanço microbiano, e os prebióticos, que são ingredientes alimentares não digeríveis que afetam favoravelmente o organismo por estimular de forma seletiva o crescimento e/ou atividade de um ou um número limitado de bactérias do cólon. A junção desses dois tipos origina os chamados simbióticos (STEFE et al, 2008).

Em 2019, o termo simbiótico foi atualizado pela Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP) para "uma mistura compreendendo microrganismos vivos e substrato (s) utilizados seletivamente por microrganismos hospedeiros que conferem um benefício à saúde" (SWANSON et al., 2020). De acordo com essa nova definição, os simbióticos complementares são compostos por um probiótico e um prebiótico que, juntos, conferem um ou mais benefícios à saúde e agem de forma independente, enquanto que os simbióticos sinérgicos contêm um substrato que é utilizado seletivamente pelo microrganismo probiótico.

Os frutooligossacarídeos (FOS) estão entre os constituintes prebióticos mais utilizados na formulação de alimentos simbióticos, com o propósito de favorecer os efeitos sinérgicos dos dois compostos, a partir do melhoramento da colonização do

probiótico ou efeito metabólico. Têm-se utilizado as propriedades de fibra dos FOS em grande escala nos alimentos funcionais, uma vez que não alteram as propriedades organolépticas dos produtos e serem compostos com elevada solubilidade (BURITI et al., 2007; CARDARELLI et al., 2008).

Os queijos geralmente possuem 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 em diversos tipos de queijos, tais como queijo tipo gouda (VAN HOORDE et al., 2010), queijo caprino (MORAES et al., 2018), cheddar (HAO et al., 2023) e queijo cottage (ABADÍA-GARCÍA, 2013).

O requeijão cremoso é comumente consumido com 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 e 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). É considerado um produto adequado para a incorporação de probióticos, pois apresenta boa aceitabilidade e sua matriz apresenta características que contribuem para a sobrevivência dos microrganismos.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um requeijão cremoso adicionado de probióticos e frutooligossacarídeo (FOS) e avaliar a composição centesimal e a viabilidade dos microrganismos probióticos ao longo de 80 dias de armazenamento refrigerado.

OBJETIVOS

2.1. Geral

Desenvolver um requeijão cremoso adicionado de probióticos e prebiótico.

2.2. Específicos

1- Determinar a formulação padrão do requeijão cremoso;
2- Determinar a composição centesimal das amostras de requeijão tradicional (amostra controle) e requeijão simbiótico para o tempo inicial (dia 0) e após 80 dias de armazenamento a 10 ^{o}C;
3- Avaliar a concentração de células viáveis dos microrganismos probióticos para as amostras de requeijão probiótico e simbiótico nos tempos 0, 20, 40, 60 e 80 dias de armazenamento a 10 ^{o}C.

3. JUSTIFICATIVA

O presente trabalho justifica-se por considerar que, por ser o requeijão um alimento amplamente consumido pela população brasileira, a adição de bactérias probióticas em sua composição e de um componente prebiótico gera um produto de melhor qualidade e agrega um maior valor nutricional, resultando assim em inúmeros benefícios à saúde do consumidor.

O produto funcional ora desenvolvido visa atender às necessidades do mercado consumidor, o qual está cada vez mais preocupado com a manutenção da saúde, assim como apresenta caráter inovador, considerando o emprego de um frutooligossacarídeo como prebiótico.

4. HIPÓTESE

O produto requeijão cremoso adicionado de probióticos e prebiótico apresenta características físico-químicas e microbiológicas adequadas para a formulação de um novo alimento funcional.

5. REVISÃO DA LITERATURA

5.1. Leite e requeijão

A cadeia agroindustrial de laticínios é uma das mais significantes do Brasil devido a seu grande protagonismo socioeconômico, sendo essa atividade realizada em praticamente todos os estados brasileiros (ZOCCAL, 2017). Leite e derivados estão presentes na dieta humana há milênios, estabelecendo fontes naturais de proteínas de alto valor biológico, vitaminas lipossolúveis (A e D), vitaminas hidrossolúveis do complexo B (vitaminas B12 e B2), e minerais (cálcio, fósforo, potássio, magnésio, zinco, selênio e iodo) (GUINÉ, 2020). Essa variedade de nutrientes fica difícil de adquirir através de uma dieta com restrições em produtos lácteos, principalmente em indivíduos com alergias ou intolerância a esses produtos, o que causa preocupação nas recomendações dietéticas de muitos países. (COMERFORD, 2021).

De acordo com o Guia alimentar para a população brasileira (BRASIL, 2014), leite e derivados são as principais fontes de cálcio na dieta, além de carnes, aves, peixes e ovos. Estes alimentos contribuem para uma alimentação nutritiva, sendo importantes para a promoção da saúde e o crescimento saudável. A recomendação é um consumo diário de 2 a 3 porções de leite e derivados, e os tipos e quantidades desses alimentos devem ser adaptados às diferentes fases do ciclo de vida. Por exemplo, leite e derivados devem ser preferencialmente desnatados para adultos, enquanto crianças, adolescentes e gestantes devem consumir alimentos integrais (GABE, 2020). Para atingir tais recomendações, o requeijão cremoso é uma opção, por se tratar de um produto lácteo de fácil preparo e grande aceitação pelos consumidores, atrelado à sua utilidade de diversas formas na culinária (DA COSTA, 2022).

O requeijão cremoso, um produto tipicamente brasileiro, surgiu como um subproduto de fabricações caseiras. É um derivado lácteo de fácil elaboração e grande aceitação em todo o país e seu elevado consumo também está associado ao uso em pratos culinários. É um produto que com apenas pequenas variações no seu processamento consegue adquirir características tecnológicas típicas de interesse

para as unidades processadoras que visam atender às expectativas do mercado consumidor (MASSON, 2016).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) classifica o requeijão de acordo com as matérias primas utilizadas no processo de produção. De acordo com o regulamento 359/97, o requeijão é definido pela legislação brasileira 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 adicionado de creme de leite e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite ou *butter oil*” (BRASIL, 1997). A qualidade do requeijão é determinada por diversos parâmetros, incluindo características físicas, químicas, nutricionais, sensoriais e microbiológicas (SILVA, 2020).

5.2. Alimentos funcionais

Os alimentos funcionais são considerados uma nova tendência do mercado alimentício, e a regulamentação destes produtos pelas agências responsáveis reconhece os seus benefícios à saúde e incentiva melhores hábitos alimentares (ZHOU 2020; KIM et. al., 2020). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, alimento funcional é “aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutritivas básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produza efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica” (BRASIL, 1999).

Os alimentos funcionais devem ter a capacidade de influenciar positivamente pelo menos uma função fisiológica do organismo, melhorar a saúde, oferecer melhor qualidade de vida e contribuir para a redução da incidência de doenças, além de sua capacidade de nutrir (SILVA et al., 2016).

Dentre os alimentos considerados funcionais, destacam-se os probióticos, os prebióticos e os simbióticos, que são alimentos que combinam probióticos e prebióticos.

5.3. Prebióticos

Os prebióticos são fibras alimentares que são fermentadas pela microbiota do intestino, produzindo compostos bioativos como ácidos graxos de cadeia curta, que são metabolizados pelo hospedeiro (FUNG et al., 2017) e que são propostos como tendo efeitos anti-inflamatórios sistêmicos (MCLOUGHLIN et al., 2017).

Outros autores definem prebiótico como “composto não digerível que, por meio de sua metabolização por microrganismos no intestino, modula a composição e/ou atividade da microbiota intestinal, conferindo assim um efeito fisiológico benéfico ao hospedeiro” (BINDELS et al., 2015). Além de serem encontrados em suplementos, os prebióticos são encontrados naturalmente em muitos alimentos, incluindo: Legumes, feijões (feijão carioca, feijão preto, ervilha, lentilha, grão-de-bico), aveia, frutas entre outros (DA SILVA et al., 2019).

Além disso, os prebióticos também fornecem muitos outros benefícios à saúde, melhorando a absorção de cálcio (GETENET et al., 2021), diminuindo o risco de câncer colorretal (YADAV et al., 2022), melhoram o sistema imunológico (SHOKRYAZDAN et al., 2017) e reduzem as ocorrências de síndrome do intestino irritável (SII) (OOI et al., 2019). Esses benefícios demonstram a importância dos prebióticos para a saúde intestinal, assim como para a saúde geral e o bem-estar do indivíduo. Os prebióticos têm sido incorporados em vários alimentos, como iogurtes, bebidas, chocolates e alimentos para bebês (MACEDO, 2020).

A introdução de prebióticos na dieta tem um impacto significativo sobre os microrganismos intestinais. Dentre os estudos clínicos realizados, um dos prebióticos mais utilizados são os frutooligossacarídeos (FOS) (ARANTES, 2022). Muitas espécies microbianas podem utilizar esses prebióticos para crescimento e proliferação, como Bifidobactérias e Lactobacilos (MONTEAGUDO-MERA et al., 2016).

Os frutooligossacarídeos são componentes naturais que podem ser encontrados em muitas espécies de plantas, como alho, aspargo, banana, cebola, beterraba, entre outras. Os FOS apresentam estabilidade diante da maioria dos processos realizados na indústria de alimentos, sofrendo maiores degradações em processos térmicos que envolvem altas temperaturas ou pH extremo (MACEDO; VIMERCATI; ARAÚJO, 2020). Estes compostos ainda apresentam outras

propriedades tecnológicas que permitem a sua incorporação em alimentos, como sua elevada solubilidade, não precipitação e não cristalização (SEOLIN et al., 2019).

Segundo a ANVISA (2019), “Os frutooligossacarídeos – FOS (prebiótico) contribuem para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”. Esta alegação pode ser empregada desde que a recomendação de consumo diário para um produto pronto para consumo forneça pelo menos 5 g de FOS. A porção deve fornecer no mínimo 2,5 g de FOS e na tabela de informação nutricional deve ser declarada a quantidade de “frutooligossacarídeos (FOS)”, abaixo de fibras alimentares. O uso do ingrediente não deve ultrapassar 30 g na recomendação diária do produto pronto para consumo, conforme indicação do fabricante.

5.4. Probióticos

O termo probiótico tem origem grega e significa para a vida ou em prol da vida. A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) definem probióticos como microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas determinam benefícios à saúde do hospedeiro (BRASIL, 2018; SALMINEN et al, 2021). Em 2013, esta definição foi confirmada por especialistas convocados pela Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos (ISAAP, 2019).

Atualmente, a sociedade tem aumentado o consumo de produtos que contém microrganismos probióticos, pois a busca por uma alimentação mais saudável incentivou o desenvolvimento de novos alimentos que atuam na promoção da saúde (Grand View Research - GVR, 2021). As espécies bacterianas aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008) são: *Lactobacillus acidophilus, Lacticaseibacillus casei* var *shirota, rhamnosus e defensis, Lacticaseibacillus paracasei, Lactococcus lactis, Bifidobacterium bifidum, B. animallis* (incluindo a subespécie *B. lactis), B. longum* e *Enterococcus faecium*.

Diretrizes e informações da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO)/Organização Mundial da Saúde (OMS) demonstram a necessidade de as cepas probióticas permanecerem intactas ao longo do trato intestinal superior para garantir efeitos promotores da saúde ao entrar em seu local

de ação, independentemente do modo de entrega aplicado. Por exemplo, para garantir isso, foi declarado que o chamado nível “terapêutico mínimo” de microrganismos probióticos viáveis deve ser de pelo menos 10^6 UFC/g de células viáveis durante toda a vida útil do produto (NEFFE-SKOCIŃSKA, 2018). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária no Brasil recomenda que, para assegurar o efeito benéfico dos probióticos, deve-se consumir uma quantidade mínima viável destes microrganismos na faixa de 10^8 a 10^9 UFC/g por dia (BRASIL, 2008).

5.5. Simbióticos

Os simbióticos são definidos como uma associação de probióticos e prebióticos, sendo estes últimos fibras dietéticas não digeríveis que são utilizadas como substratos para a fermentação de bactérias intestinais. Se realizada uma combinação adequada de ambos os componentes em um único produto, deve-se garantir um efeito superior em comparação com a atividade do probiótico ou prebiótico isoladamente (MARKOWIAK et al., 2017).

Um dos principais desafios no desenvolvimento de alimentos funcionais é a substituição ou adição de ingredientes tradicionais por ingredientes alternativos sem que isso prejudique a qualidade do produto final (FERRONATTO et al., 2021). A interação entre o probiótico e prebiótico *in vivo* pode ser favorecida por uma adaptação do probiótico através do consumo de prebiótico. Isto deve resultar em uma vantagem competitiva para o probiótico, se este for consumido juntamente com o prebiótico (WITSCHINSKI, 2012).

Diversas opções de alimentos funcionais podem ser encontradas atualmente no mercado, como por exemplo: bebidas fermentadas, biscoitos e bolachas funcionais, sorvetes, barras alimentares, entre outros (DAMIÁN, 2022). Dentre estes alimentos, os produtos simbióticos disponíveis no mercado de alimentos são à base de leite de vaca, principalmente na forma de bebidas lácteas fermentadas, iogurtes e queijos, porém o desenvolvimento de probióticos em queijos têm recebido destaque, já que essa matriz apresenta um maior conteúdo de gordura e valor de pH mais elevado. Tais características propiciam a manutenção da integridade dos microrganismos tanto na estocagem do alimento, quanto na sua passagem pelo trato gastrointestinal (STANTON et al., 1998; LEEUWENDAAL, N. K. et al. 2022).

Mcloughlin et al. (2017) investigaram em um trabalho de revisão, o efeito de ácidos graxos de cadeia curta, prebióticos e combinações pré e probióticas (simbióticos) na inflamação sistêmica. Os dados de meta-análises fornecem evidências para apoiar os efeitos anti-inflamatórios sistêmicos da suplementação de prebióticos e simbióticos.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

A elaboração e as análises dos produtos foram realizadas nos Laboratórios de Técnica Dietética, Bromatologia, Tecnologia de Alimentos e Bioprocessos do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

6.1. Consórcio microbiano e prebiótico

A adição dos microrganismos no requeijão foi realizada a partir do produto Simfort®, que continha sachês de 2 g com as cepas *Lactobacillus acidophillus*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium lactis* e *B. bifidum*, contendo $1x10^9$ UFC/g de cada um dos microrganismos. O prebiótico utilizado foi um FOS comercial (NewNutrition®).

6.2. Descrição do processamento do requeijão simbiótico

O fluxograma para o desenvolvimento do requeijão cremoso está mostrado na Figura 1. A adição do prebiótico e do probiótico foi realizada após as etapas de pasteurização e de resfriamento. Na preparação, foram utilizados 3500 mL de leite integral pasteurizado.

Inicialmente, o leite foi aquecido até uma temperatura de 100 °C dentro de uma panela de inox e em fogo baixo. Assim que o leite entrou em ponto de ebulição, foi adicionado um volume de 105 mL de vinagre de álcool, mexendo-se com o auxílio de uma colher de inox até a completa coagulação e separação da massa.

Em seguida, foi feita a primeira dessoragem, colocando-se a massa em uma peneira de pano, que foi pressionada com o auxílio de uma colher de inox. Depois, foi utilizado um volume de 525 mL de água para lavagem da massa, sendo realizada em

seguida a segunda dessoragem. Posteriormente, foram adicionados à massa os seguintes ingredientes: 140 g de manteiga, 3,5 g de NaCl e 350 mL de leite integral pasteurizado. Posteriormente, os ingredientes foram homogeneizados em *mixer* (Britânia®) com lâminas em aço inox e copo medidor - 200W por 10 minutos.

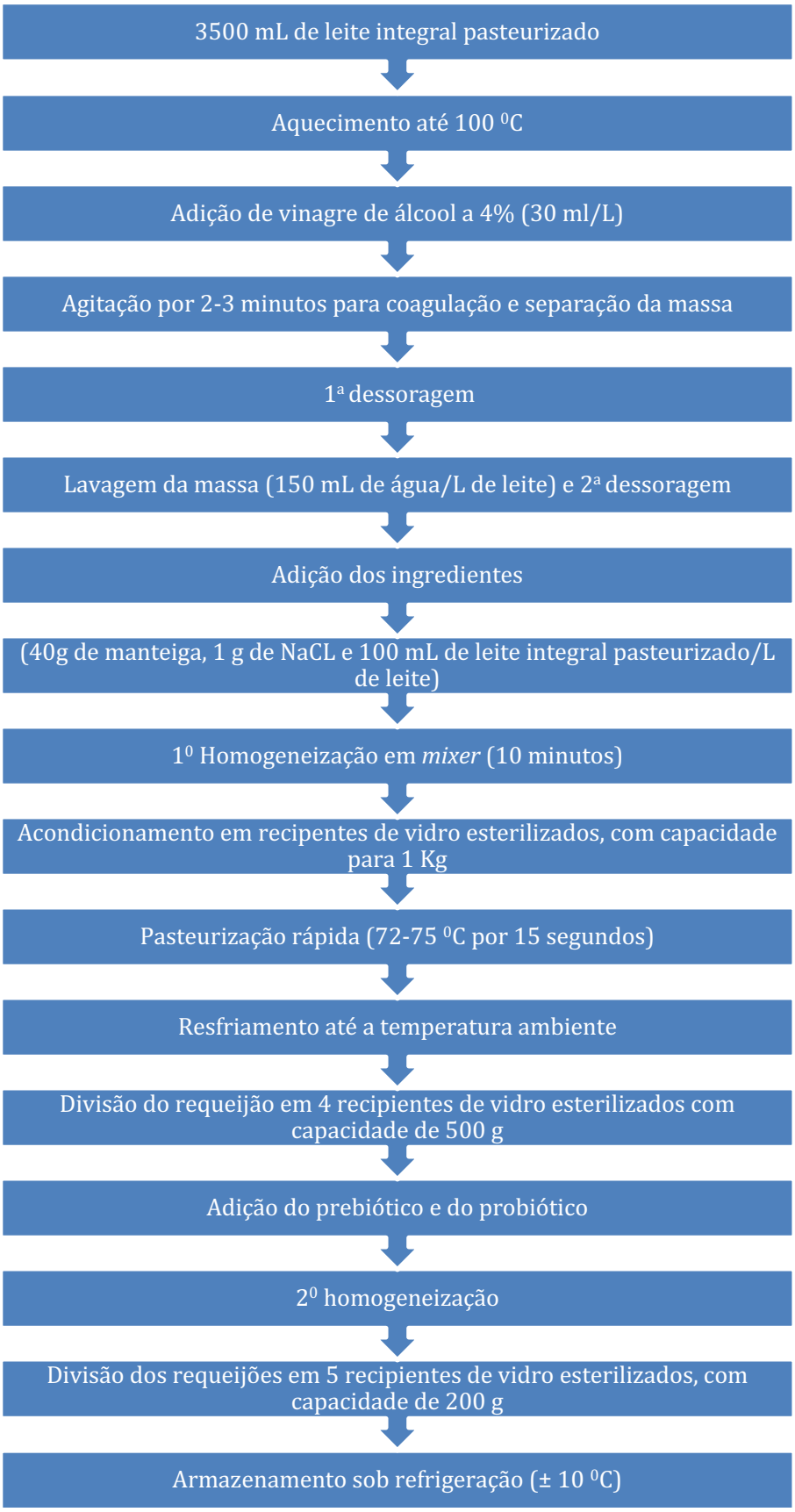
Em seguida, a amostra foi acondicionada em um recipiente de vidro previamente esterilizado com capacidade de 1 kg. O frasco foi pasteurizado em uma panela com água e com auxílio de um termômetro digital infravermelho, sendo realizada uma pasteurização rápida (72 - 75°C por 15 segundos). Posteriormente, o frasco foi resfriado à temperatura ambiente.

Após, o requeijão foi distribuído em 4 recipientes esterilizados com capacidade para 500 g e identificados da seguinte forma: I – requeijão prebiótico (adição de 15 g de FOS), II – requeijão probiótico (adição de 3 g do probiótico), III – requeijão simbiótico (adição de 15 g de FOS e 3 g do probiótico) e IV – requeijão tradicional (sem adição de prebiótico ou probiótico – amostra controle).

Em seguida, foi realizada a segunda homogeneização em cada frasco com o auxílio de uma espátula de silicone. Cada tipo de requeijão foi dividido em 5 porções de 30 g e armazenados em recipientes esterilizados com capacidade de 200 g. Todos os produtos foram identificados e armazenados sob refrigeração a ± 10 °C para posterior análise físico-química e microbiológica.

A quantidade de FOS adicionada (15 g de FOS para 150 g de requeijão) foi determinada com base na recomendação de que na porção do produto (30 g) deve-se fornecer no mínimo 2,5 g de FOS. Ou seja, o requeijão elaborado no presente trabalho fornece 3,0 g de FOS na porção de 30 g do produto.

A quantidade de probióticos adicionada (3 g de probiótico para 150 g de requeijão) corresponde a uma concentração de $1,5 \times 10^{10}$ UFC de probióticos totais, considerando que o probiótico utilizado contém 1×10^{9} UFC/g para cada um dos cinco microrganismos que compõem o produto. Dessa forma, o teor teórico inicial de probióticos adicionado nos requeijões probiótico e simbiótico foi de 1×10^{8} UFC/g.



Fonte: Autoria própria

Figura 1: Fluxograma de preparação do requeijão cremoso

6.3. Determinação da composição centesimal

Foram determinados os teores de lipídios, proteínas, resíduo mineral fixo (cinzas), umidade e carboidratos (por diferença) para as amostras de requeijão tradicional (amostra controle) e requeijão simbiótico para o tempo inicial (dia 0) e após 80 dias de armazenamento a 10 ^{o}C.

O teor de gordura foi determinado pelo método de Gerber, utilizando butirômetro para leite; as proteínas pelo método de Kjeldahl, a umidade por meio da evaporação em estufa à temperatura de 105 °C por 24 h e cinzas por calcinação em forno mufla a 525 °C por 16 horas (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

6.4. Contagem de microrganismos probióticos viáveis

Inicialmente, foi preparada uma amostra de requeijão diluída em solução estéril de citrato de sódio a 2 % (p/v), dissolvendo-se 25 g do produto em 225 mL da solução de citrato (diluição 10^{-1}).

A partir de diluições decimais seriadas das amostras (500 µL da amostra de requeijão diluída em citrato de sódio) em tubos de ensaio contendo solução salina estéril (0,85 % p/v de NaCl), um volume de 100 µL das amostras diluídas foi inoculado em placas de Petri contendo meio MRS Ágar suplementado com 2 % (p/v) de glicose pelas técnicas de semeadura em placa *spread plate* (espalhamento) e semeadura em placa *pour plate* (profundidade). As placas semeadas pela técnica *spread plate* foram incubadas em estufa a 37 °C por 3-5 dias, enquanto que as placas semeadas pela técnica *pour plate* foram incubadas em jarra de anaerobiose, sob as mesmas condições. Os resultados foram expressos como UFC/g para as amostras de requeijão probiótico e simbiótico.

6.5. Análise estatística

A análise estatística para a comparação dos resultados de composição centesimal entre as amostras de requeijão tradicional e requeijão simbiótico e para a comparação dos resultados de concentração de células viáveis entre as amostras probiótica e simbiótica para o mesmo tempo de análise foi realizada pelo teste de

comparação de médias *t* de *Student* para amostras com variâncias diferentes, adotando-se o nível de significância de 5% e empregando-se o programa Excel®.

A análise estatística para a comparação dos resultados de concentração de células viáveis para os diferentes tempos de análise de uma mesma amostra foi realizada pela análise de variância (ANOVA) empregando-se o programa Excel®. Quando detectadas diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de 5 % de significância, os dados foram submetidos ao teste de Tukey usando-se o programa Past®.

7. RESULTADOS

A Tabela 1 mostra os resultados de composição centesimal das amostras de requeijão tradicional e requeijão simbiótico no tempo inicial, ou seja, logo após o preparo dos produtos, e após 80 dias de armazenamento a 10 ºC.

Tabela 1: Composição centesimal das amostras de requeijão tradicional e requeijão simbiótico no tempo inicial e após 80 dias de armazenamento a 10 ºC.

TEMPO: 0 dia		
Componente (%)	**Requeijão tradicional**	**Requeijão simbiótico**
Proteína	$8,78 \pm 0,23^{aA}$	$7,63 \pm 0,19^{bA}$
Lipídios	$19,82 \pm 0,27^{aA}$	$16,20 \pm 0,00^{bA}$
Carboidratos	$2,19^{aA}$	$14,07^{bA}$
Umidade	$67,80 \pm 0,21^{aA}$	$60,87 \pm 0,18^{bA}$
Cinzas	$1,41 \pm 0,06^{aA}$	$1,23 \pm 0,03^{bA}$
TEMPO: 80 dias		
Componente (%)	**Requeijão tradicional**	**Requeijão simbiótico**
Proteína	$8,76 \pm 0,07^{aA}$	$7,85 \pm 0,10^{bA}$
Lipídios	$14,09 \pm 0,70^{aB}$	$10,76 \pm 0,81^{bB}$
Carboidratos	$8,28^{aB}$	$19,17^{bB}$
Umidade	$67,53 \pm 0,90^{aA}$	$61,24 \pm 0,12^{bA}$
Cinzas	$1,34 \pm 0,04^{aA}$	$1,20 \pm 0,03^{bA}$

Análises efetuadas em triplicata. Valores são expressos como média ± desvio padrão.
Letras minúsculas diferentes na horizontal: amostras diferem significativamente ($\alpha \leq 0.05$) entre si para um mesmo tempo de análise (teste t de Student).
Letras maiúsculas diferentes na vertical: amostras diferem significativamente ($\alpha \leq 0.05$) entre si comparando-se o tempo inicial (0 dia) e final (80 dias) de análise (teste t de Student).

A Figura 2 mostra os resultados de concentração de células viáveis no requeijão probiótico e no requeijão simbiótico pelo método de incubação *spread plate* ao longo de armazenamento sob refrigeração a 10 °C durante 80 dias.

A Figura 3 mostra os resultados de concentração de células viáveis no requeijão probiótico e no requeijão simbiótico pelo método de incubação *pour plate* ao longo de armazenamento sob refrigeração a 10 °C durante 80 dias.

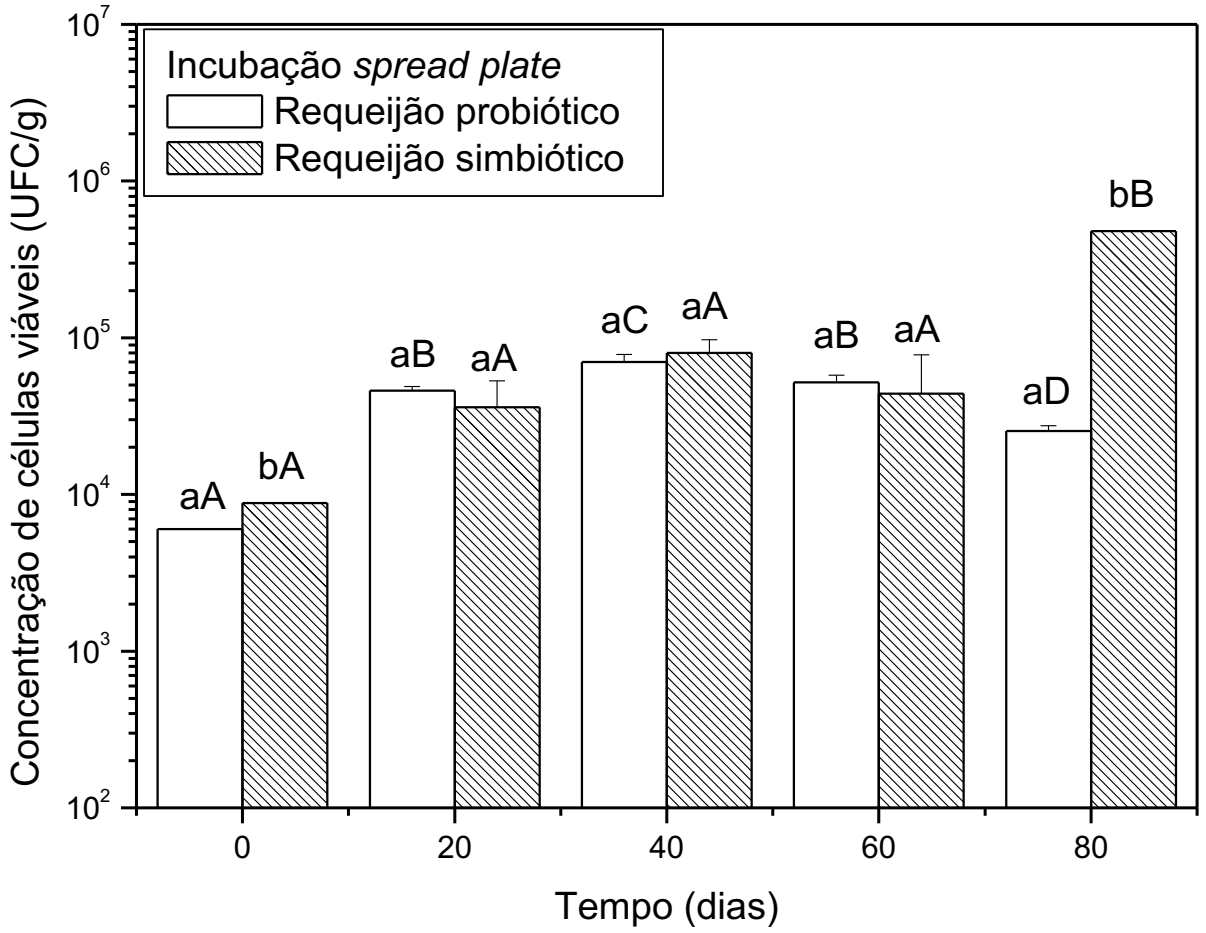


Figura 2: Concentração de células viáveis no requeijão probiótico e no requeijão simbiótico pelo método de incubação *spread plate* ao longo de armazenamento sob refrigeração a 10 °C durante 80 dias.

Análises efetuadas em duplicata. Valores são expressos como média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes para o mesmo tempo de análise comparando-se as amostras probiótica e simbiótica: amostras diferem significativamente ($\alpha \leq 0.05$) pelo teste t de *Student*. Letras maiúsculas diferentes para a mesma amostra comparando-se os diferentes tempos de análise: amostras diferem significativamente ($\alpha \leq 0.05$) pelo teste ANOVA.
Fonte: autoria própria.

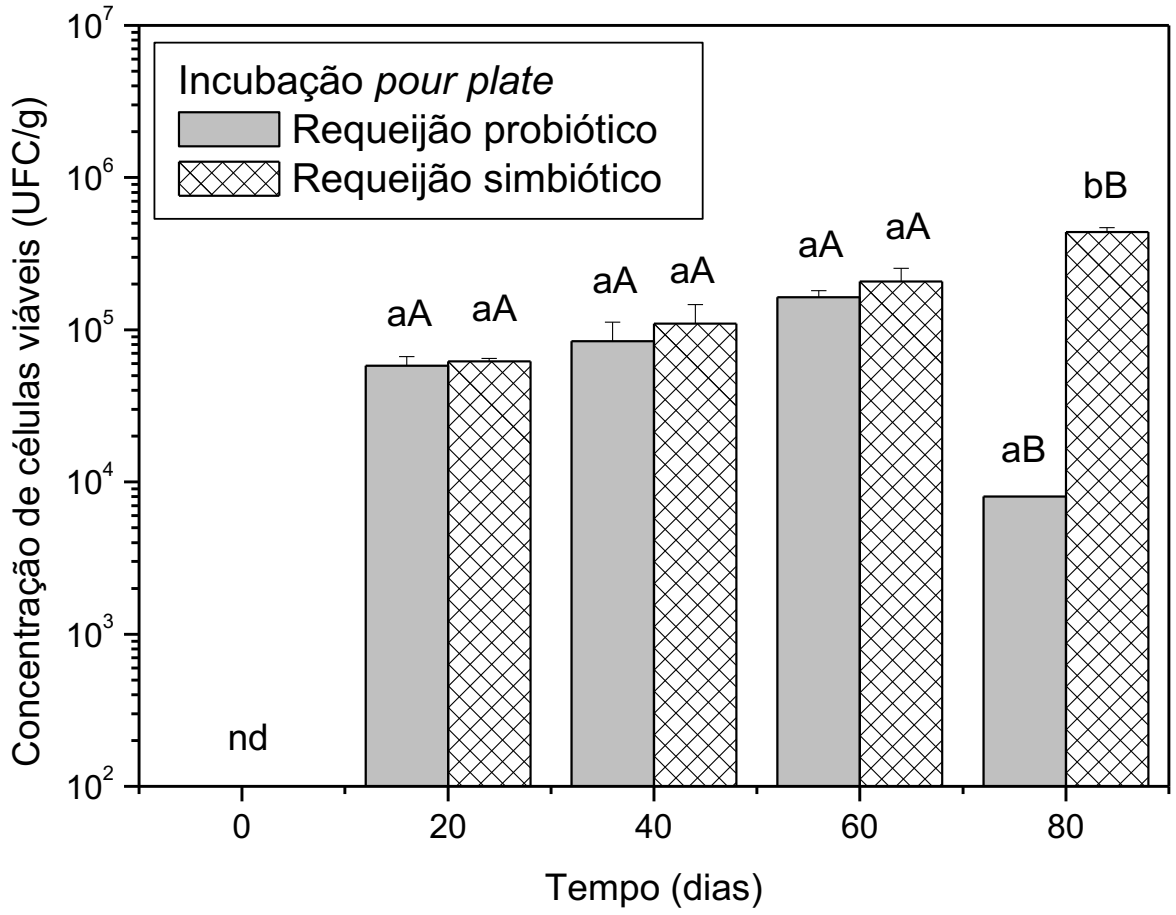


Figura 3: Concentração de células viáveis no requeijão probiótico e no requeijão simbiótico pelo método de incubação *pour plate* ao longo de armazenamento sob refrigeração a 10 °C durante 80 dias.

Análises efetuadas em duplicata. Valores são expressos como média ± desvio padrão. nd: não analisado. Letras minúsculas diferentes para o mesmo tempo de análise comparando-se as amostras probiótica e simbiótica: amostras diferem significativamente ($\alpha \leq 0.05$) pelo teste t de *Student*. Letras maiúsculas diferentes para a mesma amostra comparando-se os diferentes tempos de análise: amostras diferem significativamente ($\alpha \leq 0.05$) pelo teste ANOVA.

Fonte: autoria própria.

8. DISCUSSÃO

8.1. Composição centesimal

De acordo com os resultados da Tabela 1, observa-se há diferenças significativas entre todos os parâmetros analisados quando são comparadas as amostras de requeijão tradicional e requeijão simbiótico para um mesmo tempo de análise. Os resultados percentuais de proteínas, lipídios, umidade e cinzas foram menores para o requeijão simbiótico (7,63 ± 0,19; 16,20 ± 0,00; 60,87 ± 0,18 e 1,23 ± 0,03, respectivamente) do que para o requeijão tradicional (8,78 ± 0,23; 19,82 ± 0,27; 67,80 ± 0,21 e 1,41 ± 0,06, respectivamente) para o tempo inicial. O mesmo comportamento foi observado após 80 dias de armazenamento a 10 ^{o}C, com valores de proteínas, lipídios, umidade e cinzas de 7,85 ± 0,10; 10,76 ± 0,81; 61,24 ± 0,12 e 1,20 ± 0,03, respectivamente, para o requeijão simbiótico, em comparação com o requeijão tradicional (8,76 ± 0,07; 14,09 ± 0,70; 67,53 ± 0,90 e 1,34 ± 0,04, respectivamente).

A diminuição dos percentuais de proteínas, lipídios, umidade e cinzas para o requeijão simbiótico está diretamente relacionada ao aumento significativo no percentual de carboidratos deste tipo de requeijão. Para o tempo inicial, foi observado um teor de 2,19 % para o requeijão tradicional e 14,07 % para o requeijão simbiótico. Essa alteração pode ser explicada pela adição do FOS ao requeijão simbiótico. Os FOS presentes no produto utilizado são naturalmente encontrados nos alimentos, como cebola, alho, alho-poró, alcachofra, chicória, beterraba, entre outros. Os FOS são oligossacarídeos pertencentes ao grupo dos frutanos do tipo inulina, que apresentam ou não um grupo terminal de glicose (MACEDO et al., 2020). São formados por oligômeros de frutose, e as principais estruturas químicas encontradas são 1-kestose, nistose e frutofuranosil nistose (LIBONI e KUN, 2003).

Após 80 dias, os valores de carboidratos aumentam para 8,28 % para o requeijão tradicional e 19,17 % para o requeijão simbiótico, maiores que os observados no tempo inicial. Microrganismos como bifidobactérias e lactobacilos, naturalmente presentes no leite ou no probiótico adicionado, são capazes de hidrolisar as ligações dos FOS por possuírem inulinases, levando à produção de ácido lático,

ácidos graxos de cadeia curta e açúcares, com consequente diminuição do pH e o favorecimento do crescimento dos microrganismos (MACEDO et al., 2020).

Os resultados de umidade das amostras do requeijão tradicional (67,80 e 67,53 %) para o tempo inicial e após 80 dias de armazenamento, respectivamente, estão acima do preconizado pela legislação, que estabelece uma variação no percentual de umidade de 60 a 65 % (BRASIL, 1997). Este resultado pode ser contornado se for realizado um ajuste de metodologia, modificando-se a quantidade de leite adicionado para finalizar a preparação do requeijão de forma a ser atingida a umidade máxima permitida para este produto. Os resultados de umidade das amostras de requeijão simbiótico (60,87 e 61,24%) para o tempo inicial e após 80 dias de armazenamento, respectivamente, estão dentro do preconizado pela legislação.

Considerando uma porção de 30 g do produto, o resultado obtido para proteínas (2,63 g) no requeijão tradicional no tempo 0 é similar ao conteúdo proteico de um requeijão tradicional comercial (2,7 g), enquanto que menores teores de carboidratos (0,66 g) e lipídios (5,95 g) são observados quando comparados ao produto comercial, que apresenta 1,2 g de carboidratos e 6,9 g de lipídios.

8.2. Análise microbiológica

Os métodos empregados para a determinação da concentração de células probióticas viáveis foram o método *spread plate*, para microrganismos aeróbios, e o método *pour plate*, para microrganismos anaeróbicos facultativos e microaerófilos.

Os resultados de concentração de microrganismos viáveis pelo método de incubação *spread plate* demonstram que, comparando-se as amostras probiótica e simbiótica para um mesmo tempo de análise, as amostras diferem estatisticamente entre si no tempo 0, com valores de 6,0 x 10^3 UFC/g para a amostra probiótica e 8,8 x 10^3 UFC/g para o requeijão simbiótico. Após 20, 40 e 60 dias de armazenamento, as concentrações celulares para ambas as amostras de requeijão atingiram valores em torno de 5,5 x 10^4 UFC/g, mas sem diferença estatística entre si ao nível de 5 % de significância. Para 80 dias de armazenamento, observa-se uma diminuição na concentração de células para a amostra probiótica (2,5 x 10^4 UFC/g), enquanto que para a amostra simbiótica foi observado um aumento significativo na concentração celular, atingindo 4,8 x 10^5 UFC/g. Este resultado sugere que a presença do FOS

como prebiótico favoreceu o crescimento microbiano apenas após 80 dias de armazenamento do produto simbiótico.

Lima (2018), ao investigar a adição de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 em requeijão, encontraram valores de concentração celular de 5,2 x 10^{10} UFC/g pelo método *spread plate*, após 20 dias de armazenamento refrigerado. No entanto, foi utilizada uma suspensão celular mais concentrada para a inoculação do microrganismo, que foi de 1,2 x 10^{10} UFC/mL.

Os resultados de concentração de microrganismos viáveis pelo método de incubação *pour plate* para o tempo de 20 dias foram de 5,8 x 10^4 UFC/g para a amostra probiótica e 6,2 x 10^4 UFC/g para a amostra simbiótica, sem diferença estatística significativa entre as amostras. As concentrações celulares para a amostra probiótica tiveram um aumento nos seus valores, atingindo 1,6 x 10^5 UFC/g para 60 dias de armazenamento. No entanto, após 80 dias a concentração de células diminuiu para 8 x 10^3 UFC/g. Para a amostra simbiótica, as concentrações celulares tiveram um aumento gradual, atingindo 4,4 x 10^5 UFC/g após 80 dias de armazenamento. De maneira similar ao método de incubação *spread plate*, observou-se que o FOS teve uma maior influência no crescimento celular do requeijão simbiótico para o tempo de 80 dias.

Drunkler (2009) desenvolveu um requeijão cremoso simbiótico pela adição de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e os prebióticos inulina e oligofrutose. Foi verificado que todas as formulações apresentaram valores superiores a 10^6 UFC/g durante a vida útil do produto analisado (60 dias), sendo que a inulina e a oligofrutose exercerem efeito significativo sobre a enumeração do probiótico no 30º dia de fabricação.

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

A ANVISA (BRASIL, 2008) estabelece as concentrações de 10^8 a 10^9 UFC/g ou mL na recomendação diária do produto pronto para consumo. Dessa forma, o requeijão desenvolvido neste trabalho não pode ser caracterizado como um alimento probiótico, mas pode ser considerando rico em FOS, resultando em um alimento prebiótico.

9. CONCLUSÃO

Foram preparadas amostras de requeijão tradicional, probiótico e simbiótico de acordo com o fluxograma proposto, e a forma de adição do prebiótico e do probiótico durante a elaboração dos produtos foi eficaz. A composição físico-química das duas amostras de requeijão foram distintas, mostrando que com a adição do FOS e do SimFort o requeijão simbiótico teve maior quantidade de carboidratos que o tradicional. A contagem das cepas de probióticos não obteve crescimento significativo com a adição do FOS e com o decorrer do tempo, ao longo dos 80 dias de armazenamento refrigerado do produto, atingindo no máximo $6,4x10^5$ UFC/g, sendo desta forma não considerado como requeijão simbiótico e sim um requeijão prebiótico devido a adição de FOS.

REFERÊNCIAS

ABADÍA-GARCIA, L.; CARDATOR, A.; CAMPO, S. T. M.; ARVÍZU, S. M.; CASTÃNOTOSTADO, 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.

AMBALAM, Padma et al. Probiotics, prebiotics and colorectal cancer prevention. **Best practice & research Clinical gastroenterology**, v. 30, n. 1, p. 119-131, 2016.

ANVISA. (2019). Agência Nacional de Vigilânica Sanitária. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde**. Brasília: ANVISA. Recuperado em 9 de julho de 2019, de http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtosvegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/alegacoes-de-propriedade-funcional-aprovadas_anvisa.pdf.

ARANTES, Fernanda et al. Benefícios do Uso de Prebióticos na Modulação da Microbiota Intestinal de Pacientes Obesos: Uma versão Narrativa. 2022.

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.

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

BINDELS, Laure B. et al. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 12, n. 5, p. 303-310, 2015.

BRASIL – **Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA**, Resolução n° 18 de 03 de dezembro de 1999 a. Aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulalgem de alimentos. Disponível em: https://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MjI0OQ%2C%2C. Acesso em: 25 jun 2021.

BRASIL, 2016. **Ministério da saúde. Agência nacional de vigilância sanitária**. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/alegacoes-de-propriedade-funcional-aprovadas_anvisa.pdf>. Acesso em: 04 jul. 2021.

BRASIL. (1997). Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Leite e Produtos Lácteos.

Portaria n. 359. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Requeijão Cremoso ou Requesón. Brasília.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria da Defesa Agropecuária. Portaria nº 359, de 04 de setembro de 1997. Aprova Regulamento Técnicopara 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 SAÚDE. **Guia alimentar para a população brasileira**. Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 241, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Brasília, 2018. Disponível em:https://www.in.gov.br/materia//asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379910/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-241-de-26-de-julho-de-2018-34379900. Acesso em: 15 jul. 2022.

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.

CARDERELLI, 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.

CASHMAN, Kevin D. Diet, nutrition, and bone health. **The journal of Nutrition**, v. 137, n. 11, p. 2507S-2512S, 2007.

COMERFORD, Kevin B. et al. Global review of dairy recommendations in food-based dietary guidelines. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 671999, 2021

CRITTENDEN, R. Incorporating probiotics into foods, U: Handbook of Probiotics and Prebiotics, II izdanje, Lee, YK i Salminen, S. 2009.

DA COSTA, Gisela Silva; DA SILVA, Marcia Cristina; DA CRUZ, Adriano Gomes. REQUEIJÃO CREMOSO: PROCESSAMENTO E INOVAÇÕES. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v. 2, n. 12, p. 23-42, 2022.

DAMIÁN, Morayma Ramírez et al. Functional Foods, Nutraceuticals and Probiotics: A Focus on Human Health. **Microorganisms**, v. 10, n. 5, p. 1065, 2022.

DA SILVA, Vania Santos; ORLANDELLI, Ravely Casarotti. Desenvolvimento de alimentos funcionais nos últimos anos: uma revisão. **Revista Uningá**, v. 56, n. 2, p. 182-194, 2019.

DE SOUZA LIMA, Carlos Henrique Gomes et al. Análises físico-químicas e microbiológicas de iogurtes com micro-organismos probióticos. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 13, n. 1, 2019.

DRUNKLER, D.A., 2009. Produção de requeijão cremoso simbiótico. Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná, 180p.

FERRÃO, Luana L. et al. The xylooligosaccharide addition and sodium reduction in requeijão cremoso processed cheese. **Food research international**, v. 107, p. 137-147, 2018.

FERRONATTO, Andressa Neuhaus et al. Development of a freeze-dried symbiotic obtained from rice bran. **Biotechnology Reports**, v. 30, p. e00636, 2021.

FONTELES, Thatyane Vidal; RODRIGUES, Sueli. Prebiotic in fruit juice: processing challenges, advances, and perspectives. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 55-61, 2018.

FRANCK, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. **British journal of Nutrition**, v. 87, n. S2, p. S287-S291, 2022

FUNG, Thomas C.; OLSON, Christine A.; HSIAO, Elaine Y. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. **Nature neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 145-155, 2017

GABE, Kamila Tiemann; JAIME, Patricia Constante. Práticas alimentares segundo o Guia alimentar para a população brasileira: fatores associados entre brasileiros adultos, 2018. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 29, p. e2019045, 2020.

GETENET, Melese et al. Tubular Structures of Calcium Carbonate: Formation, Characterization, and Implications in Natural Mineral Environments. **Chemistry–A European Journal**, v. 27, n. 65, p. 16135-16144, 2021

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.

GUINÉ, Raquel PF et al. Study of the influence of sociodemographic and lifestyle factors on consumption of dairy products: preliminary study in Portugal and Brazil. **Foods**, v. 9, n. 12, p. 1775, 2020.

HAO, X., XIA, Y., WANG, Y., ZHANG, X., LIU, L., 2023, The addition of probiotic promotes the release of ACE-I peptide of Cheddar cheese: Peptide profile and molecular docking, **International Dairy Journal**, v. 137, 105507.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, I. A. L. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 2008.

ISAAP. Probiotics. [S. l.]: Isaap, 2019. Disponível em: https://isappscience.org/for-scientists/resources/probiotics/. Acesso em: 11 ago. 2022.

KIM, Joo Yeon et al. Protective effect of Lactobacillus casei HY2782 against particulate matter toxicity in human intestinal CCD-18Co cells and Caenorhabditis elegans. **Biotechnology letters**, v. 42, n. 4, p. 519-528, 2020.

LEEUWENDAAL, N. K. et al. Protection of candidate probiotic lactobacilli by Cheddar cheese matrix during simulated gastrointestinal digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 92, p. 105042, 2022.

LIBONI, Passos; KUN, Park. Frutooligossacarídeos: Implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v. 33, 2003.

LIMA, Ivone da Silva. **Desenvolvimento de um requeijão probiótico**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso.

MACEDO, Leandro Levate; VIMERCATI, Wallaf Costa; ARAÚJO, Cintia da Silva. Fruto-oligossacarídeos: aspectos nutricionais, tecnológicos e sensoriais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 23, 2020.

MARKOWIAK, Paulina; ŚLIŻEWSKA, Katarzyna. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 1021, 2017.

MASSON, Ana Paula; VIGANÓ, Otavio José; BORDIGNON, Sinara. Requeijão cremoso de copo com teor reduzido de sódio e enriquecido com fibras. **Revista E-Tech: Tecnologias para Competitividade Industrial-ISSN-1983-1838**, v. 9, n. 1, p. 123-149, 2016.

MCLOUGHLIN, Rebecca F. et al. Short-chain fatty acids, prebiotics, synbiotics, and systemic inflammation: a systematic review and meta-analysis. **The American journal of clinical nutrition**, v. 106, n. 3, p. 930-945, 2017.

MONTEAGUDO-MERA, A. et al. High purity galacto-oligosaccharides (GOS) enhance specific Bifidobacterium species and their metabolic activity in the mouse gut microbiome. **Beneficial microbes**, v. 7, n. 2, p. 247, 2016.

MORAES, G.M.D., DOS SANTOS, K.M.O., BARCELOS, S.C., LOPES, S.A., EGITO, A.S., 2018, Potentially probiotic goat cheese produced with autochthonous adjunct culture of Lactobacillus mucosae: Microbiological, physicochemical and sensory attributes, **LWT**, v. 94, p. 57-63.

NAGHMOUCHI, Karim et al. Lactobacillus fermentum: A bacterial species with potential for food preservation and biomedical applications. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 60, n. 20, p. 3387-3399, 2020.

NEFFE-SKOCIŃSKA, Katarzyna et al. Tendências e possibilidades do uso de probióticos na produção de alimentos. In: **Alimentos alternativos e substitutos** . Imprensa Acadêmica, 2018. p. 65-94.

OOI, Soo Liang; CORREA, Dianne; PAK, Sok Cheon. Probiotics, prebiotics, and low FODMAP diet for irritable bowel syndrome–What is the current evidence?. **Complementary therapies in medicine**, v. 43, p. 73-80, 2019.

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

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

SAAD, Susana Marta Isay; FARIA, José de Assis Fonseca; CRUZ, Adriano Gomes da. Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas. 2011.

SALMINEN, Seppo et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 18, n. 9, p. 649-667, 2021

SEOLIN, Vanessa Jurca et al. Substituição de açúcar por frutooligosacarídeo em sorvete. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 7, n. 2, 2019.

SHOKRYAZDAN, Parisa et al. Effects of prebiotics on immune system and cytokine expression. **Medical microbiology and immunology**, v. 206, n. 1, p. 1-9, 2017.

SILVA, R. C. (2020). Elaboração e caracterização de requeijão cremoso bubalino. saborizado com frutas tropicais.2020.94f. Dissertação (Trabalho de conclusão do curso Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Paraubebas

SILVA, SV da. **Desenvolvimento de iogurte probiótico com prebiótico. 2007. 107f** . 2007. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado (Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Santa Maria, RS.

SOUZA, V. L.C. **Requeijão cremoso probiótico: avaliação da viabilidade de cepas de Lactobacillus, caracterização físico-química e sensoria**l. 2017. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena, University of São Paulo, Lorena, 2017. doi:10.11606/D.97.2017.tde-20112017-130142. Acesso em: 2021-07-07.

STANTON, C. et al. Queijo probiótico. **International Dairy Journal** , v. 8, n. 5-6, pág. 491-496, 1998.

STEFE, C. de A.; ALVES, M. I. R.; RIBEIRO, R. L. Probióticos, prebióticos e simbióticos. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 3, n. 1, p. 16-33, 2008.

SWANSON, K.S., GIBSON, G.R., HUTKINS, R., REIMER, R.A., REID, G., VERBEKE, K., SCOTT, K.P., HOLSCHER, H.D., AZAD, M.B., DELZENNE, N.M., SANDERS, M.E., 2020, The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics, **Nature Reviews – Gastroenterology & Hepatology**, v.17, p. 687-701.

VAN HOORDE, K., VAN LEUVEN, I., DIRINCK, P., HEYNDRICKX, M., COUDIJZER, K., VANDAMME, P., HUYS, G., 2010, Selection, application and monitoring of Lactobacillus paracasei strains as adjunct cultures in the production of Gouda-type cheeses, **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 226-235.

WITSCHINSKI, FABIELE. Elaboração de iogurte com adição de fruto-oligossacarídeo e cultura probiótica (Bifidobacterium). 2012.

YADAV, Manoj Kumar et al. Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1-17, 2022.

YUYAMA, Lucia Kiyoko Ozaki et al. Desenvolvimento e aceitabilidade de geléia dietética de cubiu (Solanum sessiliflorum Dunal). **Food Science and Technology**, v. 28, p. 929-934, 2008.

ZHOU, Zhao et al. Engineering probiotics as living diagnostics and therapeutics for improving human health. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2020.

ZOCCAL, R. [2017]. A força do agro e do leite no Brasil. Revista Balde Branco, v.52, n.634, 2017. Disponível em: http://www.baldebranco.com.br/. Acessado em 05 de Setembro de 2022.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Imagens ilustrativas dos experimentos de obtenção do requeijão

(A) Aquecimento do leite

(B) Adição de vinagre de álcool

(C) Separação da massa e do soro

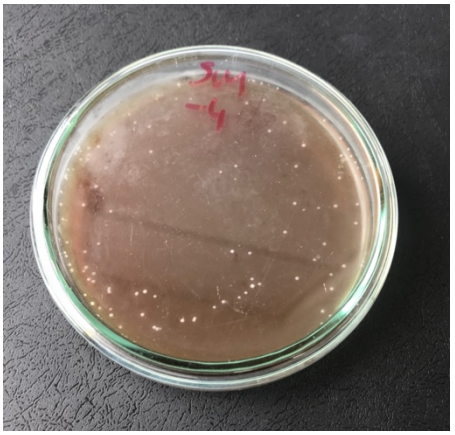
(D) Massa

(E) Requeijão pronto

APÊNDICE B – Imagens ilustrativas da adição do probiótico e preparo das amostras de requeijão

(A) Divisão do requeijão	(B) Adição do probiótico (Simfort®) ao requeijão	(C) Divisão das amostras de requeijão em recipientes de vidro esterilizados

APÊNDICE C – Imagens ilustrativas de etapas da análise centesimal e microbiológica

<table>
<tr>
<td>
(A) Pesagem das amostras e cápsulas de porcelana na análise de umidade e cinzas – Tempo inicial</td>
<td>
(B) Pesagem das amostras e cápsulas de porcelana na análise de umidade e cinzas – Tempo final</td>
</tr>
<tr>
<td>
(C) Resultado da análise de lipídios</td>
<td> 
(D) Placa de Petri com colônias na diluição 10^{-4}</td>
</tr>
</table>