

**CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA – CEA – USP**  
**RELATÓRIO DE CONSULTA**

**PROJETO:**

“Desenvolvimento de queijo fresco simbiótico”

**PESQUISADORA :** Flávia Carolina Alonso Buriti

**ÁREA E INSTITUIÇÃO :** Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP

**FINALIDADE DO PROJETO :** Mestrado

**PARTICIPANTES DA ENTREVISTA :** Denise Aparecida Botter

Flávia Carolina Alonso Buriti

Júlia Maria Pavan Soler

Kim Samejima Mascarenhas Lopes

Larissa Teruko Kaneko

Susana Marta Isay Saad

**DATA :** 04/05/2004

**FINALIDADE DA ENTREVISTA :** Sugestão para análise de dados

**RELATÓRIO ELABORADO POR :** Kim Samejima Mascarenhas Lopes

Larissa Teruko Kaneko

## 1. Introdução

Nos dias atuais, há um grande interesse por parte da indústria alimentícia no desenvolvimento de produtos considerados “saudáveis”, como resposta à própria demanda do consumidor. Com este estímulo, a pesquisa alimentícia vem apresentando inovações e seus resultados ajudam a contribuir significativamente nesta área.

Engajada neste contexto, a pesquisadora estuda um processo de elaboração de queijo fresco cremoso, com dois componentes adicionais: uma cultura probiótica e um ingrediente prebiótico, que são aditivos alimentares de efeito benéfico sobre a composição da flora intestinal. A adição destes componentes ao alimento resulta em efeitos simbióticos e, por serem benéficos ao organismo humano, caracterizam-se também como alimentos funcionais.

O objetivo da presente pesquisa é estudar a viabilidade da obtenção do queijo fresco cremoso simbiótico processado com a adição da cultura probiótica e do ingrediente prebiótico. Este queijo será avaliado por meio da sobrevivência do microorganismo probiótico contido no queijo, de suas características microbiológicas, de sua textura e demais características físico-químicas ao longo de um período de refrigeração.

A finalidade da consulta é obter do CEA sugestões sobre a análise dos dados, para que se possa avaliar o efeito da adição desses componentes probióticos e prebióticos na produção do queijo.

## 2. Descrição do Estudo

São produzidos três diferentes tipos de queijo: um deles ( $T_1$ ) é o queijo controle, ou seja, é o queijo cremoso produzido da forma usual contendo apenas a adição de uma bactéria não probiótica conhecida como *starter*<sup>1</sup>. O segundo ( $T_2$ ), além do *starter*, possui o aditivo probiótico e o terceiro ( $T_3$ ) contém todos os aditivos: o *starter*, o probiótico e o prebiótico. O componente probiótico consiste de

---

<sup>1</sup> Esta bactéria tem nome científico *Streptococcus thermophilus*.

suplementos alimentares à base de microorganismos vivos que afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o balanço de sua microbiota – ou flora – intestinal. O ingrediente prebiótico compreende a inulina e alguns oligossacarídeos, especialmente frutooligossacarídeos, que promovem a multiplicação de bifidobactérias no intestino grosso. Por fim, a cultura *starter* tem o intuito de sedificar o queijo.

Neste experimento, foi utilizada a cultura probiótica da bactéria *Lactobacillus paracasei*. Da mesma forma, a inulina foi o ingrediente prebiótico considerado. Cada um dos tipos de queijo (tratamentos em questão) é produzido a partir de 10L de matéria-prima (à base de leite). Inicialmente, foram produzidos quatro lotes para cada tipo de queijo, totalizando assim 40L de matéria-prima para cada tipo de queijo. A pesquisadora tem ainda o intuito de produzir um quinto lote para cada tipo de queijo, mas ainda não definiu se realmente haverá ou não tal fabricação.

Depois de produzidos, cada lote é dividido em cerca de 40 potes de queijo que são armazenados a uma temperatura de 5°C até que sejam utilizados para a medição das variáveis de interesse em 0, 1, 7, 14 ou 21 dias após sua produção. Estes frascos constituem, assim, as unidades experimentais.

Serão verificados três tipos de características em cada um dos tratamentos: **microbiológicas**, **físico-químicas** e de **textura**, cada uma delas composta de suas respectivas variáveis de interesse. Como as medições das variáveis têm caráter destrutivo das unidades experimentais, aquelas que forem utilizadas em um determinado instante de tempo serão descartadas imediatamente após as medições, não mais participando do experimento.

Para todas as características, as unidades experimentais (réplicas) serão escolhidas ao acaso para que sejam realizadas as medições em cada um dos instantes de tempo.

### 3. Descrição das Variáveis

As características **microbiológicas** medidas são contagens (em unidades formadoras de colônia – *ufc*) de algumas bactérias de interesse, presentes no queijo. Dentre elas, para os tratamentos T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>, serão contadas as *ufc* da bactéria *Lactobacillus paracasei* (cultura probiótica) presentes em um grama da unidade experimental. Os dados serão colhidos no dias 0, 1, 7, 14 e 21, a partir da data de fabricação do queijo (dia 0). Para isto, serão utilizados 2 potes de queijo (duas medidas) de cada lote<sup>2</sup>. Para que o queijo seja considerado probiótico – e o objetivo principal da pesquisadora é produzir um tipo de queijo com tal característica – o número de bactérias não deve ser menor que  $6 \cdot \log_{10}(ufc/g)$  em qualquer instante medido.

Além da bactéria *Lactobacillus paracasei* que tem efeito benéfico e é uma das variáveis de interesse principal na análise, outras contagens serão feitas<sup>3</sup> para que possam ser monitoradas por conta de restrições impostas pela Legislação. São elas: coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus ssp.*, bolores e leveduras (todos esses microorganismos são utilizados como indicadores de contaminação do alimento). A coleta dos dados será feita de forma análoga à da bactéria *Lactobacillus paracasei*.

As características **físico-químicas** consideradas são: teor de lipídios (em porcentagem), pH (grandeza adimensional)<sup>4</sup>, atividade de água (grandeza adimensional), umidade (em porcentagem) e acidez titulável (em porcentagem). Estas variáveis, exceto pelo teor de lipídios - que está sendo medido apenas no primeiro dia seguinte à fabricação dos lotes dos queijos - estão sendo tomadas nos dias 1, 7, 14 e 21 seguintes à fabricação. Para a variável *acidez titulável*, as avaliações são realizadas em dois potes de cada lote (por conta de encargos financeiros), em cada um dos instantes de tempo. Para as demais variáveis, as medidas são tomadas utilizando-se três potes de cada lote, em cada um dos instantes de tempo.

---

<sup>2</sup> Estes dados serão expressos em  $\log_{10}(ufc/g)$ .

<sup>3</sup> Idem anterior.

<sup>4</sup> O pH é uma grandeza adimensional que varia entre -7 (caráter básico) à +7 (caráter ácido).

Finalmente quanto à **textura**, as características de interesse são: dureza (medida em N)<sup>5</sup>, coesividade (valor adimensional), adesividade (N\*s)<sup>6</sup>, elasticidade (valor adimensional) e gomosidade (N). Estas variáveis são medidas cinco ou mais vezes, para cada instante - 1, 7, 14, 21 dias após a refrigeração - em cada um dos lotes (cada medida é obtida de um pote de queijo).

Das cinco unidades experimentais utilizadas para a avaliação de textura, três são reutilizadas na avaliação físico-química. O mesmo não ocorre na avaliação microbiológica, pois ela deve ser realizada imediatamente após a abertura do frasco (condições assépticas), sendo todo o conteúdo necessário para sua avaliação.

O número de amostras utilizadas em cada análise foi planejado de acordo com a quantidade de queijo produzido, como especificado na descrição do estudo, sempre a partir de 10L de matéria-prima. Além disso, o aparelho utilizado é calibrado a cada medição realizada para cada coleta de dados.

#### **4. Situação do Estudo**

O estudo está na fase de coleta dos dados. Os mesmos estão sendo armazenados pela pesquisadora em planilhas do Excel de acordo com o tratamento, produção<sup>7</sup> (réplica do tratamento), amostra e dia de coleta. Conhecidas as formas de coleta dos dados, uma sugestão de planilha para a inserção e estruturação das respostas e fatores no banco de dados é apresentada na Tabela 1 a seguir. Nesta, os dados estariam organizados por Tratamento, lote, potes de queijo (unidade amostral), dia de coleta e valores das variáveis de interesse. Nenhum valor da variável dia foi adicionado à tabela, pois o que ocorre de fato é que os frascos são escolhidos aleatoriamente no dia do estudo.

---

<sup>5</sup> No Sistema Internacional de Medidas (SI), N representa unidade de medida para Newton.

<sup>6</sup> Idem anterior, para representação de segundos.

<sup>7</sup> Produção corresponde a cada um dos lotes produzidos.

**Tabela 1.** Sugestão para inserção de respostas no banco de dados

TRAT	LOTE	FRASCO	Dia	L.c. <sup>8</sup>	E.c. <sup>9</sup>	S.spp. <sup>10</sup>	...	Umidade	Ativ. Água
1	1	1							
1	1	2							
1	1	3							
...	...	...							
1	1	39							
1	1	40							
1	2	1							
1	2	2							
1	2	3							
...	...	...							
1	2	39							
1	2	40							
...	...	...							
1	4	1							
...	...	...							
1	4	40							
2	1	1							
...	...	...							
2	4	40							
3	1	1							
...	...	...							
3	4	40							

## 5. Sugestões do CEA

Vimos, na descrição do estudo, que as respostas (características físico-químicas, microbiológicas e de textura) têm caráter multivariado, o que pode tornar a análise complexa. Uma alternativa seria aplicar análises univariadas, em que cada variável resposta seria analisada separadamente para as três características avaliadas.

O experimento sugere uma estrutura de blocos para os lotes, com o fator **Tratamento** cruzado com os níveis de **Tempo** (Neter et. al., 1996). As respostas são multivariadas, uma vez que temos várias respostas em cada uma das características (que serão especificadas na **Descrição das Variáveis**).

<sup>8</sup> *Lactobacillus paracasei*.

<sup>9</sup> *Escherichia coli*.

<sup>10</sup> *Staphylococcus spp.*

Teremos então, cinco análises para as características físico-químicas, cinco para as características de textura, e seis para as características microbiológicas. Para cada uma dessas características, poderíamos adotar o seguinte delineamento:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \theta_k + (\beta\theta)_{jk} + \varepsilon_{ijkl}, \text{ onde}$$

$Y_{ijkl}$  : valor da variável resposta de interesse avaliado no bloco  $i$  (lote), tratamento  $j$ , tempo  $k$  e frasco  $l$ .  $i = 1, \dots, n$ , sendo  $n$  o número de lotes produzidos,  $j = 1, 2, 3$ ,  $k = 0, 1, 7, 14, 21$

$\mu$  : média geral

$\alpha_i$  : efeito do bloco  $i$ ,  $i = 1, \dots, n$ , sendo  $n$  o número de lotes produzidos

$\beta_j$  : efeito do tratamento  $j$ ,  $j = 1, 2, 3$

$\theta_k$  : efeito do tempo  $k$ ,  $k = 0, 1, 7, 14, 21$

$(\beta\theta)_{jk}$  : efeito de interação entre tratamento  $j$  e tempo  $k$ .

$\varepsilon_{ijkl}$  : erro aleatório

Suposição:  $\varepsilon_{ijkl} \sim \text{Normal}(0, \sigma^2)^{11}$  independentes

Restrições:

$$\sum_i \alpha_i = 0 \quad \sum_j \beta_j = 0 \quad \sum_k \theta_k = 0 \quad \sum_j \beta_j \theta_k = 0 \quad \sum_k \beta_j \theta_k = 0.$$

Eventualmente, algumas das variáveis podem apresentar correlação alta com a principal resposta de interesse (contagem microbiológica de *Lactobacillus paracasei*). Se, além disso, o comportamento delas for constante entre tratamentos e ao longo do tempo, podemos sugerir sua adição no modelo como covariável.

Outra questão levantada pela pesquisadora seria a possibilidade da utilização da mediana ao invés da média como medida resumo das variáveis de interesse na comparação entre tratamentos. Isto pode ser considerado, e até sugerido, caso os dados apresentem uma assimetria muito grande e uma variação

---

<sup>11</sup> Significa que os erros são independentes, identicamente distribuídos, segundo uma distribuição normal de probabilidade, com média 0 (zero) e variância constante, positiva e finita.

aceitável do ponto do vista biológico, em que pontos mais distantes da concentração dos dados possam influenciar de forma significativa a média. É preciso salientar, porém, que a média tem propriedades mais conhecidas, sendo mais utilizada que a mediana. Isto se deve ao fato de haver mais resultados teóricos envolvendo a média do que a mediana (para detalhes, veja Bussab e Morettin, 2002). Outra forma de tratar dados assimétricos é a utilização de modelos robustos, que não supõem normalidade para os erros ou homocedasticidade (ver Paula, 2004). Ressaltamos, porém, que os ajustes dos modelos de ANOVA a serem utilizados sempre devem ser seguidos por uma análise de resíduos para verificar a veracidade das suposições feitas inicialmente. Estas suposições são necessárias para a validade dos resultados do modelo e, se infringidas, podem acarretar numa má estimação de parâmetros, variância dos estimadores muito alta e, conseqüentemente, em possíveis conclusões equivocadas das análises.

## 6. Bibliografia

BUSSAB, W.O. e MORETTIN, P.A. (2002) **Estatística Básica**, 5ed. São Paulo: Ed. Saraiva.

NETER, J., KUTNER, M.H., NACHTSHEIM, C.J. and WASSERMAN, W. (1996) **Applied Linear Statistical Models**, 4ed, New York: McGraw-Hill.

PAULA, G.A. (2004) **Modelos de Regressão com apoio computacional**, São Paulo, Versão preliminar.