

LUCIANA BORIN DE OLIVEIRA

**Efeito de goma acácia e inulina na viabilidade de
bactérias probióticas e nas características
físico-químicas de leite fermentado simbiótico**

São Caetano do Sul
2008

LUCIANA BORIN DE OLIVEIRA

**Efeito de goma acácia e inulina na viabilidade de
bactérias probióticas e nas características
físico-químicas de leite fermentado simbiótico**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia
Mauá do centro Universitário do Instituto Mauá de
Tecnologia para obtenção do título de Mestre em
Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos

Linha de Pesquisa: Análise e Otimização de
Processos Industriais

Orientadora: Prof. Dra. Cynthia Jurkiewicz Kunigk

São Caetano do Sul
2008

Oliveira, Luciana Borin de

Efeito de goma acácia e inulina na viabilidade de bactérias probióticas e nas características físico-químicas de leite fermentado simbótico / Luciana Borin de Oliveira – São Caetano do Sul, SP: CEUN-EEM, 2008. 104p.

Dissertação (mestrado) Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, SP, 2008.

Orientadora: Prof. Dra. Cynthia Jurkiewicz Kunigk

1. Probióticos 2. Prebióticos 3. Leite fermentado. Luciana Borin de Oliveira I. Instituto Mauá de Tecnologia Centro Universitário. Escola de Engenharia Mauá II. Título

Roberto Cecília Milton Eliane Junior Laura
Teresa Claudio Amigos Mestres Professores
Mônica Amigos Gláucia Esperança Eliana Alessandra
Ricardo Marco M^aAntonia Alegria Paiê Amigos Ilana
Marcelo Rômulo Leonardo Jorgina Gerson Amigos
Roberto Cecília Milton Eliane Junior Laura
Amores Coragem Amigos Helena Mestres M^aEli
Lucia Gláucia Cynthia Eliana Eloisa Ricardo
Futuro Equipe Isaac Amigos Ilana Dr. Fusco
Marcelo Rômulo Adão Leonardo Jorgina Amigos
Roberto Cecília Milton Eliane Junior Laura
Teresa Claudio Mestres Silvana Família Cris
Adriana Gláucia Carinho Força Ricardo
Dr. Urgel Anninha M^aCélia Amigos Ilana G9 Eu
Daiana Eliana Rômulo Leonardo Gina Amigos
Roberto Cecília Milton Eliane Junior Laura
Vó Claudio Amigos Força Marco Vontade Fé
Cristiane Gláucia Paz Tempo Miriam Eloisa
Marcelo Rômulo Leonardo Gina Amigos Margareth
Roberto Cecília Milton Eliane Junior Laura
Mônica Gláucia Espiritual Cynthia Eliana Rodrigo
Adriana Cris Dr. Fusco Elaine Flávia Ilana
Eloisa Resiliência Leonardo Incentivo Gina Amigos Daniela
Roberto Cecília Milton Eliane Junior Laura
Cléa Teresa Claudio Amigos Mestres Camila
Sibele Família Gláucia Cynthia Equipe Alessandra
Juliana Lágrimas Tatiana Susy Flávia Alegria
Marcelo
Ana Lídia
Lu Amigos
Daniela
Pais Família

**Dedico este trabalho a todos que nunca deixaram
de me incentivar e apoiar nas horas em
que tudo pareceu perdido...**

Roberto Bruno Tio Dr. Fusco Amigos Eliana Marilucia
Fielis Colaboradores Incentivadores Torcedores Companheiros

Agradecimentos

A Professora Dra. Cynthia Jurkiewicz Kunigk pelo apoio, paciência, incentivo e orientação do primeiro ao último dia sem cansaço.

A Professora Dra. Eliana Paula Ribeiro pelo exemplo de vida, professora, mestre, amiga.

Ao Professor Dr. Péricles Brasiliense Fusco pelo ombro amigo, lições de vida, apoio em todas as horas e amor de pai.

Ao Professor Dr. Urgel de Almeida Lima pela torcida incessante, auxílio nos momentos de portas fechadas e carinho.

Aos professores da banca Dra. Eliana, Dra. Alcina e Dra. Cynthia por aceitarem a incumbência, por seu interesse na tarefa de avaliar o trabalho e fornecer suas valiosas contribuições.

À Fundação Salvador Arena, Faculdade de Tecnologia Termomecanica pelo apoio.

À Escola de Engenharia Mauá e seu Departamento de Química e de Alimentos pela permissão de uso de seus laboratórios, cuidado e atenção que viabilizou a realização deste sonho.

A Professora Dra. Alessandra Baroni pela alegria contagiatante, abraço amigo e apoio.

A Professora Alessandra Paula de Noronha, Sérgio Martins e Pedro Torralba Jodar pela revisão na hora certa.

Aos amigos e técnicos de laboratório Rômulo, Leonardo e Gina pelo suporte em todas as horas.

A amiga Teresa Yazbek Pereira pelo apoio, amostras e conselhos.

A amiga e técnica de laboratório Gláucia Fernandes Cândido pelo acompanhamento incondicional.

Aos amigos Ilana e Marcelo pelos momentos fotográficos.

A sempre presente Maria Margareth pelos avisos, conselhos e estímulos.

A mamãe Cecília, ao papai Milton, Eliane, Junior e Laura, pela compreensão, apoio e torcidas constantes e indispensáveis.

Ao marido Roberto pela paciência e apoio em todos os momentos

Ao Bruno pelo incentivo obrigatório a finalização do trabalho.

A Deus por todos vocês existirem na minha vida!

"Se você não mudar quem você é,
você continuará tendo o que sempre teve".

A pergunta importante não é "quanto vou ter?",
mas sim "no que vou me transformar?"

Não é "quanto vou ganhar?"
mas sim "quanto vou aprender?"

RESUMO

A combinação de ingredientes prebióticos e probióticos em um só produto, o leite fermentado simbiótico, pode trazer ao consumidor as vantagens nutricionais relacionadas a estes ingredientes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de goma acácia e inulina na viabilidade de bactérias probióticas em leite fermentado. Diferentes concentrações de goma acácia e inulina foram investigadas de acordo com um Planejamento Composto Central com três réplicas no ponto central, totalizando 11 experimentos. Como inóculo, foi empregado o fermento comercial composto por, *Lactobacillus acidophilus La5*, *Bifidobacterium animalis Bb-12* e *Streptococcus thermophilus*. A presença de goma acácia e inulina não influenciaram significativamente a produção de ácido láctico durante a fermentação ($p > 0,05$). Entretanto as menores variações de pH ocorreram quando concentrações de goma acácia em torno de 30 g/L foram empregadas ($p < 0,05$). Durante 64 dias de armazenamento a 10 °C, a viabilidade de *L. acidophilus* e *S. thermophilus* no leite fermentado não foi influenciada significativamente ($p > 0,05$) pela presença de goma acácia e inulina. Por outro lado, o aumento da concentração de inulina favoreceu significativamente ($p < 0,05$) a sobrevivência de *Bifidobacterium* no leite fermentado armazenado por 64 dias. Com exceção dos produtos com baixa concentração de inulina, todas as demais formulações mantiveram os níveis de bactérias probióticas acima de 10^6 UFC.g⁻¹. A elasticidade e firmeza das amostras analisadas não foram influenciadas pela presença de goma acácia e inulina ($p > 0,05$) durante os 64 dias de armazenamento a 10 °C. A análise sensorial de preferência e intenção de compra mostrou, para um nível de significância de 5 %, uma diferença não significativa entre as amostras de leite fermentado com e sem a adição de inulina e goma acácia.

Palavras-chaves: leite fermentado simbiótico, probiótico, prebiótico, inulina, goma acácia.

ABSTRACT

The combination of probiotic and prebiotic ingredients in just one product, the symbiotic fermented milk, can bring to consumers the benefits related to these nutritional ingredients. The purpose of this study was to evaluate the influence of acacia gum and inulin on the viability of probiotic bacteria in fermented milk. Different concentrations of acacia gum and inulin were investigated, according to a Central Composite Design with three replicates at central point, which means a total of 11 trials. A commercial starter culture, containing *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium animalis* Bb-12 and *Streptococcus thermophilus* was employed as inoculum. The presence of acacia gum and inulin did not influence significantly the production of lactic acid during the fermentation ($p > 0.05$). Meanwhile the smallest variations of pH occurred when the concentrations of acacia gum around 30 g/L were employed ($p < 0.05$). During 64 days of storage at 10 °C, the viability of *L. acidophilus* and *S. thermophilus* on fermented milk was not influenced significantly ($p > 0.05$) by the presence of acacia gum and inulin. Furthermore, the increased inulin concentration enhanced significantly ($p < 0.05$) the survival of *Bifidobacterium* in fermented milk stored for 64 days. Except for the products with low concentration of inulin, all other formulations maintained the population of probiotic bacteria above 10^6 cfu.g⁻¹. The elasticity and firmness of the samples analized were not affected by the presence of gum acacia and inulin ($p > 0.05$) during the 64 days of storage at 10 °C. Moreover, the addition of the prebiotics ingredients, acacia gum and inulin, did not interfere significantly ($p > 0.05$) in the sensorial preference and purchase intention of fermented milk.

Keywords: symbiotic fermented milk, probiotic, prebiotics, inulin, acacia gum.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - DIAGRAMA DE BLOCOS CONTENDO AS PRINCIPAIS ETAPAS DE PRODUÇÃO DO LEITE FERMENTADO	45
FIGURA 2 – MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS DE <i>Streptococcus thermophilus</i> CULTIVADAS EM MEIO M17 ADICIONADO DE SOLUÇÃO DE LACTOSE 10% APÓS 48 HORAS DE INCUBAÇÃO A 37°C	48
FIGURA 3 - MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS DE <i>Lactobacillus acidophilus</i> CULTIVADAS EM MEIO MRS APÓS 72 HORAS DE INCUBAÇÃO A 43°C	48
FIGURA 4 - MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS DE <i>Bifidobacterium animalis</i> CULTIVADAS EM MEIO MRS ADICIONADO DE SOLUÇÕES A, B E C APÓS 72 HORAS DE INCUBAÇÃO A 37°C	49
FIGURA 5 – pH EM FUNÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO EM DIFERENTES TEMPERATURAS	53
FIGURA 6 – PORCENTAGEM DE ÁCIDO LÁTICO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO EM DIFERENTES TEMPERATURAS	53
FIGURA 7 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DE VARIAÇÃO DO pH EM 1,0 h DE FERMENTAÇÃO	63
FIGURA 8 - CURVAS DE CONTORNO PARA A EQUAÇÃO 3	63
FIGURA 9 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DE VARIAÇÃO DO pH EM 2,0 h DE FERMENTAÇÃO	64
FIGURA 10 - CURVAS DE CONTORNO PARA A EQUAÇÃO 5	64
FIGURA 11 – CURVA DA MÉDIA DE pH E % DE ÁCIDO LÁTICO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO (• pH E ■ % DE ÁCIDO LÁTICO)	66
FIGURA 12 – VALORES MÉDIOS DE pH E % DE ÁCIDO LÁTICO DOS LEITES FERMENTADOS DURANTE O ARMAZENAMENTO A 10 °C (• pH E ■ % DE ÁCIDO LÁTICO)	69
FIGURA 13 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DA CONCENTRAÇÃO DE <i>Bifidobacterium</i> EM 64 DIAS DE ARMAZENAMENTO	75

FIGURA 14 - CURVAS DE CONTORNO PARA O MODELO DA CONCENTRAÇÃO DE *Bifidobacterium* EM 64 DIAS DE ARMAZENAMENTO

75

FIGURA 15 – DISTRIBUIÇÃO DAS NOTAS DOS PROVADORES PARA OS LEITES FERMENTADOS SIMBIÓTICOS (P: FORMULAÇÃO PADRÃO, A: GOMA ACÁCIA, B: INULINA E C: MISTURA DE GOMA ACÁCIA E INULINA)

82

FIGURA 16 – PORCENTAGEM DE INTENÇÃO DE COMPRA DOS LEITES FERMENTADOS SIMBIÓTICOS (P: FORMULAÇÃO PADRÃO, A: GOMA ACÁCIA, B: INULINA E C: MISTURA DE GOMA ACÁCIA E INULINA)

84

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSTOS ATIVOS, EFEITOS FISIOLÓGICOS E PRINCIPAIS FONTES DE ALIMENTOS	20
TABELA 2 - MICROORGANISMOS UTILIZADOS COM APELÔ PROBIÓTICO	24
TABELA 3 - CAUSAS E MECANISMOS DOS EFEITOS BENÉFICOS ATRIBUÍDOS AOS PROBIÓTICOS	27
TABELA 4 - NÍVEIS E VALORES DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL	43
TABELA 5 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL	43
TABELA 6 - CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA ENUMERAÇÃO DOS MICROORGANISMOS NO LEITE FERMENTADO	49
TABELA 7 - VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO (DP) DE pH DO LEITE DURANTE A FERMENTAÇÃO EM DIFERENTES TEMPERATURAS	52
TABELA 8 - VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO (DP) DE % DE ÁCIDO LÁTICO NO LEITE DURANTE A FERMENTAÇÃO EM DIFERENTES TEMPERATURAS	52
TABELA 9 - COEFICIENTES DO MODELO LINEAR DE pH EM FUNÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO	54
TABELA 10 - COEFICIENTES DO MODELO LINEAR DE ACIDEZ (%) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO	54
TABELA 11 - VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO (DP) DA CONCENTRAÇÃO DE MICROORGANISMOS NO LEITE FERMENTADO DETERMINADOS 24 h APÓS SUA PRODUÇÃO	56
TABELA 12 - VALORES DE pH DO LEITE DURANTE A FERMENTAÇÃO	57
TABELA 13 - VALORES DE % DE ÁCIDO LÁTICO DURANTE A FERMENTAÇÃO	58
TABELA 14 - VARIAÇÃO DE pH DO LEITE DURANTE A FERMENTAÇÃO	58
TABELA 15 - VARIAÇÃO DE ACIDEZ DO LEITE DURANTE A	

FERMENTAÇÃO	58
TABELA 16 - COEFICIENTES DO MODELO DE VARIAÇÃO DE pH EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS AVALIADAS PARA OS DIFERENTES TEMPOS DE FERMENTAÇÃO	60
TABELA 17 - COEFICIENTES DO MODELO DE VARIAÇÃO DA % DE ÁCIDO LÁTICO EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS AVALIADAS E VALOR <i>P</i> PARA OS DIFERENTES TEMPOS DE FERMENTAÇÃO	60
TABELA 18 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O MODELO DA VARIAÇÃO DE pH EM 1 h DE FERMENTAÇÃO	61
TABELA 19 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O MODELO DA VARIAÇÃO DE pH EM 1,5 h DE FERMENTAÇÃO	61
TABELA 20 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O MODELO DA VARIAÇÃO DE pH EM 2,0 h DE FERMENTAÇÃO	61
TABELA 21 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O MODELO DA VARIAÇÃO DE pH EM 2,5 h DE FERMENTAÇÃO	61
TABELA 22 – VALORES DE pH DO LEITE FERMENTADO DURANTE O ARMAZENAMENTO A 10 °C	67
TABELA 23 – VALORES DE % ÁCIDO LÁTICO NO LEITE FERMENTADO DURANTE O ARMAZENAMENTO A 10 °C	67
TABELA 24 - COEFICIENTES DO MODELO DE pH EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS AVALIADAS DURANTE O ARMAZENAMENTO A 10°C	68
TABELA 25 - COEFICIENTES DO MODELO DE ACIDEZ (% ÁCIDO LÁTICO) EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS AVALIADAS DURANTE O ARMAZENAMENTO A 10°C	68
TABELA 26 - CONCENTRAÇÃO DE <i>Streptococcus thermophilus</i> NO LEITE FERMENTADO DURANTE O ARMAZENAMENTO A 10 °C	71
TABELA 27 - CONCENTRAÇÃO DE <i>Lactobacillus acidophilus</i> NO LEITE FERMENTADO DURANTE O ARMAZENAMENTO A 10 °C	71
TABELA 28 - CONCENTRAÇÃO DE <i>Bifidobacterium animalis</i> NO LEITE FERMENTADO DURANTE O ARMAZENAMENTO A 10 °C	72
TABELA 29 - COEFICIENTES DO MODELO DA CONCENTRAÇÃO DE <i>Streptococcus thermophilus</i> EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS AVALIADAS PARA OS DIFERENTES DIAS DE ARMAZENAMENTO A 10 °C	72
TABELA 30 - COEFICIENTES DO MODELO DA CONCENTRAÇÃO DE	

<i>Lactobacillus acidophilus</i> EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS AVALIADAS PARA OS DIFERENTES DIAS DE ARMAZENAMENTO A 10 °C	73
TABELA 31 - COEFICIENTES DO MODELO DA CONCENTRAÇÃO DE <i>Bifidobacterium animalis</i> EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS AVALIADAS PARA OS DIFERENTES DIAS DE ARMAZENAMENTO A 10 °C	73
TABELA 32 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O MODELO DA CONCENTRAÇÃO DE <i>Bifidobacterium</i> EM 64 DIAS DE ARMAZENAMENTO	74
TABELA 33 - CONCENTRAÇÃO MÉDIA DOS MICRORGANISMOS NO LEITE FERMENTADO EM DIFERENTES TEMPOS DE ARMAZENAMENTO A 10°C	78
TABELA 34 – VALORES DE ELASTICIDADE DO LEITE FERMENTADO DURANTE O ARMAZENAMENTO A 10°C	79
TABELA 35 – VALORES DE FIRMEZA DO LEITE FERMENTADO DURANTE O ARMAZENAMENTO A 10°C	79
TABELA 36 - COEFICIENTES DO MODELO DE ELASTICIDADE EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS AVALIADAS DURANTE O ARMAZENAMENTO A 10 °C	80
TABELA 37 - COEFICIENTES DO MODELO DE FIRMEZA EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS AVALIADAS DURANTE O ARMAZENAMENTO A 10 °C	80
TABELA 38 - NOTAS MÉDIAS DA ANÁLISE SENSORIAL DOS LEITES FERMENTADOS	83
TABELA 39 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O TESTE DE PREFERÊNCIA INDIRETA DOS LEITES FERMENTADOS	83
TABELA 40 - NOTAS MÉDIAS DA INTENÇÃO DE COMPRA DOS DEGUSTADORES PARA OS LEITES FERMENTADOS	84
TABELA 41 - RESUMO DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA PARA TESTE DE INTENÇÃO DE COMPRA DOS LEITES FERMENTADOS	85

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS	19
3.2 PROBIÓTICOS	23
3.3 PRODUTOS LÁCTEOS PROBIÓTICOS	28
3.4 PREBIÓTICOS	32
3.4.1 Frutooligossacarídeo e Inulina	34
3.4.2 Goma Acácia	37
3.5 SIMBIÓTICOS	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	41
4.2 PREBIÓTICOS	41
4.2.1 Inulina	41
4.2.2 Goma acácia	41
4.3 CULTURA LÁCTICA	42
4.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	42
4.5 PROCESSO DE PRODUÇÃO DO LEITE FERMENTADO	44
4.6 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	46
4.6.1 Determinação de pH e acidez	46
4.7 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	46
4.7.1 Meios de cultura	46
4.7.1.1 M17 Ágar (Oxoid)	46
4.7.1.2 MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) Ágar (Oxoid)	47
4.7.1.3 MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) Ágar (Oxoid) com adição de soluções A, B e C	47
4.7.2 Procedimento	47
4.8 ANÁLISE DE TEXTURA	50
4.9 ANÁLISE SENSORIAL	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52

5.1 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO	52	
5.2 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE INULINA E GOMA ACÁCIA	57	
5.2.1 Variação do pH e acidez titulável durante a fermentação	57	
5.2.2 Variação do pH e acidez titulável durante o armazenamento	67	
5.2.3 Análises microbiológicas	71	
5.2.4 Análises de textura	79	
5.2.5 Análise sensorial	82	
6 CONCLUSÃO	86	
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87	
ANEXO I	GOMA ACÁCIA	99
ANEXO II	INULINA	101
ANEXO III	INFORMATIVO BIORICH	103
ANEXO IV	FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL	104

1 INTRODUÇÃO

O mercado dos produtos ditos saudáveis vem aumentando a cada ano, novos ingredientes e novos produtos estão sendo desenvolvidos pela indústria com apelo de reduzir problemas de saúde e proporcionar uma vida mais saudável (MOIRA, 2003). Neste contexto aparecem os alimentos funcionais definidos como um alimento semelhante em aparência ao alimento convencional, a ser consumido como parte da dieta usual, capaz de produzir comprovados efeitos metabólicos e fisiológicos úteis à manutenção de uma boa saúde física e mental, além das suas funções nutricionais básicas (LAJOLO, 2001). Atualmente, existem cinco segmentos de mercado onde encontrar alimentos funcionais: bebidas, produtos lácteos, produtos de confeitoraria, panificação e cereais matinais. Os produtos lácteos são considerados saudáveis pelos consumidores e fazem parte da dieta alimentar cotidiana na maioria dos países (HELLER, 2001). São excelentes veículos para as bactérias probióticas e ingredientes prebióticos, podendo ser interessantes produtos simbióticos.

Simbióticos são alimentos ou suplementos alimentares contendo microorganismos probióticos e ingredientes prebióticos, resultando em produtos com as características funcionais dos dois grupos que em sinergia vão beneficiar o hospedeiro (GIBSON, 1999, FULLER; GIBSON, 1997, SAAD, 2006). O alimento simbiótico age através de duas estratégias para aumentar a população de microorganismos benéficos no trato intestinal: a primeira é pelo consumo de bactérias próbióticas; a segunda é aumentando o número de microorganismos benéficos já residentes no trato intestinal através do consumo de prebióticos, que vão estimular as bactérias endógenas específicas do hospedeiro no seu sítio de colonização (COLLINS; GIBSON, 1999, SCHREZENMEIR; VRESE, 2001, TUOHY *et al.*, 2003). Para produzir o efeito desejado, as substâncias fisiologicamente ativas devem estar presentes nos alimentos funcionais, em quantidade suficiente e adequada até o momento da ingestão (SGARBieri; PACHECO, 1999).

O intestino humano contém mais de 400 espécies diferentes de bactérias, incluindo as benéficas, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, presentes respectivamente no intestino delgado e grosso dos seres humanos. A variação da composição e estabilidade da microbiota intestinal pode variar de indivíduo para

indivíduo, influenciando a resposta da atuação de microorganismos probióticos (TANNOCK, 1998, BOURLIOUX; KOLETZO; GUARNER, 2003).

Os frutooligossacarídeos (FOS) e a inulina são considerados prebióticos uma vez que promovem seletivamente o crescimento de probióticos como *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium*. Essa característica faz com que os FOS promovam benefícios à saúde humana, desde a redução de colesterol sérico até o auxílio na prevenção de alguns tipos de câncer (BORGES, 2001, ADA, 1999).

Ozer, Akin e Ozer (2005) verificaram que a adição de inulina e lactulose num iogurte suplementado com *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus acidophilus* não afeta o crescimento das cepas características do iogurte, mas estimula o crescimento de *Bifidobacterium bifidum* no produto.

Wyatt, Bayliss, Holcroft (1986) observaram um aumento da proporção de microbiota benéfica após a ingestão de 10 g/dia de goma acácia na dieta de voluntários. Mais recentemente, Cherbut *et al.* (2003), apontaram um aumento significativo no número de bifidobactérias e de bactéria lácticas nos seres humanos que consumiram de 10 a 15 gramas diárias de goma acácia durante dez dias. Esse efeito mostrou-se muito significativo já que a população inicial de bifidobactérias era muito baixa. Outro estudo com seres humanos mostrou que a dose de 6 g/dia de goma acácia consumidos durante quatro semanas apresentou maior benefício no crescimento de *Bifidobacterium* do que o estudo realizado com os FOS, porém, de acordo com os mesmos autores, se administradas em conjunto, essas duas fibras apresentam um efeito de sinergístico sobre o crescimento de bifidobactérias (ROCHAT *et al.*, 2001).

Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a influência do uso de prebióticos goma acácia e frutooligossacarídeo na viabilidade de bactérias probióticas *Bifidobacterium* e *Lactobacillus acidophilus* num leite fermentado durante a fermentação e armazenamento do produto.

2 OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho foram:

- Avaliar o efeito da temperatura de fermentação no pH, na acidez e na viabilidade dos organismos probióticos no leite fermentado;
- Determinar a influência de inulina e goma acácia no pH e acidez titulável durante a fermentação e durante o armazenamento do leite fermentado;
- Avaliar a influência de inulina e goma acácia na viabilidade das bactérias probióticas e na textura do leite fermentado durante o armazenamento;
- Comparar as características sensoriais do leite fermentado adicionado de inulina e goma acácia com o leite fermentado sem adição de prebióticos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

A melhoria da dieta dos consumidores pode aumentar a expectativa e qualidade de vida da população. O mercado dos produtos ditos saudáveis vem aumentando a cada ano, novos ingredientes e novos produtos estão sendo desenvolvidos pela indústria com apelo de reduzir problemas de saúde e proporcionar uma vida mais saudável (MOIRA, 2003).

Segundo o “Institute of Medicine of the U.S. National Academy of Sciences”, qualquer alimento ou ingrediente alimentar que possa exercer efeito benéfico no organismo pode ser considerado alimento funcional (SIMHON *et al.*, 1982). A tabela 1 apresenta exemplos de compostos ativos e seus efeitos fisiológicos, presentes em alguns alimentos.

TABELA 1 - COMPOSTOS ATIVOS, EFEITOS FISIOLÓGICOS E PRINCIPAIS FONTES DE ALIMENTOS

Compostos ativos	Efeitos	Fontes
Terpenóides		
Carotenóides	Atividade antioxidant e anticancerígena (útero, próstata, seio, cólon, reto e pulmão)	Frutas (melancia, mamão, melão, damasco, pêssego), vegetais (cenoura, espinafre, abóbora, brócolis, tomate, inhame, nabo)
Fitoesteróis	Redução dos níveis de colesterol total e LDL-colesterol	Óleos vegetais, sementes, nozes, algumas frutas e vegetais
Glucosinolatos	Detoxificação do fígado, atividade Anticancerígena e antimutagênica	Brócolis, couve-flor, repolho, rabanete, palmito e alcaparra
Fenólicos		
Ácido fenólico	Atividade antioxidant	Frutas (uva, morango, frutas cítricas), vegetais (brócolis, repolho, cenoura, berinjela, salsa, pimenta, tomate, agrião), chá
Flavonóides	Atividades antioxidant, redução do risco de câncer e de doença cardiovascular	Frutas cítricas, brócolis, couve, tomate, berinjela, soja, abóbora, salsa, nozes, cereja
Isoflavonas	Inibição do acúmulo de estrogênio, redução das enzimas carcinogênicas	Leguminosas (principalmente soja), legumes
Catequinas	Atividade antioxidant, redução do risco de doença cardiovascular	Uva, vinho tinto, morango, chá verde, chá preto, cacau
Antocianinas	Atividade antioxidant, proteção contra mutagênese	Frutas (amora, framboesa)
Ácidos graxos		
Omega3	Redução do risco de câncer e de doenças cardiovasculares, redução da pressão arterial	Peixes de água fria, óleo de canola, linhaça e nozes
Omega6		
Oligossacarídeos		
Polissacarídeos	Redução do risco de câncer e dos níveis de colesterol	Frutas, verduras, leguminosas cereais, integrais
Prebióticos		
	Regulação do trânsito intestinal e da pressão arterial, redução do risco de câncer e dos níveis de colesterol total e triglicerídeos, redução da intolerância à lactose	Raiz de chicória, cebola, alho, tomate, aspargo, alcachofra, banana, cevada, cerveja, centeio, aveia, trigo, mel
Probióticos		
	Regulação do trânsito intestinal, redução do risco de câncer e dos níveis de colesterol total e triglicerídeos, estímulo ao sistema imunológico	Iogurte, leite fermentado

FONTE: adaptado de FAGUNDES; COSTA, 2003

O termo alimento funcional foi introduzido, inicialmente, no Japão, em meados de 1980, referindo-se a alimento processado, contendo ingredientes que auxiliam as funções específicas do organismo, além de serem nutritivos (HASLER, 1998). Até essa data, o Japão era o único país que havia formulado um processo de regulamentação específico para os alimentos funcionais, conhecidos como Alimentos para Uso Específico na Saúde - FOSHU (Foods for Specified Health Use). Estes alimentos são qualificados e trazem um selo de aprovação do Ministério da Saúde e Previdência Social Japonês (COSTA; BORÉM, 2003).

Para os países da comunidade européia, tais como Bélgica, Holanda, Reino Unido e Suécia, foram elaboradas normas próprias baseadas em consensos entre os cientistas, autoridades governamentais e indústrias (CÂNDIDO; CAMPOS, 1995).

No Brasil a legislação estabelece critérios específicos para que um alimento possa ser considerado como funcional. A portaria nº 398 de 30/04/99, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde no Brasil fornece a definição legal de alimento funcional: "todo alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica."

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária publicou duas resoluções relacionadas aos alimentos funcionais (BRASIL, 1999a; BRASIL, 1999b):

a) aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos (Resolução ANVISA/MS nº 18, de 30/04/1999).

b) aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem (Resolução ANVISA/MS nº 19, de 30/04/1999).

Nessas resoluções, faz-se distinção entre alegação de propriedade funcional e alegação de propriedade de saúde, como segue:

- Alegação de propriedade funcional: é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que uma substância (seja nutriente ou não) tem no

crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano,

- Alegação de propriedade de saúde: é aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde. Não são permitidas alegações de saúde que façam referência à cura ou prevenção de doenças.

Dessa forma, de acordo com a Sociedade Brasileira de Alimentos Funcionais (SBAF), os novos alimentos que surgirem no mercado deverão trazer em seu rótulo qual o benefício para a fisiologia do organismo e porque reduzem o risco de certa doença, informação que deverá ser comprovada através de pesquisas científicas.

Atualmente, existem cinco segmentos de mercado onde pode-se encontrar alimentos funcionais: bebidas, produtos lácteos, produtos de confeitoraria, produtos de panificação e cereais matinais. O crescimento e desenvolvimento desse mercado estão garantidos pelo consumidor que mostra grande interesse por esses produtos. Regulamentação, controle e comunicação, baseados em pesquisas científicas ajudarão a construir a confiança de consumidores e produtores em uma cadeia de alimentos mais saudável, segura e eticamente correta.

De acordo com a Federação das Indústrias do Estado de São Paulo (FIESP), as estimativas apontam que o mercado mundial de alimentos funcionais movimentou em 2005, cerca de US\$ 60 bilhões na Europa, Estados Unidos e Japão. No Brasil, esses novos produtos respondem por pelo menos US\$ 600 milhões e o conjunto de alimentos funcionais já representa cerca de 6 % da produção nacional da indústria de alimentação (REBELO, 2006).

Um alimento natural pode ser genuinamente funcional, ou tornar-se funcional pelo aumento de concentração, adição ou substituição de um componente, em função da presença de componentes bioativos, nutrientes ou não nutrientes, contidos nos alimentos que exercem efeito benéfico para a saúde (ROBERFROID, 1988).

Lajolo (2001) define alimento funcional como um alimento semelhante em aparência ao alimento convencional, a ser consumido como parte da dieta usual, capaz de produzir comprovados efeitos metabólicos e fisiológicos úteis à manutenção de uma boa saúde física e mental, além das suas funções nutricionais básicas.

O campo dos alimentos funcionais, todavia, está no início. As alegações sobre os benefícios à saúde dos alimentos funcionais devem ser baseadas em critérios científicos comprovados (CLYDESDALE, 1997). O efeito de um alimento funcional pode ser tanto na manutenção do estado saudável das pessoas, como na redução do risco de ocorrências de enfermidades (TORRES, 1999). De acordo com Abdalla (2000), são necessários mais estudos clínicos para estabelecer a eficácia das substâncias biologicamente ativas, em diferentes populações, assim como estudos toxicológicos, para assegurar que altas doses destas substâncias não apresentem efeitos negativos para os indivíduos.

Para produzir o efeito desejado, as substâncias fisiologicamente ativas devem estar presentes nos alimentos funcionais, em quantidade suficiente e adequada (SGARBIERI; PACHECO, 1999). Os níveis seguros de ingestão de alimentos funcionais serão considerados, quando estes forem avaliados no contexto de uma dieta saudável, e somente serão estabelecidos quando estudos clínicos tiverem sido documentados na literatura científica. Pesquisas com animais têm proporcionado alguma indicação da ingestão desejada, entretanto, esses dados são difíceis de serem extrapolados para o homem (ADA, 1999).

O desenvolvimento de alimentos funcionais constitui uma real oportunidade de contribuição para a melhoria da qualidade da dieta e seleção de alimentos que podem afetar positivamente a saúde e bem estar dos indivíduos. É importante destacar que um alimento pode ser funcional para uma população em geral, ou para grupos particulares, definidos por suas características genéticas, sexo, idade ou outros fatores (PALOU; SERRA, 2000).

3.2 PROBIÓTICOS

Alimentos contendo bactérias probióticas são classificados na categoria de alimentos funcionais, já que fornecem benefícios à saúde além da nutrição básica do indivíduo (STANTON *et al.*, 2003). O termo probiótico, de origem grega, significa “para a vida”, e tem sido empregado das maneiras mais diversas ao longo dos últimos anos (GUARNER; SCHAAFSMA, 1998). De acordo com Fuller e Gibson (1997), probiótico é definido como um suplemento alimentar contendo bactérias viáveis que

afetam benéficamente o hospedeiro pela melhoria do balanço da microbiota intestinal. Atualmente probióticos são definidos como microorganismos vivos que administrados em dose adequada, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (SANDERS, 2003).

Culturas probióticas têm sido intensamente estudadas e empregadas em diversos tipos de alimentos. A tabela 2 apresenta uma relação das principais espécies de microorganismos utilizados comercialmente com apelo probiótico.

TABELA 2 - MICROORGANISMOS UTILIZADOS COM APELO PROBIÓTICO

Para humanos	Para animais
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. casei</i>
<i>L. casei</i> Shirota	<i>L. delbrueckii bulgaricus</i>
<i>L. delbrueckii bulgaricus</i>	
<i>L. reuteri</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>Bifidobacterium adolescents</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>B. bifidum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>B. breve</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>B. longum</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>B. infantis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Saccharomyces buolardii</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
	<i>Torulopsis</i> spp.

FONTE: Tannock, 1998

Microorganismos probióticos como *Lactobacillus rhamnosus GG*, *Lactobacillus reuteri* e certas cepas de *Lactobacillus casei* também têm sido investigados para uso medicinal (De ROOS; KATAN, 2000, VRESE; MARTEAU, 2007).

Há no intestino humano mais de 400 espécies diferentes de bactérias, incluindo *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, presentes respectivamente no intestino delgado e grosso dos seres humanos. A variação da composição e estabilidade da microbiota intestinal pode variar de indivíduo para indivíduo, influenciando a resposta da atuação de microorganismos probióticos (TANNOCK, 1998, BOURLIOUX; KOLETZO; GUARNER, 2003). Segundo Penna *et al.* (2000), os microorganismos somente influem no ecossistema onde se encontram quando suas populações são superiores a 10^7 UFC/g, porém no caso específico da microbiota intestinal de crianças recém-nascidas, tais valores podem ser menores.

A quantidade e freqüência de consumo de probióticos necessários para assegurar os benefícios funcionais a eles atribuídos ainda é uma questão não totalmente conclusa pela literatura, Gilliland, Reilly e Kim (2002) recomendam a ingestão semanal mínima de 300 a 500 g de produtos lácteos fermentados contendo entre 10^6 a 10^7 UFC/mL, ou seja, entre 1 milhão e 10 milhões de células probióticas por mililitro de produto. Vários estudos afirmam que o produto probiótico deve ser ingerido diariamente e em quantidade que garanta que as bactérias chegarão ao trato intestinal em número suficiente para realizar efeitos benéficos ao corpo humano (SAMONA; ROBINSON, 1991, TAMIME; MARSHALL; ROBINSON, 1995). Concentrações acima de 10^6 organismos viáveis por grama de produto durante toda vida de prateleira são recomendáveis (LEE; SALMINEM, 1995).

De acordo com a ANVISA (2002), a quantidade mínima viável de microorganismo probiótico deve estar na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na porção diária, o que equivale ao consumo de 100 g de produto contendo entre 10^6 a 10^7 UFC de microorganismos probióticos. Valores menores podem ser aceitos desde que comprovada sua eficácia. Deve ser apresentado laudo de análise do produto que comprove a quantidade mínima viável do microorganismo até o final do prazo de validade. A quantidade do probiótico em unidades formadoras de colônias (UFC), contida na porção diária do produto pronto para consumo, deve ser declarada no rótulo, próximo à alegação.

Lactobacillus casei Shirota, uma das bactérias probióticas mais usadas na produção de leite fermentado e de bebidas lácteas ácidas é um exemplo de microorganismo que sobrevive e se multiplica no trato gastrintestinal. Estudos mostram que a recuperação desta bactéria a partir das fezes, após a ingestão do leite fermentado, é da ordem de 10^7 bactérias por grama (YUKI *et al.*, 1999).

Os benefícios à saúde produzidos, muitas vezes são comuns a diversos probióticos (KLAENHAMMER, 2000). *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium spp*, tem demonstrado características como: controle do pH do intestino através da liberação de ácidos que restringem o crescimento de patógenos e bactérias putrefatativas, alívio à intolerância a lactose e propriedades anticarcinogênicas e anticolesterolemicas (TRINDADE, 2001, ROLFE, 2000, GOMES; MALCATA, 1999).

Em crianças, o efeito de bifidobactérias parece ser muito significante contra diarréias virais, sugerindo que um mecanismo imunológico seja responsável pelos efeitos benéficos (SAAVEDRA, 2000).

Estudos de McIntosh (2003) associam os iogurtes adicionados de bactérias probióticas como alimentos com significativa capacidade para redução de precursores de câncer. Não há evidências experimentais diretas da supressão do câncer humano como resultados do consumo de produtos lácteos fermentados, existem evidências indiretas baseadas em estudos labororiais e vasta literatura (HIRAYAMA; RAPTER, 2000). O efeito antitumoral, relacionados a determinados probióticos é atribuído à inibição de atividade mutagênica provocada pela diminuição de várias enzimas envolvidas na geração de substâncias carcinogênicas e/ou mutagênicas (REID *et al.*, 2003).

A administração oral de *Lactobacillus casei Shirota* (LcS) tem sido relacionada com o aumento da imunidade inata, estimulando a atividade de células “Natural Killer” (MATSUZAKI; CHIN, 2000).

A tabela 3 apresenta um resumo dos principais benefícios atribuídos aos microorganismos probióticos.

Muitas pesquisas no campo de probióticos ainda são necessárias para a compreensão do papel dos probióticos no trato intestinal e consequentemente na saúde humana (SAARELA *et al.*, 2000). Deve-se observar que, para comprovação dos efeitos benéficos dos probióticos, exames clínicos devem ser feitos e avaliados (STANTON *et al.*, 2003, SANDERS, 2003).

TABELA 3 - CAUSAS E MECANISMOS DOS EFEITOS BENÉFICOS ATRIBUÍDOS AOS PROBIÓTICOS

Efeito benéfico	Possíveis causas e mecanismos
Melhor digestibilidade	Degradação parcial das proteínas, lipídios e carboidratos
Melhor valor nutritivo	Níveis elevados das vitaminas do complexo B e de alguns aminoácidos essenciais como metionina, lisina e triptofano
Melhor utilização da lactose	Níveis reduzidos de lactose no produto e maior disponibilidade de lactase
Ação antagônica contra agentes patogênicos entéricos	Distúrbios tais como diarréia, colites mucosa e ulcerosa, diverticulite e colite antibiótica são controlados pela acidez. Inibidores microbianos e inibição da adesão e ativação de patógenos
Colonização do intestino	Sobrevivência ao ácido gástrico, resistência a lisozima e à tensão superficial do intestino, adesão ao epitélio intestinal, multiplicação no trato gastrintestinal, modulação imunitária
Ação anticarcinogênica	Conversão de potenciais pré-carcinogênicos em compostos menos perniciosos Estimulação do sistema imunitário
Ação hipocolesterolêmica	Produção de inibidores da síntese do colesterol Utilização do colesterol por assimilação e precipitação como sais biliares desconjugados
Modulação imunitária	Melhor produção de macrófagos, estimulação da produção de células supressoras

FONTE: Moraes; Colla, 2006

3.3 PRODUTOS LÁCTEOS PROBIÓTICOS

Os produtos lácteos são usados como veículos para as bactérias probióticas benéficas, são considerados saudáveis pelos consumidores e fazem parte da dieta alimentar cotidiana na maioria dos países (HELLER, 2001). Vários fatores podem afetar a viabilidade das bactérias probióticas nos produtos lácteos fermentados, incluindo o ácido láctico e o peróxido de hidrogênio produzido pelos fermentos tradicionais (SANDERS, 1998, MOREIRA; ABRAHAM; DE ANTONI, 2000). *Lactobacillus delbueckii* subsp. *bulgaricus* produz ácido láctico não só durante a fermentação, mas também durante a estocagem refrigerada, fenômeno conhecido na indústria como “pós-acidificação” e muitas vezes responsável pela perda de viabilidade de cepas probióticas (SHAH *et al.*, 1995).

Rybka e Fleet (1997) verificaram que iogurtes com altas populações de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tenderam a ser mais ácidos (pH < 4) e continham populações de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* menores que 10^6 UFC/g. As populações de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* excederam a 10^7 UFC/g em 54 e 68 % das amostras respectivamente, enquanto as populações de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* excederam 10^6 UFC/g apenas em 24 % e 14 % das amostras respectivamente. Dave e Shah (1997) também verificaram que a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* foi afetada pela presença do *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, enquanto bifidobactérias mostraram melhor estabilidade no iogurte durante 35 dias de armazenamento.

O aumento das concentrações de sacarose adicionadas ao leite antes da fermentação pode inibir as bactérias do iogurte levando a longos tempos de fermentação e a um baixo desenvolvimento de acidez. Isto se deve aos efeitos osmóticos dos solutos no leite e à baixa atividade de água (OLIVEIRA; DAMIN, 2003). O conteúdo de oxigênio dissolvido no produto ou permeado através da embalagem também pode interferir na viabilidade das cepas probióticas, particularmente as bifidobactérias, anaeróbias estritas (ISHIBASHI; SHIMAMURA, 1993, LANKAPUTHRA; SHAH, 1994).

Embora a interação entre microorganismos possa reduzir a viabilidade de cepas probióticas, tal combinação é necessária já que probióticos como bifidobactérias, desenvolvem-se lentamente no leite devido a sua baixa atividade proteolítica e

adicionalmente, produzem ácidos acético e láctico (nas proporções molares 3 : 2) durante a fermentação, o que pode criar importantes restrições organolépticas: um produto com sabor e aroma de vinagre que terá obviamente uma aceitação limitada por parte dos consumidores (HOIER, 1992).

Muitas publicações mostram que o uso de culturas de *Bifidobacterium* spp. combinadas com culturas de *Lactobacillus acidophilus* ou com culturas de outras bactérias lácticas, como exemplo *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (HOIER, 1992, SAMONA; ROBINSON; MARAKIS, 1996) pode trazer várias vantagens como melhores velocidades de crescimento, redução do tempo de fermentação e ausência de certos defeitos organolépticos. Levando em conta esses fatos, recomenda-se uma seleção cuidadosa das cepas a serem utilizadas. Como exemplo, Brandão *et al.* (2006) verificaram que soro de leite fermentado por *Bifidobacterium* apresentou pH 6,3 após 3 h de incubação a 42 °C, enquanto o produto fermentado com *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium* spp e *Lactobacillus acidophilus* apresentou pH 4,2. Haddadin, Awaished e Robinson (2004) produziram iogurtes com contagens acima de 10^8 UFC/mL de probióticos (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri* e *Bifidobacterium infantis*) e altas concentrações de espécies tradicionais do iogurte (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) que foram armazenados a 4°C mostrando viabilidade dos probióticos durante os 15 dias de armazenamento.

Alterações nas características físico-químicas e sensoriais nos produtos lácteos contendo bactérias probióticas podem ou não ocorrer, dependendo das espécies empregadas. A escolha da cepa é muito importante para o sucesso do iogurte ou leite fermentado probiótico (LOURENS-HATTING; VILJOEN, 2001).

Gupta, Mital e Garg (1997) verificaram que a adição de *Lactobacillus acidophilus* na produção de iogurte não alterou as características de composição, textura e atributos sensoriais comparados ao iogurte padrão. A aceitabilidade sensorial das amostras foi de 7,4 a 7,8 respectivamente numa escala hedônica de nove pontos.

Almeida, Bonassi e Roça (2001) estudaram as características físico-químicas de bebidas lácteas preparadas com três concentrações de soro de queijo Minas Frescal (30,

40 e 50 %) empregando dois tipos de culturas lácticas: uma tradicional para iogurte (YC-180) contendo cepas mistas de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e outra (ABY-1) contendo cepas mistas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobactéria e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Os autores não verificaram diferença significativa nas características físico-químicas dos dois tipos de bebidas.

Alem dos vários tipos de leite fermentado, microorganismos probióticos também têm sido empregados em diversos tipos de queijos.

Um queijo petit-suisse foi produzido com culturas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum*. As bactérias probióticas continuaram viáveis em concentrações apropriadas (superiores a 6 Log UFC/g) para todas as formulações estudadas até o 21º dia de armazenamento a 4 °C sendo que os melhores resultados foram obtidos para *B. longum* (superiores a 7 Log UFC/g). A redução do pH das diferentes formulações estudadas durante o armazenamento não influenciou a viabilidade das culturas probióticas (MARUYAMA *et al.*, 2006).

O queijo Minas Frescal é um bom veículo para as bactérias probióticas, por sua baixa acidez, alta atividade de água (aw) e qualidade nutricional. Segundo estudo de Jurkiewicz (1999), a adição de culturas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* ao queijo Minas Frescal contribuiu para o aumento da proteólise do queijo durante o armazenamento a 5 °C, formando peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos. Entretanto este fato não influenciou significativamente as características sensoriais do queijo que manteve uma concentração de *Lactobacillus acidophilus* de 10^6 UFC/g durante a estocagem do produto em refrigeração.

Okasaki *et al.* (2001) produziram um queijo Minas Frescal contendo ácido lático e cultura probiótica ABT (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* e *Streptococcus thermophilus*). Até o 21º dia de armazenamento a população de *Lactobacillus acidophilus* permaneceu entre 10^7 e 10^8 UFC/g, a população de *Bifidobacterium spp.* entre 10^6 e 10^7 UFC/g e a de *Streptococcus thermophilus* em 10^8 UFC/g.

Alegro *et al.* (2001) verificaram a influência do emprego de culturas probióticas compostas pelos microorganismos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* isolados e em co-cultura na tecnologia de fabricação de queijo Minas frescal sobre as características do produto ao longo de 21 dias de armazenamento em refrigeração de 5 °C. O queijo minas frescal probiótico mostrou-se com propriedades sensoriais, de textura e microbiológicas adequadas, sendo apropriado como veículo para *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*. Entretanto o melhor desenvolvimento das culturas probióticas ocorreu quando em co-cultura, associado ao fato desse queijo ter se comportado da forma mais estável dentre os queijos estudados ao longo do armazenamento.

Buriti, Rocha e Saad (2005) adicionaram *Lactobacillus acidophilus* em queijo Minas Frescal e avaliaram as implicações nas propriedades de textura e sensorial durante a estocagem e comprovaram que esta incorporação resulta num alimento probiótico. Em outro estudo, Buriti *et al.* (2005) demonstraram que a adição de *Lactobacillus paracasei* ao queijo minas frescal resultou num produto com grande potencial para alimento funcional.

O sorvete também tem sido avaliado como veículo para culturas probióticas. Andrighetto e Gomes (2003) desenvolveram um sorvete probiótico contendo *Lactobacillus acidophilus*. Os picolés elaborados com leite acidófilo, embalados e armazenados durante 60 dias a vinte e cinco graus Celsius negativos mantiveram uma população de *Lactobacillus acidophilus* de $8,3 \times 10^7$ UFC/g sem ter suas características sensoriais alteradas.

Andrade *et al.* (2004) também trabalharam com desenvolvimento de sorvete probiótico utilizando *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidus* e frutooligossacarídeos como prebiótico chegando a um produto com contagens de $5,6 \times 10^7$ UFC/g e $7,8 \times 10^7$ UFC/g respectivamente e boa aceitação sensorial.

Corrales, Henderson e Morales (2007) avaliaram a viabilidade dos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* em sorvete batido. O produto apresentou contagem de *Lactobacillus acidophilus* e de *Bifidobacterium lactis* acima do mínimo necessário para ser considerado probiótico até o 90º dia de armazenamento a 30 °C negativos e na avaliação sensorial não houve diferença significativa entre o produto com ou sem probióticos.

A produção de *buttermilk* contendo *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* também é viável devido à compatibilidade dessa cultura com as culturas aromáticas mesofílicas empregadas em sua produção. As contagens de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* tendem a ser mais elevadas, quando esta bactéria é adicionada conjuntamente à cultura mesófila, antes da fermentação. O número de células viáveis *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* atendeu à legislação em todas as amostras, permanecendo acima de 7,5 Log UFC/mL no produto armazenado por 28 dias à 6 °C (ANTUNES *et al.*, 2007).

Novas técnicas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de aumentar a sobrevida das cepas probióticas durante o processamento e posterior ingestão, que vão desde o encapsulamento de probióticos com substâncias prebióticas à manipulação genética (ROSS *et al.*, 2005).

Sun e Griffiths (2000) verificaram que células de *Bifidobacterium* imobilizadas em goma gelana, nome genérico do polissacarídio produzido pela fermentação controlada do microorganismo *Pseudomonas elodea*, e xantana apresentaram maior viabilidade do que as células livres em iogurte pasteurizado após armazenamento refrigerado por cinco semanas (FADINI *et al.*, 2003). Segundo O'Riordan *et al.* (2001) a imobilização de cepas de *Bifidobacterium* em amido não influenciou a sobrevivência do probiótico. No trabalho de Desmond *et al.* (2002) a goma acácia mostrou-se eficiente na imobilização e proteção ao *Lactobacillus paracasei* durante secagem e armazenamento quando comparada ao controle também seco e imobilizado, sem adição de goma acácia.

3.4 PREBIÓTICOS

Prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que afetam beneficamente o hospedeiro, por estimularem seletivamente a proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon. Adicionalmente, o prebiótico pode inibir a multiplicação de patógenos, pois fermentado no intestino converte-se em nutrientes necessários para um melhor desenvolvimento das bifidobactérias e lactobacilos, aumentando favoravelmente a microbiota bacteriana e garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro. Esses componentes atuam mais

freqüentemente no intestino grosso, embora eles possam ter também algum impacto sobre os microorganismos do intestino delgado (SAAD, 2006).

Qualquer componente alimentar fermentescível que atinja o cólon sem ser digerido apresenta potencial como prebiótico. Atualmente os prebióticos conhecidos são carboidratos não digeríveis, como a lactulose, lactitol vários oligossacarídeos (fruooligossacarídeos, glicoooligossacarídeos, transgalactooligossacarídeos), a inulina e amido resistente (GIBSON; FULLER, 2000, ANN *et al.*, 2007, PEREIRA, 2007).

Os critérios considerados na qualificação de um alimento como prebiótico são: ausência de hidrólise ou absorção no intestino delgado, capacidade de ser metabolizado seletivamente por bactérias benéficas, capacidade de alterar beneficamente a microbiota intestinal e indução de efeito fisiológico que seja importante para saúde (GIBSON; FULLER, 2000).

A fermentação dos prebióticos pode promover algumas funções fisiológicas específicas através da liberação de metabólitos das bactérias, em especial os ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato, butirato, lactato etc) no trato intestinal. Os ácidos graxos de cadeia curta podem atuar diretamente ou indiretamente sobre as células intestinais e participar no controle de processos como a inflamação, a carcinogênese, a absorção de minerais e a eliminação de compostos nitrogenados, podendo ainda atuar no alívio da constipação e na redução de infecções intestinais, redução do nível de colesterol no sangue e diminuição do risco de osteoporose, obesidade e doenças cardiovasculares (MARTI DEL MORAL; MORENO-ALIAGA; HERNANDEZ, 2003).

Alguns fatores relacionados à redução do risco de desenvolvimento de câncer devido ao consumo de prebióticos são: diminuição da retenção de substância tóxica ingerida ou produzida no trato gastrintestinal durante processos digestivos; redução do tempo do trânsito intestinal, promovendo uma rápida eliminação do bolo fecal, com redução do tempo de contato do tecido intestinal com substâncias mutagênicas ou carcinogênica; e formação de substâncias protetoras pela fermentação bacteriana dos compostos da alimentação (ANJO, 2004).

3.4.1 Frutooligossacarídeo e Inulina

Os oligossacarídeos e polissacarídeos não digeríveis, porém fermentáveis são reconhecidos como fibras alimentares. Os frutooligossacáridos (FOS) são oligosacarídeos resistentes, isto é, carboidratos complexos de configuração molecular que os torna resistentes à ação hidrolítica da enzima salivar e intestinal fazendo com que esses atinjam o cólon produzindo efeitos benéficos sobre a microbiota (MORAES; COLLA, 2006).

A oligofrutose e os FOS são termos sinônimos utilizados para denominar frutanos com grau de polimerização (número de unidades de monossacarídeos) inferior a 10. Seus nomes derivam de oligossacarídeos (carboidratos com menos de 10 subunidades de monossacarídeos) compostos predominantemente de frutose. O termo oligofrutose é mais freqüentemente empregado na literatura para descrever frutanos de cadeia curta, obtidos por hidrólise parcial da inulina da chicória. O termo FOS tende a descrever misturas de frutanos de cadeia curta, sintetizados a partir da sacarose (SAAD, 2006).

A inulina é um carboidrato, constituído de subunidades de frutose (2 a 150), ligadas entre si e a uma glicose terminal, apresentando um grau médio de polimerização de 10 ou mais, sendo a oligofrutose um componente natural da inulina (CAUSEY *et al.*, 2000, DEN HOND; GEYPENS; GHOOS, 2000, SAAD, 2006).

A inulina, extraída principalmente da raiz da chicória, é considerada fibra alimentar presente em produtos de origem vegetal. Apresenta propriedades fisiológicas similares aos FOS (HARTEMINK; VANLAERE; ROMBOUTS, 1997, NITSCHKE; UMBELINO, 2002).

Os FOS podem ser obtidos a partir da hidrólise da inulina pela enzima inulase ou sintetizado a partir da sacarose por atuação da enzima frutosiltransferase, enzima fúngica obtida por *Aspergillus niger*. Os frutooligosacarídeos estão presentes também em alimentos de origem vegetal, como cebola, alho, tomate, banana, cevada, aveia, trigo, mel e cerveja. São chamados açúcares não convencionais e têm tido impacto na indústria devido às suas excelentes características funcionais sendo também aplicados como fibras alimentares. Além de apresentarem pequenas quantidades de açúcares livres podendo ser consumidos por diabéticos (NITSCHKE; UMBELINO, 2002, ROBERFROID, 2007, PASSOS; PARK, 2003).

São várias as aplicações do FOS na indústria de alimentos, podendo ser usado sem restrições na maioria delas. Em iogurtes este polissacarídeo é utilizado como prebiótico na proporção de 2 a 3 % em volume, também utilizado como agente de corpo e textura com poder adoçante relativo, e em conjunto com edulcorantes de alta intensidade (MORENO; MONTESANTI, 2002).

Os FOS e a inulina são considerados prebióticos uma vez que promovem seletivamente o crescimento de probióticos como *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium*. Essa característica faz com que os FOS promovam benefícios à saúde humana, desde a redução de colesterol sérico até o auxílio na prevenção de alguns tipos de câncer. Doses de 4 a 5 gramas ao dia com valor calórico de 1,5 kcal/g são suficientes para estimular o crescimento de *Bifidobacterium* (BORGES, 2001) e doses de 3 a 10 gramas diárias promovem redução da pressão sanguínea, efeito benéfico no metabolismo de lipídios, melhora da saúde gastrintestinal e redução do colesterol sérico (ADA, 1999).

Rycroft *et al.* (2001), avaliando as propriedades fermentativas de alguns prebióticos, verificaram que xilooligossacarídeos e lactulose produziram os maiores aumentos no número de bifidobactérias, enquanto os frutooligossacarídeos (FOS) propiciaram o desenvolvimento de lactobacilos, e que a mistura deles pode aumentar sua funcionalidade. Rastall e Maitin (2002) também verificaram que a utilização de frutooligossacarídeos (FOS) resultou num aumento populacional de lactobacilos. Segundo Bielecka, Bierdrzycka e Majkowska (2002) a oligofrutose apresentou efeito bifidogênico na estimulação das bifidobactérias. Bortolozo e Quadros (2007) desenvolveram iogurte fermentado por *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* adicionado de 5 % de inulina e 0,05 % de sucralose caracterizando-o como prebiótico para fins especiais, sendo uma alternativa para uma alimentação mais saudável, que pode ser consumido por pessoas com dieta de restrição em gordura e açúcares.

A inulina e a oligofrutose extraídas da chicória são classificadas legalmente como ingredientes alimentícios (e não como aditivos) em todos os países da União Européia, bem como na Suíça e na Noruega. As autoridades na Austrália, Canadá, Israel, Japão e Nova Zelândia chegaram à mesma conclusão. Nos Estados Unidos, foi confirmado o estatus GRAS (Generally Recognized As Safe) para inulina e oligofrutose

(NEVEN, 2001). Devido à gama de apelos saudáveis da inulina e oligofructose, esses produtos vêm sendo aplicados como fibra alimentar também em balas e confeitos, preparações com frutas, sobremesas lácteas, queijos frescos, pães, chocolates, sorvetes, molhos, e na preparação de xaropes de fructose (KAUR; GUPTA, 2002). Também podem ser utilizados em produtos cárneos, e até em rações animais com os mesmos efeitos prebióticos observados nos seres humanos (BOND, 2003, GIBSON, 1999).

Os benefícios da ingestão de fibras estão sendo estudados e já possuem resultados interessantes, porém, excessos de fibras podem impedir a absorção de nutrientes e sais minerais. A indicação para ingestão suplementar de fibras deve ser acompanhada para não trazer um resultado indesejado (MADEIRA; MOURA, 1999).

As propriedades da inulina e oligofrutesos são similares, assim, a aplicacão de inulina ou oligofrutesos se dá em função dos atributos desejados no produto final. A inulina é mais indicada quando se pretende obter produtos com menor teor de gordura (sorvetes, bolo e sopas), enquanto oligofrutesos são adequadas para iogurtes de baixa caloria, doçura e para mascarar o sabor residual de adoçantes de alta intensidade utilizados em preparações alimentares. Recomenda-se que a inulina e oligofrutesos sejam utilizadas simultaneamente com probióticos em alimentos para obtenção do efeito simbiótico (HAULY; MOSCATTO, 2002).

Hauly, Fuchs e Prudencio-Ferreira (2005) estudaram a influência de fruooligossacarídeo (oligofructose e inulina) nas características de fermentado de soja com *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. As amostras foram armazenadas por 28 dias a 4 °C. O fermentado de soja suplementado apresentou pH de 4,63 e acidez de 0,37 %, maior viscosidade, coesividade e adesividade e menor dureza que o sem suplementação. O índice de aceitação do fermentado de soja suplementado com prebióticos foi de 71,20 %.

Fuchs *et al.* (2005) indicaram que a suplementação com oligofructose e inulina do fermentado de soja com *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, pode ser feita adicionando-se 14,24 % de oligofructose; 4,43 % de inulina e tempo de fermentação de 6 horas. O produto obtido nestas condições mostrou-se como uma boa opção para o consumo de derivados de soja e substâncias prebióticas.

3.4.2 Goma Acácia

A goma arábica, também conhecida como goma acácia, considerada fibra alimentar, consiste em uma exudação da casca da árvore acácia espinhosa que se desenvolve próximo ao deserto de Saara, na África.

Assim como outras fibras solúveis, a goma acácia não é digerida no estômago, apenas digerida no intestino onde é exposta à microbiota intestinal. Fermentada converte-se em nutrientes necessários para um melhor desenvolvimento das bifidobactérias e lactobacilos, aumentando favoravelmente a microbiota bacteriana. Um dos pontos positivos do aumento da população de bactérias é a inibição do crescimento de microorganismos patogênicos, com isso, o sistema imunológico se fortalece, prevenindo casos de infecção gastrointestinais e até mesmo de câncer de cólon. De acordo com o Kravtchenko, Michel e Cherbut (1997), a ingestão de goma acácia pode também contribuir na redução da taxa de colesterol.

Wyatt, Bayliss, Holcroft (1986) observaram um aumento da proporção de microbiota benéfica após a ingestão de 10 g/dia de goma acácia na dieta de voluntários. Mais recentemente, Cherbut *et al.* (2003), apontaram um aumento significativo no número de bifidobactérias e de bactéria lácticas nos seres humanos que consumiram de 10 a 15 gramas diárias de goma acácia durante dez dias. Esse efeito mostrou-se muito significativo já que a população inicial de bifidobactérias era muito baixa. Outro estudo com seres humanos mostrou que a dose de 6 g/dia de goma acácia consumidos durante quatro semanas apresentou maior benefício no crescimento de *Bifidobacterium* do que o estudo realizado com os FOS, porém de acordo com os mesmos autores se administradas em conjunto, essas duas fibras apresentam um efeito de sinergia sobre o crescimento de bifidobactérias (ROCHAT *et al.*, 2001).

A modificação da microbiota intestinal devido à ingestão de goma acácia pode ser explicada pelo fato que nem todas as bactérias possuem as enzimas para degradar as moléculas das fibras e pela redução do pH no intestino que favorece o crescimento de bactérias acidófilas e lácticas (SALYERS; PALMER; WILKINS, 1978, MAY *et al.*, 1994, MICHEL *et al.*, 1998, TULUNG; REMESY; DEMIGNE, 1987). Em todos os estudos fica claro que para se obter os efeitos bifidogênicos da ingestão de goma acácia, há a necessidade da administração contínua e de alguns dias de adaptação do organismo

à substância (TULUNG; REMESY; DEMIGNE, 1987, WYATT; BAYLISS; HOLCROFT, 1986).

3.5 SIMBIÓTICOS

Simbióticos são alimentos ou suplementos alimentares contendo microorganismos probióticos e ingredientes prebióticos, resultando em produtos com as características funcionais dos dois grupos que em sinergia vão beneficiar o hospedeiro (GIBSON, 1999, FULLER; GIBSON, 1997, SAAD, 2006).

O alimento simbiótico age através das duas estratégias para aumentar a população de microorganismos benéficos no trato intestinal: a primeira é pelo consumo de bactérias próbióticas; a segunda é aumentando o número de microorganismos benéficos já residentes no trato intestinal através do consumo de prebióticos, que vão estimular as bactérias endógenas específicas do hospedeiro no seu sítio de colonização (COLLINS; GIBSON, 1999, SCHREZENMEIR; VRESE, 2001, TUOHY *et al.*, 2003).

Vários estudos têm sido realizados, com o objetivo de comprovar o efeito de simbióticos em humanos e animais, mas ainda necessitam de maior comprovação científica (BORGES; SALGARELLO; GURIAN, 2003).

Maiorka *et al.* (2001) investigaram o efeito da substituição de antibióticos por prebiótico, probiótico e simbiótico em dietas de fortificação para frangos de corte. Os resultados desse experimento permitiram concluir que a substituição de antibióticos por simbióticos na ração de frangos é a melhor alternativa, pois não compromete o desempenho do organismo das aves.

Em estudos com leitões, resultados demonstraram que a adição de probiótico (*Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*) e prebiótico frutooligossacarídeo (FOS) à ração resultou em desempenho dos leitões semelhantes àqueles que receberam a dieta basal com antibiótico prevenindo um aumento na colonização por bactérias nocivas do sétimo para o décimo quarto dia após desmame (BUDINO, 2004).

Na medida em que estudos sobre prebióticos e probióticos são apresentados e comprovados, a tendência do mercado é absorver mais rapidamente essas inovações (TUOHY *et al.*, 2003).

Ozer, Akin e Ozer (2005) verificaram que a adição de inulina e lactulose num iogurte suplementado com *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus acidophilus* não afeta o crescimento das cepas características do iogurte, mas estimula o crescimento de *Bifidobacterium bifidum* no produto.

Bortolozo e Quadros (2007) desenvolveram iogurte fermentado por *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* adicionado de 5 % de inulina e 0,05 % de sucralose caracterizando-o como prebiótico para fins especiais, sendo uma alternativa para uma alimentação mais saudável, que pode ser consumido por pessoas com dieta de restrição em gordura e açúcares.

Quintana e Ramon (2007) produziram leite de cabra fermentado por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* adicionado de 4,5 % de inulina com boa aceitação sensorial em teste de aceitação com escala hedônica de nove pontos.

Thamer e Penna (2005) estudaram o efeito do teor de soro, sacarose e oligofrutoses sobre a população de bactérias lácticas em formulações de bebidas fermentadas. As bebidas lácteas formuladas foram consideradas probióticas pelas contagens elevadas de *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus acidophilus* variando de $9,00 \times 10^6$ a $9,65 \times 10^{12}$ UFC/g e $1,15 \times 10^8$ a $2,55 \times 10^{12}$ UFC/g respectivamente. As maiores populações de microorganismos probióticos foram observadas nos tratamentos com menor teor de acidez e elevado teor de sólidos. Houve predominância de *Streptococcus thermophilus* sobre os demais microorganismos. Não foi possível observar o estímulo do crescimento das bifidobactérias pelo aumento da concentração de FOS e o produto se manteve com contagens de probióticos acima do limite desejado. O efeito prebiótico da oligofrutose pode ter sido prejudicado pelo tratamento térmico de 85°C por 20 min usado na elaboração de bebidas lácteas.

Thamer e Penna (2006) caracterizaram bebidas lácteas a base de soro de leite, fermentadas pelos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium spp.* acrescidas de prebióticos frutooligossacarídeos quanto a sua composição centesimal. Com a variação do teor de soro, de açúcar e de frutooligossacarídeos concluiu-se que houve influência na variação do tempo de fermentação, o valor de pH 4,8 foi um parâmetro adequado para finalizar a fermentação das bebidas e quanto maior o teor do soro de leite, menor a acidez e o teor de proteínas do produto final.

Aragon-Alegro *et al* (2007) desenvolveram mousse de chocolate simbiótico com microorganismos probióticos (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*) e ingrediente prebiótico (inulina). Os produtos foram monitorados durante estocagem de 28 dias a 5 °C. O mousse de chocolate mostrou-se um ótimo veículo para o probiótico *Lactobacillus paracasei* e a inulina não interferiu na viabilidade do microorganismo que manteve um nível de 10^7 UFC/g até o 28º dia de armazenamento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O desenvolvimento experimental deste trabalho foi constituído de duas etapas. Na primeira, foi avaliada a influência da temperatura de fermentação no crescimento microbiano e na produção de ácido láctico por bactérias probióticas durante a fermentação de leite pasteurizado. Na segunda etapa, foi avaliada a influência de goma acácia e inulina na viabilidade de bactérias probióticas, no pH, na acidez e na textura do leite fermentado durante sua vida de prateleira. Uma avaliação sensorial do produto final também foi realizada.

O trabalho foi realizado nas instalações de pesquisa do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos da Escola de Engenharia Mauá, sendo que alguns testes foram realizados nos laboratórios da Faculdade de Tecnologia Termomecanica.

4.2 PREBIÓTICOS

Utilizaram-se como ingredientes prebióticos:

4.2.1 Inulina

A inulina enriquecida (OraftiTM Synergy1, Bélgica), composto de cerca de 50 % de inulina (grau de polimerização de 10 a 60) e 50 % de oligofrutose (grau de polimerização de 2 a 7), obtido através da hidrólise parcial da inulina da chicória.

4.2.2 Goma acácia

A goma acácia (Fibregum B IRX 61380, Colloides Naturels International, França) consiste em um polímero contendo os seguintes açúcares (% molar): galactose (38), arabinose (46), raminose (4), ácido glucurônico (6,5) e ácido metil glucurônico (5,5). Seu peso molecular é 882 kDa, possui baixa viscosidade, ausência de odor e sabor e estabilidade a baixo pH.

4.3 CULTURA LÁCTICA

Foi utilizada a cultura liofilizada (BioRich; Chr. Hansen, Dinamarca) composta de *Streptococcus thermophilus* (10^{11} UFC/g), *Lactobacillus acidophilus* La5 (10^9 UFC/g) e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 (10^9 UFC/g). Cada envelope do produto contendo um grama foi armazenado sob refrigeração.

4.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Na primeira etapa do trabalho, três temperaturas de fermentação foram avaliadas: 37 °C, 39 °C e 41 °C. Os ensaios foram realizados em quadruplicata.

Durante a fermentação, foram determinados o pH e a acidez titulável em intervalos de 30 minutos. A concentração de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* utilizada no inóculo foi determinada 24 horas após o término do processo de produção. Os resultados foram avaliados através de análise de variância.

Na segunda etapa do trabalho, foram realizados 11 ensaios, de acordo com um Planejamento Composto Central, para dois fatores com três pontos centrais (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995). As variáveis independentes, goma acácia (X_1) e inulina (X_2) foram estudadas em 5 níveis ($-\alpha$, -1 , 0 , 1 , α). O valor codificado de α foi calculado de acordo com a equação 1.

$$\alpha = (2^n)^{1/4} = (2^2)^{1/4} = 1,41 \quad (1)$$

Onde n é o número de variáveis independentes.

Os níveis codificados e reais das variáveis independentes estão apresentados na tabela 4. As combinações dos 11 ensaios estão apresentadas na tabela 5. Os resultados do planejamento foram avaliados através do software Minitab™ versão 15 (Minitab INC State College, EUA).

TABELA 4 - NÍVEIS E VALORES DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL

Variáveis independentes	Codificadas	Níveis				
		- 1,41	- 1	0	+ 1	+ 1,41
Concentração de goma acácia (%)	x_1	0	0,44	1,50	2,56	3,00
Concentração de inulina (%)	x_2	0	0,44	1,50	2,56	3,00

TABELA 5 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL

Ensaios	Concentração de goma acácia		Concentração de inulina	
	Codificadas	Não-Codificadas (%)	Codificadas	Não-Codificadas (%)
1	-1	0,44	-1	0,44
2	+1	2,56	-1	0,44
3	-1	0,44	+1	2,56
4	+1	2,56	+1	2,56
5	-1,41	0,00	0	1,50
6	+1,41	3,00	0	1,50
7	0	1,50	-1,41	0,00
8	0	1,50	+1,41	3,00
9	0	1,50	0	1,50
10	0	1,50	0	1,50
11	0	1,50	0	1,50

Para cada combinação das variáveis foi produzido um lote de leite fermentado. Em intervalos de 21 dias, foram realizadas análises de concentração de microorganismos, de textura, de pH e da acidez do produto ao longo de 64 dias de armazenamento a 10 °C.

A temperatura de armazenamento de 10 °C foi estabelecida para atender ao limite máximo definido no Padrão de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados (RESOLUÇÃO nº 5, Ministério da Agricultura, de 13 de novembro de 2000, Publicada no DOU de 27/11/00, Seção I, pp. 9 a 12).

4.5 PROCESSO DE PRODUÇÃO DO LEITE FERMENTADO

Conforme representado no fluxograma da figura 1, em cada ensaio, o leite fermentado foi produzido a partir de um litro de leite pasteurizado tipo A (Fazenda Bela Vista) acrescentando-se 30 g de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) e inulina na quantidade definida para cada ensaio. Após a adição de inulina, o leite foi aquecido até 90 °C e mantido nesta temperatura por 10 minutos. Em seguida, a mistura foi resfriada em banho de gelo até atingir 50 °C, depois, à solução resfriada, adicionou-se goma acácia previamente diluída em 100 mL de água fervente. Ao ser atingida a temperatura de fermentação estabelecida para cada ensaio, um grama de cultura probiótica foi adicionado, e a mistura, distribuída em copos plásticos de 200 mL, colocando-se 50 mL de produto em cada um deles. Os copos foram selados com tampa metálica, incubados na temperatura de fermentação por 3 horas e, após este período, armazenados à temperatura de 10 °C.

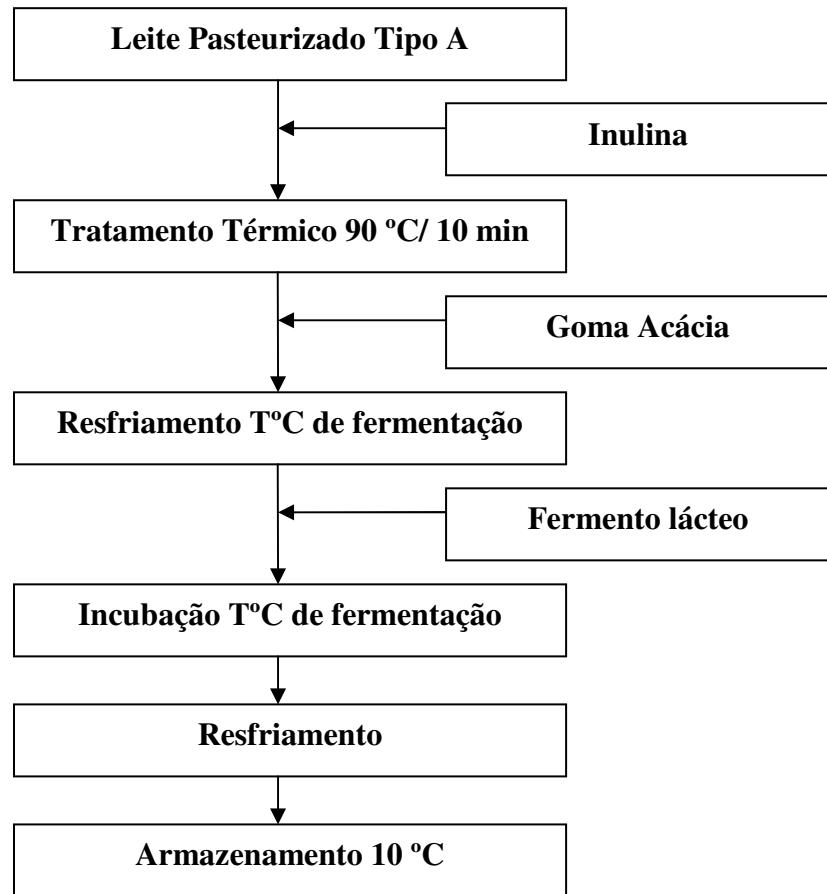


FIGURA 1 - DIAGRAMA DE BLOCOS CONTENDO AS PRINCIPAIS ETAPAS DE PRODUÇÃO DO LEITE FERMENTADO

4.6 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As variáveis dependentes (respostas) pH e acidez titulável foram escolhidas por serem importantes parâmetros de qualidade do iogurte.

4.6.1 Determinação de pH e acidez

Para o acompanhamento do pH e da acidez titulável durante a fermentação, o leite inoculado foi distribuído em tubos de ensaio de 50 mL, sendo colocado 30 mL em cada um deles; esses tubos foram incubados na temperatura de fermentação. A cada 30 minutos uma amostra foi retirada para acompanhamento de pH e acidez titulável. Para acompanhamento do pH e acidez titulável durante o período de armazenamento do leite fermentado, foi utilizada uma amostra correspondente a um copo selado contendo 50 mL do produto refrigerado.

O pH foi determinado em potenciômetro (MICRONAL B474), conforme metodologia descrita na Association of Official Analytical Chemists (A. O. A. C., 1998) e a acidez expressa em porcentagem (%) de ácido láctico, determinada segundo metodologia do Instituto Adolfo Lutz (1985).

4.7 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Para a enumeração de cepas probióticas, vários meios de culturas foram avaliados. Em ensaios preliminares foram testados os meios MRS (Oxoid), M17 (Oxoid), Reinforced Clostridial Agar (Oxoid) e Raka Ray Agar (Oxoid), em diferentes temperaturas e tempos de incubação, condições de oxigênio e formas de inoculação. A partir desses ensaios preliminares foram definidos os meios de cultura e as condições para crescimento dos microorganismos utilizados como inóculo do leite fermentado.

4.7.1 Meios de Cultura

4.7.1.1 M17 Ágar (Oxoid)

O meio de cultura M17 Ágar foi utilizado para enumeração de *Streptococcus thermophilus*. Para cada litro de meio esterilizado foram adicionados 52,5 mL de solução de lactose 10 % esterilizada por filtração em membrana 0,45 mm.

4.7.1.2 MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) Ágar (Oxoid)

O meio de cultura MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) Ágar foi utilizado para enumeração de *Lactobacillus acidophilus*.

4.7.1.3 MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) Ágar (Oxoid) com adição de soluções A, B e C

O meio de cultura MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) Ágar com adição de soluções A, B e C foi utilizado para enumeração de *Bifidobacterium animalis*. Para cada litro de meio de cultura esterilizado foram adicionados 5 mL de solução A, 10 mL de solução B e 5 mL de solução C. A solução A consiste em solução do antibiótico Dicloxacilina (American Generics – Laboratório Syntofarma), 100 mg/L, esterilizada por filtração em membrana 0,45 mm; a solução B, em solução de cloreto de lítio (Laboratório Synth), 2 g para cada 18 mL de água destilada, esterilizada por filtração em membrana 0,45 mm; e a solução C – solução de L-cisteína (Casa Americana), 100 g/L, esterilizada por filtração em membrana 0,45 mm (CHR. HANSEN, 1999).

4.7.2 Procedimento

Foram realizadas diluições decimais seriadas do leite fermentado em água peptonada 0,1 % até a diluição de 10^{-7} .

a) Para a contagem de *Streptococcus thermophilus*, alíquotas de 1 mL das diluições 10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} foram transferidas para placas de Petri descartáveis. Sobre cada amostra foi adicionado o meio de cultura Agar M17, contendo solução de lactose a 10%. As placas, em duplicata, foram incubadas em aerobiose a 37 °C durante 48 horas. As colônias com diâmetro de cerca de 1 mm com coloração branca, forma circular e borda lisa foram enumeradas como *Streptococcus thermophilus* (Figura 2).

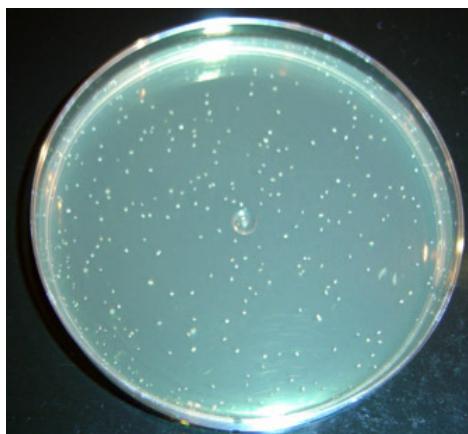


FIGURA 2 - MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS DE *Streptococcus thermophilus* CULTIVADAS EM MEIO M17 ADICIONADO DE SOLUÇÃO DE LACTOSE 10 % APÓS 48 horas DE INCUBAÇÃO A 37 °C

b) Para a contagem de *Lactobacillus acidophilus*, alíquotas de 0,1 mL das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura MRS, espalhadas com auxílio da alça de Drigalski. As placas, em duplicata, foram incubadas a 43°C durante 72 horas em jarras de anaerobiose, contendo gerador de anaerobiose Anaerogen (OXOID). As colônias de *Lactobacillus acidophilus* (Figura 3) apresentavam diâmetro de cerca de 3 mm, coloração branca, leitosa, achatadas e com borda irregular (JURKIEWICZ, 1999).



FIGURA 3 – MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS DE *Lactobacillus acidophilus* CULTIVADAS EM MEIO MRS APÓS 72 horas DE INCUBAÇÃO A 43 °C

c) Para a contagem de *Bifidobacterium animalis*, alíquotas de 1 mL das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram transferidas para placas de Petri. Sobre cada amostra foi adicionado o meio de cultura MRS contendo as soluções A, B e C. As placas, em duplicata, foram incubadas a 37 °C durante 72 horas em jarras de anaerobiose contendo gerador de anaerobiose Anaerogen (OXOID). As colônias de *Bifidobacterium animalis* (Figura 4) apresentavam diâmetro entre 2 e 3 mm, coloração branca, leitosa e forma de lentilha.

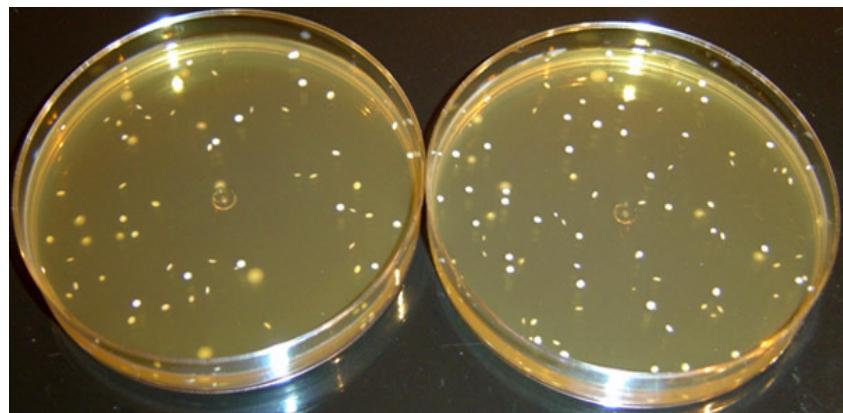


FIGURA 4 - MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS DE *Bifidobacterium animalis* CULTIVADAS EM MEIO MRS ADICIONADO DE SOLUÇÕES A, B E C APÓS 72 horas DE INCUBAÇÃO A 37 °C

A tabela 6 apresenta um resumo das condições utilizadas para enumeração dos microorganismos. A confirmação das colônias típicas foi realizada por exame microscópico de morfologia.

TABELA 6 - CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA ENUMERAÇÃO DOS MICROORGANISMOS NO LEITE FERMENTADO

Bactéria	Meio de cultura	Temperatura de incubação (°C)	Disponibilidade de oxigênio	Técnica de inoculação	Tempo de incubação (h)
<i>Streptococcus thermophilus</i>	M17 lactose	37	Aerobiose	Pour plate	48
<i>Lactobacillus acidophilus La5</i>	MRS	43	Anaerobiose	Superfície	72
<i>Bifidobacterium animalis Bb12</i>	MRS A+B+C*	37	Anaerobiose	Pour plate	72

* Soluções especificadas no item 4.7.1.3

4.8 ANÁLISE DE TEXTURA

Para análise de textura, durante o período de armazenamento do leite fermentado, foi utilizada uma amostra correspondente a um copo selado (65 mm de altura e 75 mm de diâmetro), contendo 50 mL do produto refrigerado a 10 °C. Nos dias 1, 22, 43 e 64, de armazenamento, as amostras, em duplicata, foram submetidas à análise de textura em texturômetro TA-TX2i (*Stable Micro Systems, Haslemer, Reino Unido*), utilizando-se probe cilíndrico de acrílico de diâmetro de 35 mm, força de gatilho de 0,10 N, velocidade de penetração do probe de 1 mm/s, distância de penetração de (40 mm). As amostras foram retiradas do refrigerador momentos antes do teste. Os dados foram coletados através do programa *Texture Expert for Windows* – versão 1.20 (Stable Micro Systems).

Os resultados foram avaliados utilizando-se planilha eletrônica Excel® (Microsoft, 1997) em termos de força máxima (F_{max}) da amostra obtida quando 5 % da deformação máxima foi aplicada. A constante de elasticidade (E) foi calculada a partir da aplicação da lei de Hooke na parte linear da curva força versus deformação (equação 2):

$$F = E \cdot \Delta L \quad (2)$$

Sendo: F , a força aplicada, e ΔL , o deslocamento ocorrido pela aplicação desta força.

4.9 ANÁLISE SENSORIAL

Para o procedimento de análise sensorial foi utilizado o teste de preferência com escala Hedônica de 9 pontos (DUTCOSKY, 1996). Os resultados foram avaliados através de Análise de Variância (ANOVA) e teste de média de Tukey, comparando-se o padrão com todas as outras amostras. O leite fermentado foi produzido e armazenado a 10 °C por 24 horas e submetido à avaliação sensorial. Trabalhou-se com quatro amostras de leite fermentado probiótico: uma amostra padrão P, sem adição de prebiótico; uma amostra A, com adição de 3 % de goma acácia; uma amostra B, com adição de 3 % de inulina e uma amostra C com 1,5 % de goma acácia mais 1,5 % de inulina. Sessenta provadores realizaram o teste, sendo que cada um recebeu um grupo de prova com as 4 amostras codificadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira etapa do trabalho, foi avaliada a influência da temperatura no crescimento microbiano, no pH e na produção de ácido lático por bactérias probióticas durante a fermentação de leite pasteurizado. Na segunda etapa, avaliou-se a influência de goma acácia e inulina na viabilidade de bactérias probióticas, no pH, na acidez e na textura do leite fermentado durante 64 dias de armazenamento a 10 °C.

5.1 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO

Os valores de pH e acidez titulável obtidos durante os processos fermentativos, realizados a 37, 39 e 41 °C estão apresentados nas tabelas 7 e 8, e figuras 5 e 6 respectivamente.

TABELA 7 - VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO (DP) DE pH DO LEITE DURANTE A FERMENTAÇÃO EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Tempo (h)	37 °C		39 °C		41 °C	
	pH ¹	DP	pH ¹	DP	pH ¹	DP
0,5	6,1 ^a	0,2	6,11 ^a	0,08	6,19 ^a	0,06
1,0	5,8 ^a	0,2	5,68 ^a	0,09	5,84 ^a	0,07
1,5	5,5 ^a	0,2	5,21 ^b	0,07	5,28 ^b	0,09
2,0	5,1 ^a	0,1	5,01 ^a	0,08	5,07 ^a	0,03
2,5	4,98 ^a	0,09	4,84 ^b	0,06	4,86 ^b	0,03

¹Média de 4 repetições autênticas.

Médias de pH seguidas de letras iguais, na mesma linha, não diferem significativamente ($p > 0,05$).

TABELA 8 - VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO (DP) DE % DE ÁCIDO LÁTICO NO LEITE DURANTE A FERMENTAÇÃO EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Tempo (h)	37 °C		39 °C		41 °C	
	% ac. lático ¹	DP	% ac. lático ¹	DP	% ac. lático ¹	DP
0,5	0,27 ^a	0,01	0,33 ^b	0,02	0,30 ^b	0,01
1,0	0,38 ^a	0,03	0,45 ^b	0,01	0,41 ^b	0,01
1,5	0,51 ^a	0,06	0,59 ^b	0,03	0,59 ^b	0,03
2,0	0,61 ^a	0,05	0,67 ^a	0,02	0,66 ^a	0,03
2,5	0,63 ^a	0,03	0,71 ^b	0,01	0,70 ^b	0,04

¹Média de 4 repetições autênticas.

Médias de % de ácido lático seguidas de letras iguais, na mesma linha, não diferem significativamente ($p > 0,05$).

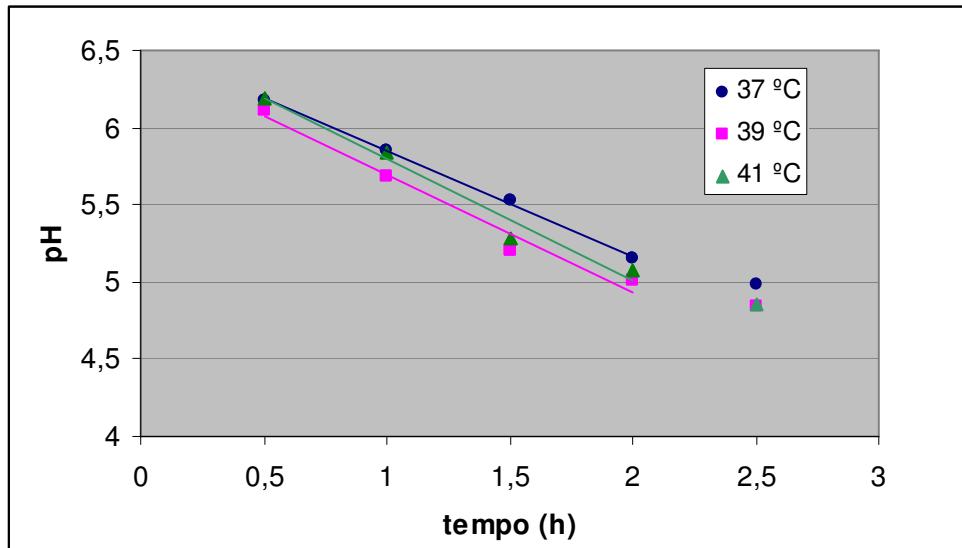


FIGURA 5 – pH EM FUNÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO EM DIFERENTES TEMPERATURAS

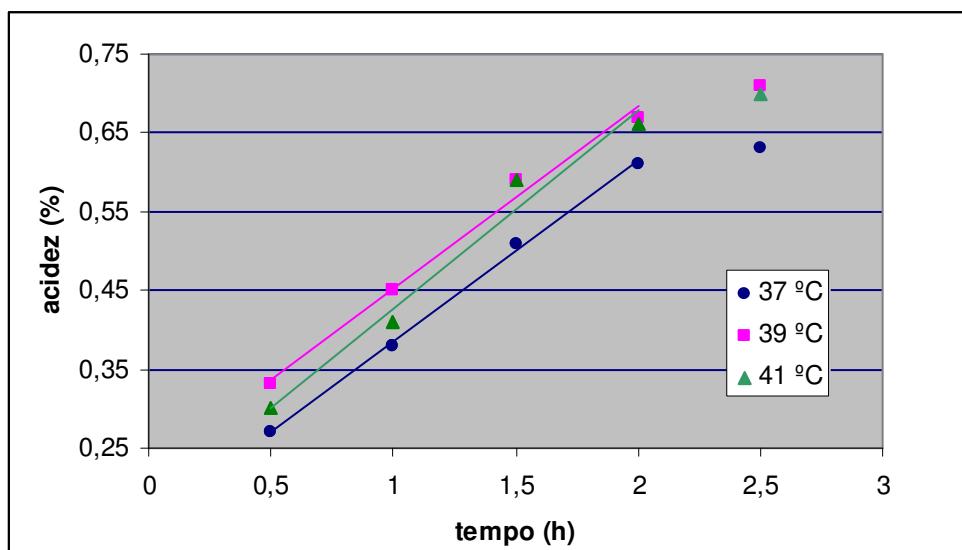


FIGURA 6 – PORCENTAGEM DE ÁCIDO LÁTICO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Verifica-se nas tabelas 7 e 8 que os menores valores de pH e maiores porcentagens de ácido lático, são obtidos para temperaturas de fermentação de 39 e 41°C. A 37 °C a acidificação do meio foi menor ($p < 0,05$), o que provavelmente é decorrente de se trabalhar mais distante da temperatura ótima de crescimento de *Streptococcus thermophilus*, que ocorre entre 40 e 43 °C. Quando *Streptococcus thermophilus* é empregado na fermentação de leite, na presença ou não de bactérias

probióticas, é comum a fermentação ser realizada a 42 ± 1 °C. Por outro lado, a temperatura de 37 °C é normalmente empregada quando *Lactobacillus acidophilus* ou *Bifidobacterium* são utilizados isoladamente na fermentação de leite (GUPTA; MITAL; GARG, 1997; ZACARCHENCO; MASSAGUER-ROIG, 2004).

As figuras 5 e 6 representam as curvas de variação de pH e acidez durante todo processo de fermentação. Verifica-se também que no intervalo de 0,5 a 2,0 h de fermentação, a variação de pH e acidez segue um modelo linear. Os coeficientes dos modelos estão apresentados nas tabelas 9 e 10.

Os valores dos coeficientes angulares apresentados na tabela 9, representam a variação média de pH por hora de fermentação, no período de 0,5 a 2 h. Observa-se que a maior variação de pH ocorre a 41 °C, correspondendo a 0,784 unidades de pH por hora. A 37 °C a variação é de 0,682 unidades de pH por hora de fermentação.

TABELA 9 - COEFICIENTES DO MODELO LINEAR DE pH EM FUNÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO

Temperatura de fermentação	Coeficiente linear	Coeficiente angular	R^2
37 °C	6,53	- 0,682	0,998
39 °C	6,45	- 0,754	0,975
41 °C	6,58	-0,784	0,974

TABELA 10 - COEFICIENTES DO MODELO LINEAR DE ACIDEZ (%) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO

Temperatura de fermentação	Coeficiente linear	Coeficiente angular	R^2
37 °C	0,155	0,230	0,998
39 °C	0,220	0,232	0,989
41 °C	0,175	0,252	0,975

Os valores dos coeficientes angulares apresentados na tabela 10, representam a velocidade de produção de ácido lático por hora de fermentação, no período considerado. A maior velocidade de produção, 0,252 g de ácido lático por 100 mL de leite fermentado por hora, também ocorre a 41 °C.

Embora a produção de ácido lático tenha sido menor a 37 °C, o tempo necessário para coagulação do leite (tempo final de fermentação) foi de 2,5 h para as três

temperaturas avaliadas. Neste ponto o leite fermentado a 37 °C atinge pH 5,0 e acidez de 0,63 %. Já o pH e a acidez dos leites fermentados a 39 e 41 °C não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), atingindo aproximadamente 4,8 e 0,70 % respectivamente.

De acordo com Antunes, Motta e Antunes (2003) durante a produção de iogurte, o pH 4,6 é geralmente fixado para o término da fermentação. Este valor é considerado o ideal para promover a coagulação das proteínas do leite e, consequente, formação de gel. A diferença de pH observada em relação ao presente trabalho pode ser justificada pela fixação do tempo máximo de fermentação e pela ausência da cepa de *Lactobacillus bulgaricus*, pois a simbiose desta com o *Streptococcus thermophilus* permite uma acidificação maior do meio no mesmo intervalo de tempo. Durante a fermentação, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* produz proteases que quebram a estrutura da caseína liberando aminoácidos e peptídeos, estimulando o crescimento de *Streptococcus thermophilus* que produz ácido fórmico, reduzindo a quantidade de oxigênio disponível no meio e estimulando o crescimento do *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (TAMIME; ROBINSON, 1999). É possível a fermentação apenas com *Lactobacillus bulgaricus*, esse produto apresenta normalmente pH entre 3,6 a 4,3 e acidez entre 0,6 a 1,5 g de ácido láctico em 100 g de produto (PEREIRA; ALMEIDA; SAUER, 2007).

O pH pode influenciar de forma significativa a atividade metabólica das bactérias, podendo favorecer um determinado grupo em detrimento de outro. No caso da fermentação do iogurte, bactérias do gênero *Lactobacillus* crescem e toleram valores de pH mais baixos do que as pertencentes ao gênero *Streptococcus* (VEDAMUTHU, 1991). Por outro lado, bactérias do gênero *Bifidobacterium* não apresentam boa sobrevivência em ambientes com baixo pH (ZACARCHENCO; MASSAGUER-ROIG, 2006).

A tabela 11 apresenta as concentrações de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* e *Streptococcus thermophilus* determinadas após 24 h do término da fermentação nos produtos armazenados a 10 °C. Os resultados mostraram que a temperatura de fermentação não influenciou a concentração final dos microorganismos avaliados ($p > 0,05$). Os produtos fermentados apresentaram uma concentração de *Streptococcus thermophilus* de cerca de 9 Log UFC/g e de 7 Log UFC/g de *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*.

TABELA 11 - VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO (DP) DA CONCENTRAÇÃO DE MICROORGANISMOS NO LEITE FERMENTADO DETERMINADOS 24 h APÓS SUA PRODUÇÃO

Temperatura (°C)	<i>L. acidophilus</i> (Log UFC/mL)		<i>B. animalis</i> (Log UFC/mL)		<i>S. thermophilus</i> (Log UFC/mL)	
	Média ¹	DP	Média ¹	DP	Média ¹	DP
37	7,3 ^a	0,1	7,3 ^a	0,2	9,41 ^a	0,04
39	7,2 ^a	0,1	6,9 ^a	0,6	9,30 ^a	0,06
41	7,2 ^a	0,2	7,0 ^a	0,2	9,33 ^a	0,08

¹Média de 4 repetições autênticas.

Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem significativamente ($p > 0,05$).

Considerando que o leite fermentado a 37 °C apresentou uma acidez cerca de 10 % menor que o leite fermentado nas demais temperaturas e uma concentração equivalente de bactérias probióticas, a temperatura de 37 °C foi adotada para as fermentações realizadas na segunda etapa deste trabalho.

5.2 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE INULINA E GOMA ACÁCIA

5.2.1 Variação do pH e acidez titulável durante a fermentação

Os valores de pH e acidez titulável obtidos em intervalos de 30 minutos, para os 11 ensaios realizados de acordo com o planejamento composto central, estão apresentados nas tabelas 12 e 13 respectivamente.

Para avaliar a influência da goma acácia e inulina no pH ao longo da fermentação, foram calculadas, para cada ensaio, as diferenças entre o valor de pH no tempo 0,5 h e o valor de pH em determinado tempo (Tabela 14). Dessa forma as variações que ocorrem inicialmente devido à matéria prima são eliminadas.

Da mesma forma, para determinar a influência dos fatores na acidez titulável ao longo da fermentação, foram calculadas, para cada ensaio, as diferenças entre o valor de acidez em determinado tempo e o valor de acidez no tempo 0,5 h (Tabela 15).

TABELA 12 - VALORES DE pH DO LEITE DURANTE A FERMENTAÇÃO

Ensaio	Goma acácia		Inulina		pH do meio				
	(g/L) (x ₁)	(g/L) (x ₂)	0,5 h	1,0 h	1,5 h	2,0 h	2,5 h	3,0 h	
1	4,4	4,4	6,20	5,76	5,19	4,99	4,73	4,69	
2	25,6	4,4	6,16	5,74	5,47	5,18	4,94	4,80	
3	4,4	25,6	6,30	5,94	5,56	5,23	4,96	4,81	
4	25,6	25,6	5,90	5,59	5,27	4,97	4,84	4,72	
5	0	15,0	6,08	5,78	5,47	5,03	4,86	4,73	
6	30,0	15,0	6,24	6,06	5,64	5,48	5,19	4,88	
7	15,0	0	6,12	5,66	5,21	5,01	4,79	4,70	
8	15,0	30,0	6,28	6,01	5,62	5,38	5,08	4,85	
9	15,0	15,0	6,18	5,60	5,26	5,18	4,78	4,65	
10	15,0	15,0	6,22	5,65	5,25	5,15	4,80	4,77	
11	15,0	15,0	6,25	5,66	5,28	5,11	4,90	4,75	

TABELA 13 - VALORES DE % DE ÁCIDO LÁTICO DURANTE A FERMENTAÇÃO

Ensaios	Goma Acácia		Inulina		% Ácido láctico					
	(g/L)	(x ₁)	(g/L)	(x ₂)	0,5h	1,0h	1,5h	2,0h	2,5h	3,0h
1	4,4	4,4	4,4	4,4	0,20	0,28	0,42	0,53	0,61	0,62
2	25,6	25,6	25,6	25,6	0,18	0,25	0,33	0,44	0,54	0,58
3	4,4	4,4	25,6	25,6	0,16	0,24	0,32	0,41	0,53	0,60
4	25,6	25,6	25,6	25,6	0,22	0,28	0,39	0,47	0,56	0,61
5	0	0	15,0	15,0	0,22	0,28	0,35	0,45	0,59	0,62
6	30,0	30,0	15,0	15,0	0,17	0,19	0,27	0,33	0,41	0,53
7	15,0	15,0	0	0	0,24	0,29	0,44	0,52	0,60	0,61
8	15,0	15,0	30,0	30,0	0,17	0,21	0,28	0,33	0,47	0,54
9	15,0	15,0	15,0	15,0	0,24	0,33	0,40	0,52	0,59	0,60
10	15,0	15,0	15,0	15,0	0,22	0,27	0,35	0,50	0,55	0,55
11	15,0	15,0	15,0	15,0	0,16	0,24	0,28	0,42	0,51	0,50

TABELA 14 - VARIAÇÃO DE pH DO LEITE DURANTE A FERMENTAÇÃO

Ensaios	Goma Acácia		Inulina		Variação de pH				
	(g/L)	(x ₁)	(g/L)	(x ₂)	1,0 h	1,5 h	2,0 h	2,5 h	3,0 h
1	4,4	4,4	4,4	4,4	0,44	1,01	1,21	1,47	1,51
2	25,6	25,6	4,4	4,4	0,42	0,69	0,98	1,22	1,36
3	4,4	4,4	25,6	25,6	0,36	0,74	1,07	1,34	1,49
4	25,6	25,6	25,6	25,6	0,31	0,63	0,93	1,06	1,18
5	0	0	15,0	15,0	0,30	0,61	1,05	1,22	1,35
6	30,0	30,0	15,0	15,0	0,18	0,60	0,76	1,05	1,36
7	15,0	15,0	0	0	0,46	0,91	1,11	1,33	1,42
8	15,0	15,0	30,0	30,0	0,27	0,66	0,90	1,20	1,43
9	15,0	15,0	15,0	15,0	0,58	0,92	1,00	1,40	1,53
10	15,0	15,0	15,0	15,0	0,57	0,97	1,07	1,42	1,45
11	15,0	15,0	15,0	15,0	0,59	0,97	1,14	1,35	1,50

TABELA 15 - VARIAÇÃO DE ACIDEZ DO LEITE DURANTE A FERMENTAÇÃO

Ensaios	Goma Acácia		Inulina		Variação de acidez (%)				
	(g/L)	(x ₁)	(g/L)	(x ₂)	1,0 h	1,5 h	2,0 h	2,5 h	3,0 h
1	4,4	4,4	4,4	4,4	0,08	0,22	0,33	0,41	0,42
2	25,6	25,6	4,4	4,4	0,07	0,15	0,26	0,36	0,40
3	4,4	4,4	25,6	25,6	0,08	0,16	0,25	0,37	0,44
4	25,6	25,6	25,6	25,6	0,06	0,17	0,25	0,34	0,39
5	0	0	15,0	15,0	0,06	0,13	0,23	0,37	0,40
6	30,0	30,0	15,0	15,0	0,02	0,1	0,16	0,24	0,36
7	15,0	15,0	0	0	0,05	0,2	0,28	0,36	0,37
8	15,0	15,0	30,0	30,0	0,04	0,11	0,16	0,30	0,37
9	15,0	15,0	15,0	15,0	0,09	0,16	0,28	0,35	0,36
10	15,0	15,0	15,0	15,0	0,05	0,13	0,28	0,33	0,33
11	15,0	15,0	15,0	15,0	0,08	0,12	0,26	0,35	0,34

Os dados de variação de pH (Tabela 14) e variação de acidez (Tabela 15) foram analisados de acordo com o Planejamento Composto Central, utilizando o programa MinitabTM, versão 15. Os coeficientes dos modelos quadráticos para variação de pH e acidez estão apresentados nas tabelas 16 e 17 respectivamente.

Para os tempos de fermentação 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 h foram possíveis os ajustes de modelos quadráticos da variação de pH em função da concentração de goma acácia (X_1) e inulina (X_2). Para 3 h de fermentação não foi possível o ajuste do modelo, já que todos os coeficientes são estatisticamente não significativos ($p > 0,05$).

Na tabela 17, verifica-se que para todos os tempos de fermentação, os coeficientes dos modelos de variação de acidez são estatisticamente não significativos ($p > 0,05$), indicado que a goma acácia e a inulina não influenciaram a produção de ácido lático durante a fermentação.

A significância dos modelos ajustados de variação de pH foi determinada através de análise de variância (Tabelas 18 a 21).

TABELA 16 - COEFICIENTES DO MODELO DE VARIAÇÃO DE pH EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS AVALIADAS E VALOR *p* PARA OS DIFERENTES TEMPOS DE FERMENTAÇÃO

Termo	1,0 h		1,5 h		2,0 h		2,5 h		3,0 h	
	Coef	p-valor	Coef.	p-valor	Coef.	p-valor	Coef.	p-valor	Coef.	p-valor
Constante	0,580	0,000	0,953	0,000	1,061	0,000	1,348	0,000	1,493	0,000
x_1	-0,030	0,144	-0,055	0,119	-0,097	0,004	-0,096	0,007	-0,056	0,127
x_2	-0,057	0,018	-0,085	0,031	-0,061	0,036	-0,059	0,053	-0,023	0,480
x_1^2	-0,150	0,000	-0,156	0,005	-0,056	0,072	-0,096	0,013	-0,070	0,110
x_2^2	-0,088	0,006	-0,066	0,120	nc	nc	nc	nc	-0,035	0,374
$x_1 \cdot x_2$	nc	Nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	-0,040	0,396

nc – termo não considerado no ajuste do modelo

TABELA 17 - COEFICIENTES DO MODELO DE VARIAÇÃO DA % DE ÁCIDO LÁTICO EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS AVALIADAS E VALOR *p* PARA OS DIFERENTES TEMPOS DE FERMENTAÇÃO

Termo	1,0h		1,5h		2,0h		2,5h		3,0h	
	Coef	p-valor	Coef.	p-valor	Coef.	p-valor	Coef.	p-valor	Coef.	p-valor
Constante	0,060	0,001	0,160	0,002	0,247	0,001	0,327	0,000	0,373	0,000
x_1	-0,011	0,285	-0,013	0,493	-0,021	0,395	-0,033	0,162	-0,016	0,264
x_2	-0,003	0,756	-0,021	0,281	-0,032	0,212	-0,018	0,410	0,001	0,925
x_1^2	-0,003	0,810	-0,013	0,571	-0,009	0,737	0,002	0,928	0,013	0,434
x_2^2	-0,000	1,000	0,008	0,731	0,003	0,918	0,014	0,564	0,008	0,628
$x_1 \cdot x_2$	-0,003	0,855	0,020	0,451	0,018	0,609	0,005	0,867	-0,008	0,690

TABELA 18 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O MODELO DA VARIAÇÃO DE pH EM 1 h DE FERMENTAÇÃO

Fonte	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	p-valor
Regressão	0,1721	4	0,0430	0,002
Resíduo	0,0152	6	0,0025	
Falta de ajuste	0,0150	4	0,0038	0,026
Erro puro	0,0002	2	0,0001	
Total	0,1874	10		

$R^2 = 91,9\%$

TABELA 19 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O MODELO DA VARIAÇÃO DE pH EM 1,5 h DE FERMENTAÇÃO

Fonte	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	p-valor
Regressão	0,2230	4	0,0558	0,016
Resíduo	0,0450	6	0,0075	
Falta de ajuste	0,0433	4	0,0108	0,073
Erro puro	0,0017	2	0,0008	
Total	0,2680	10		

$R^2 = 83,3\%$

TABELA 20 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O MODELO DA VARIAÇÃO DE pH EM 2,0 h DE FERMENTAÇÃO

Fonte	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	p-valor
Regressão	0,1255	3	0,0418	0,007
Resíduo	0,0311	7	0,0044	
Falta de ajuste	0,0213	5	0,0042	0,612
Erro puro	0,0098	2	0,0049	
Total	0,1566	10		

$R^2 = 80,2\%$

TABELA 21 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O MODELO DA VARIAÇÃO DE pH EM 2,5 h DE FERMENTAÇÃO

Fonte	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	p-valor
Regressão	0,1596	3	0,0532	0,006
Resíduo	0,0363	7	0,0052	
Falta de ajuste	0,0337	5	0,0068	0,169
Erro puro	0,0026	2	0,0013	
Total	0,1959	10		

$R^2 = 81,5\%$

Verifica-se nas tabelas 19 a 21 que os modelos de variação de pH (ΔpH) em função da concentração de goma acácia e inulina, para 1,5; 2,0 e 2,5 h de fermentação apresentam um bom ajuste, já que $p < 0,05$ para a regressão, $p > 0,05$ para falta de ajuste e o menor valor para o coeficiente de determinação (R^2) é de 80,2 % (porcentagem de variação explicada pelo modelo). O modelo obtido em 1 h de fermentação apresenta falta de ajuste significativa ($p < 0,05$), o que pode ser explicado pela pequena variação dos resultados obtidos no ponto central, entretanto este modelo apresenta o melhor coeficiente de determinação ($R^2 = 91,9\%$). Assim a variação de pH em determinado tempo (horas) de fermentação (ΔpH_t), em função da concentração codificada de goma acácia (X_1) e inulina (X_2), pode ser descrita pelas equações 3, 4, 5 e 6.

$$\Delta\text{pH}_1 = 0,580 - 0,030X_1 - 0,057X_2 - 0,150X_1^2 - 0,088X_2^2 \quad (3)$$

$$\Delta\text{pH}_{1,5} = 0,953 - 0,056X_1 - 0,085X_2 - 0,156X_1^2 - 0,066X_2^2 \quad (4)$$

$$\Delta\text{pH}_2 = 1,061 - 0,098X_1 - 0,061X_2 - 0,057X_1^2 \quad (5)$$

$$\Delta\text{pH}_{2,5} = 1,348 - 0,096X_1 - 0,059X_2 - 0,096X_1^2 \quad (6)$$

Como os modelos para 1,0 e 1,5 h de fermentação apresentam grande semelhança, apenas a superfície de resposta para 1 h será apresentada (Figura 7). Da mesma forma, como as equações 3 e 4 são semelhantes, apenas a superfície de resposta para o modelo com 2,0 h será apresentada (Figura 9)

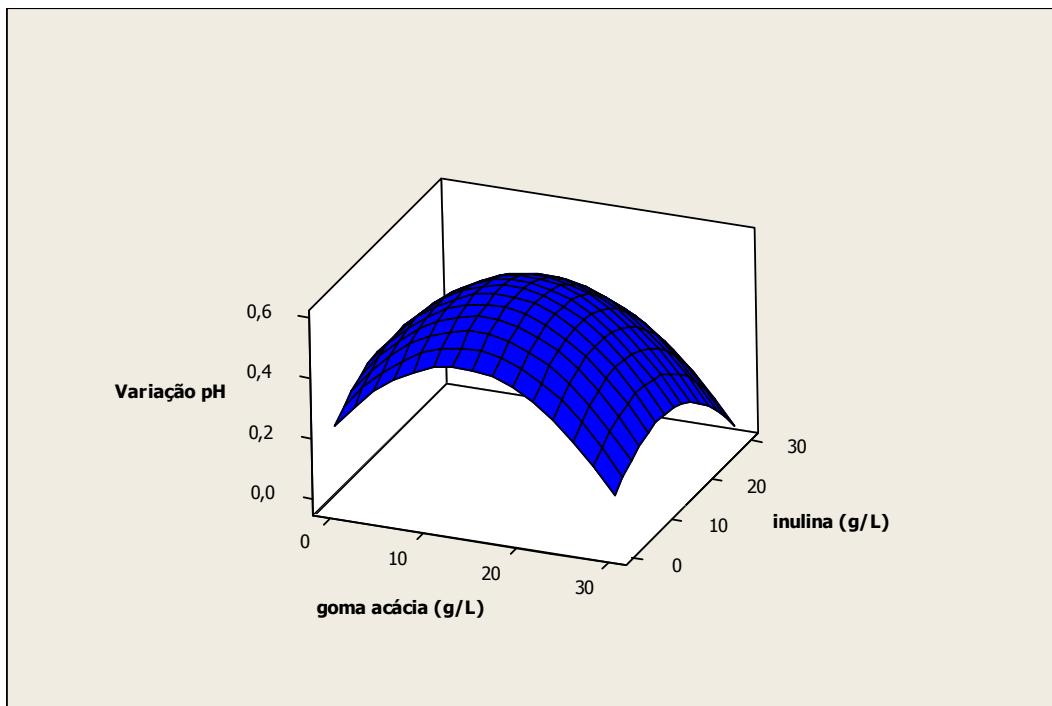


FIGURA 7 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DE VARIAÇÃO DO pH EM 1,0 h DE FERMENTAÇÃO

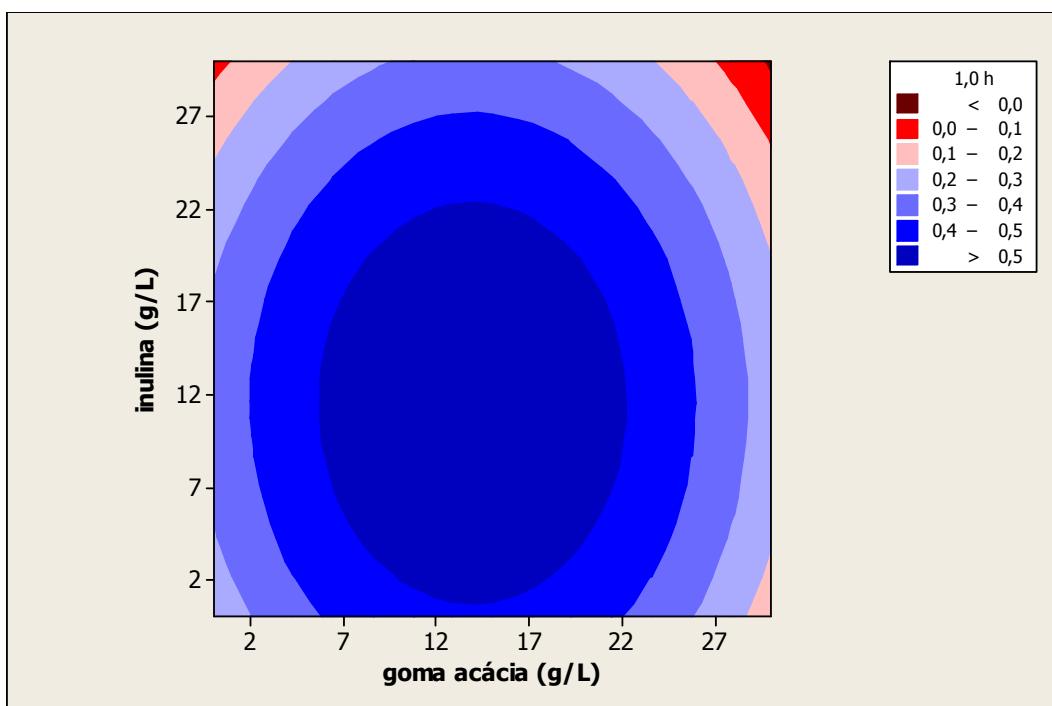


FIGURA 8 - CURVAS DE CONTORNO PARA A EQUAÇÃO 3

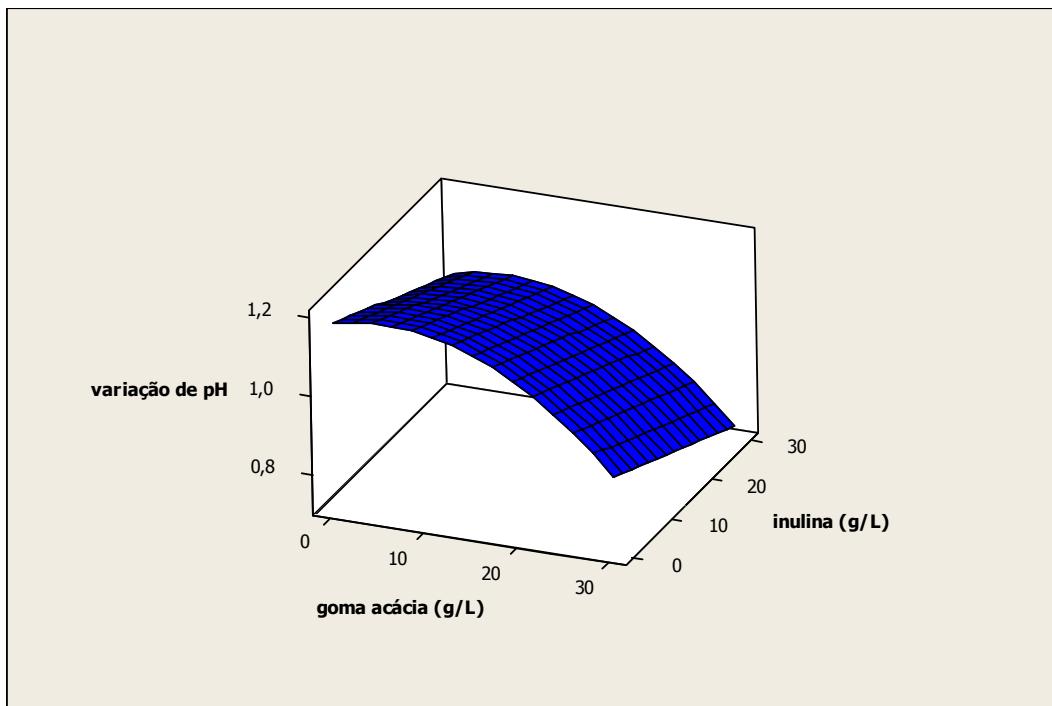


FIGURA 9 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DE VARIAÇÃO DO pH EM 2,0 h DE FERMENTAÇÃO

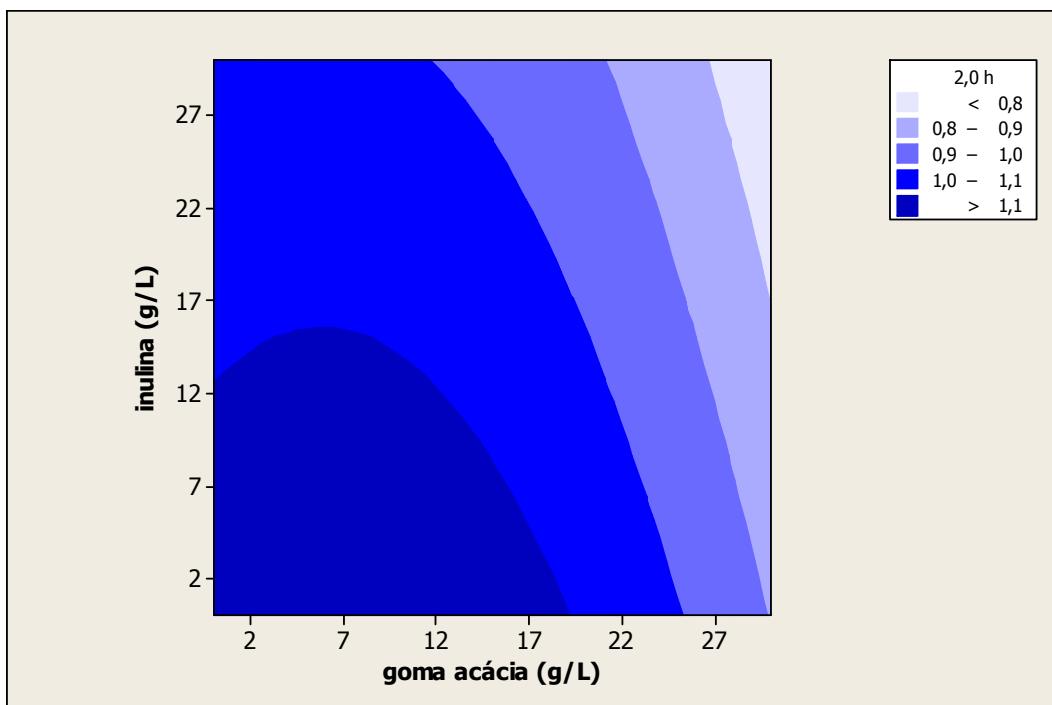


FIGURA 10 - CURVAS DE CONTORNO PARA A EQUAÇÃO 5

Analizando a superfície de resposta e curvas de contorno para 1 h de fermentação (Figuras 7 e 8), verifica-se maior influência da goma acácia em relação a inulina na variação de pH. Para uma ampla faixa de concentração de inulina (de 0 a 27 g/L) e goma acácia (de 2 a 26 g/L) ocorre uma variação de pH acima de 0,4 unidades. A superfície de resposta e as curvas de contorno para 2,0 h de fermentação (Figuras 9 e 10) mostram também que a goma acácia apresentou maior influência na variação de pH que a inulina. Embora as diferenças observadas entre os ensaios sejam pequenas, as menores variações de pH (< 0,9 unidades) ocorreram para concentrações de goma acácia acima de 25 g/L. Esse resultado pode ser decorrente da estrutura química da goma acácia, que é constituída por uma fração de cadeias de polissacarídeo e uma fração de alto peso molecular contendo proteínas (glicoproteínas e arabinogalactana-proteína), o que poderia ocasionar um efeito tampão (WHISTLER; BEMILLER, 1997). A influencia da goma acácia foi verificada somente até 2,5 h, em 3 h de fermentação a goma acácia não apresentou mais efeito significativo (Tabela 17) sobre a variação de pH, possivelmente devido à maior produção de ácido e quebra do tampão. Esses resultados sugerem que uma concentração de goma acácia acima de 30 g/L poderia reduzir a variação do pH durante a fermentação e dessa forma favorecer a sobrevivência das bactérias probióticas. Conforme verificado no item 5.2.3, as concentrações de goma acácia avaliadas neste trabalho não influenciaram o crescimento e a sobrevivência das bactérias probióticas.

A influência da inulina no pH e acidez do meio também foi avaliada por Özer, Akin e Özer (2005). Os autores verificaram que a presença de 1 % de inulina em iogurte AB não influenciou significativamente o pH e a produção de ácido láctico do produto, embora o prebiótico tenha contribuído com o aumento da sobrevivência de *Bifidobacterium*. Resultados semelhantes foram obtidos por Shin *et al.* (2000) quando cultivaram duas linhagens de *Bifidobacterium* em leite desnatado contendo 5 % de inulina. Por outro lado, Fuchs *et al.* (2005) verificaram que inulina e oligofrutose influenciam o pH final de bebida de soja fermentada por *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, enquanto o primeiro promove uma redução, a oligofrutose promove o aumento.

O teor de sólidos totais também pode influenciar o pH e acidez titulável durante a fermentação (THAMER; PENNA, 2006; OLIVEIRA; DAMIN 2003), entretanto a natureza do sólido adicionado irá determinar a característica desta influência. No

presente estudo, verifica-se na figura 10 que os leites fermentados elaborados com menor concentração de inulina e goma acácia, portanto, menor teor de sólidos totais, apresentaram maior variação de pH.

Os leites fermentados produzidos com diferentes concentrações de goma acácia e inulina apresentaram ao final de 3,0 h de fermentação, em média, pH $4,76 \pm 0,07$ e acidez de $0,58 \pm 0,04$ % (Figura 11). Tais características são fundamentalmente decorrentes dos microorganismos utilizados como inóculo. Em iogurtes produzidos com *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, com ou sem a presença de bactérias probióticas é comum o pH atingir valores abaixo de 4,5 e a acidez acima de 1,1% (ÖZER; AKIN; ÖZER, 2005).

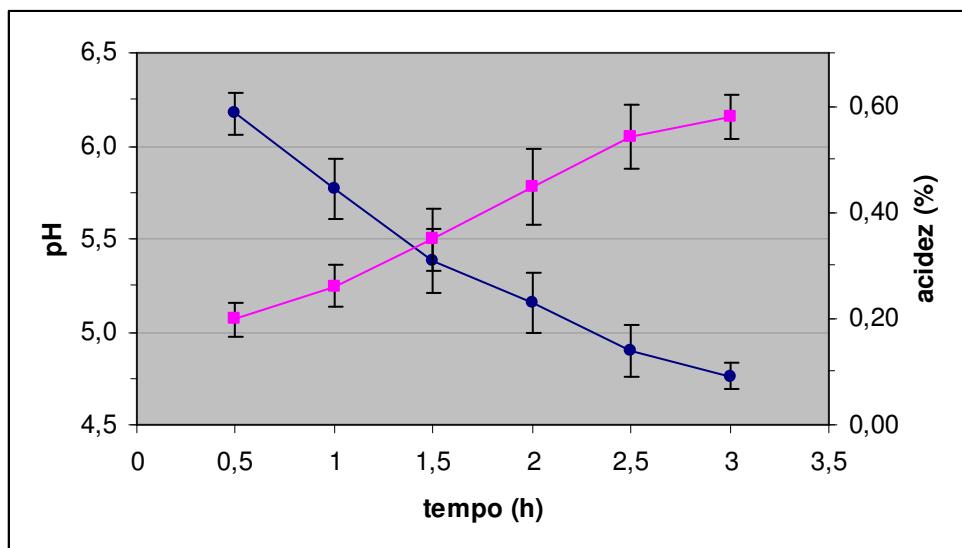


FIGURA 11 – CURVA DA MÉDIA DE pH E % DE ÁCIDO LÁTICO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO (● pH E ■ % DE ÁCIDO LÁTICO)

5.2.2 Variação do pH e acidez titulável durante o armazenamento

O leite fermentado simbiótico foi armazenado por 64 dias a 10 °C e a cada 21 dias foram retiradas amostras para acompanhamento do pH e acidez titulável. As tabelas 22 e 23 apresentam os resultados para os 11 ensaios realizados de acordo com o Planejamento Composto Central.

A análise dos coeficientes dos modelos para as duas respostas de interesse (Tabelas 24 e 25) mostra que a presença de goma acácia e a inulina não influenciou o pH e a acidez dos produtos ($p > 0,05$) durante os 64 dias de armazenamento a 10 °C.

TABELA 22 – VALORES DE pH DO LEITE FERMENTADO DURANTE O ARMAZENAMENTO A 10 °C

Ensaios	Goma Acácia		Inulina		pH	
	(g/L)		(g/L)			
	(x_1)	(x_2)	1° Dia	22° Dia	43° Dia	64° Dia
1	4,4	4,4	4,46	4,17	4,19	4,24
2	25,6	4,4	4,53	4,20	4,28	4,24
3	4,4	25,6	4,42	4,22	4,25	4,20
4	25,6	25,6	4,55	4,16	4,19	4,20
5	0	15,0	4,55	4,23	4,20	4,17
6	30,0	15,0	4,78	4,38	4,40	4,36
7	15,0	0	4,50	4,20	4,19	4,21
8	15,0	30,0	4,60	4,30	4,25	4,24
9	15,0	15,0	4,58	4,22	4,18	4,18
10	15,0	15,0	4,43	4,14	4,22	4,19
11	15,0	15,0	4,50	4,24	4,22	4,24

TABELA 23 – VALORES DE % ÁCIDO LÁTICO NO LEITE FERMENTADO DURANTE O ARMAZENAMENTO A 10 °C

Ensaios	Goma Acácia		Inulina		Acidez	
	(g/L)		(g/L)		(% ác. lático)	
	(x_1)	(x_2)	1° Dia	22° Dia	43° Dia	64° Dia
1	4,4	4,4	0,61	0,64	0,76	0,81
2	25,6	4,4	0,60	0,63	0,76	0,87
3	4,4	25,6	0,61	0,62	0,64	0,81
4	25,6	25,6	0,62	0,65	0,87	0,88
5	0	15,0	0,62	0,63	0,86	0,87
6	30,0	15,0	0,61	0,68	0,89	0,86
7	15,0	0	0,59	0,62	0,76	0,85
8	15,0	30,0	0,57	0,67	0,86	0,87
9	15,0	15,0	0,61	0,62	0,78	0,90
10	15,0	15,0	0,55	0,60	0,85	0,87
11	15,0	15,0	0,63	0,66	0,69	0,83

TABELA 24 - COEFICIENTES DO MODELO DE pH EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS AVALIADAS DURANTE O ARMAZENAMENTO A 10 °C

Termos	1° dia		22° dia		43° dia		64° dia	
	Coef	P	Coef	P	Coef	P	Coef	P
Constante	4,503	0,000	4,200	0,000	4,207	0,000	4,203	0,000
x_1	0,065	0,105	0,023	0,453	0,0391	0,081	0,034	0,135
x_2	0,015	0,667	0,019	0,529	0,007	0,717	-0,005	0,813
x_1^2	0,051	0,250	0,030	0,409	0,038	0,130	0,025	0,323
x_2^2	-0,006	0,884	0,003	0,943	-0,001	0,948	0,005	0,846
$x_1 * x_2$	0,015	0,762	-0,023	0,594	-0,038	0,199	-0,000	1,000

TABELA 25 - COEFICIENTES DO MODELO DE ACIDEZ (% ÁCIDO LÁTICO) EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS AVALIADAS DURANTE O ARMAZENAMENTO A 10 °C

Termos	1° dia		22° dia		43° dia		64° dia	
	Coef	P	Coef	P	Coef	P	Coef	P
Constante	0,597	0,000	0,627	0,000	0,773	0,000	0,867	0,000
x_1	-0,002	0,868	0,011	0,265	0,034	0,299	0,014	0,287
x_2	-0,001	0,922	0,009	0,373	0,016	0,600	0,005	0,710
x_1^2	0,012	0,354	0,010	0,377	0,030	0,436	-0,006	0,703
x_2^2	-0,005	0,683	0,005	0,636	-0,003	0,937	-0,008	0,589
$x_1 * x_2$	0,005	0,741	0,010	0,469	0,058	0,225	0,003	0,890

As médias de pH e acidez de todos os ensaios para os diferentes dias de armazenamento estão apresentadas na figura 12. Verifica-se que à medida que o tempo de armazenamento do produto avança, a acidez se eleva e o pH diminui, indicando que as bactérias láticas continuaram a produzir ácido mesmo na temperatura de 10 °C. Este fenômeno é conhecido como pós-acidificação, ou seja, a acidez produzida após o período de incubação, durante o resfriamento, estocagem e distribuição até o consumo (TAMIME; ROBINSON, 1991). Essa acidez varia durante o armazenamento em maior ou menor grau, dependendo da acidez inicial do produto, da temperatura de armazenamento e do poder acidificante da cultura (SALINAS, 1986).

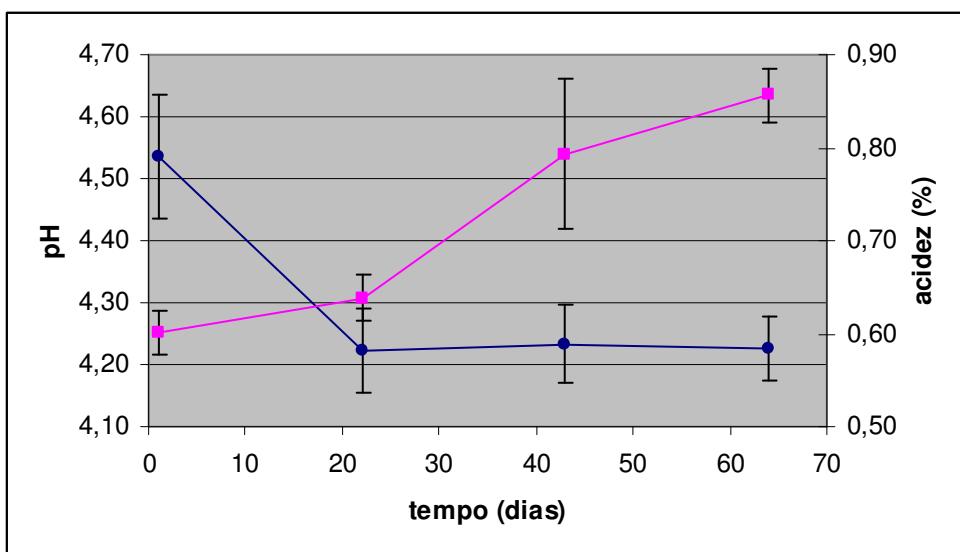


FIGURA 12 – VALORES MÉDIOS DE pH E % DE ÁCIDO LÁTICO DOS LEITES FERMENTADOS DURANTE O ARMAZENAMENTO A 10 °C (• pH E ■ % DE ÁCIDO LÁTICO)

Durante os 64 dias de armazenamento o pH do leite fermentado variou em média de $4,5 \pm 0,1$ para $4,22 \pm 0,05$ e a acidez de $0,60 \pm 0,02$ % para $0,86 \pm 0,03$ % (Figura 12). Vinderola *et al.* (2000) também verificaram uma pequena variação do pH (de 4,8 a 4,5) e acidez (de 0,65 a 0,80 %) durante 49 dias de estocagem a 4 °C de leite fermentado por *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *B. bifidum*. Esta variação pode ser considerada pequena quando comparada com produtos produzidos com culturas tradicionais de iogurte (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*). Os produtos obtidos com culturas probióticas, em geral apresentam uma acidificação menor, pois tais culturas caracterizam-se pela baixa capacidade de acidificação durante a estocagem, podendo dessa forma, melhorar o sabor do produto final (GOMES; MALCATA, 1999).

Damin *et al.* (2006), avaliaram a pós-acidificação de iogurtes comerciais produzidos com *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* durante 9 dias de armazenamento a 5 °C, obtendo neste período uma variação de pH de 4,10 a 3,37. Rodas *et al.* (2001), ao avaliarem 136 amostras de iogurtes comerciais, determinaram um pH médio de $4,0 \pm 0,1$. No presente estudo os produtos apresentaram ao final de 64 dias de armazenamento, em média, pH $4,22 \pm 0,05$, e variação de 0,3 unidades ao longo de todo armazenamento.

Zacarchenco e Massaguer-Roig (2004) verificaram que o leite fermentado apenas com *Streptococcus thermophilus* apresentou pH 4,4 após um dia de estocagem e

4,2 após 21 dias a 4 °C, valores semelhantes aos obtidos no presente estudo. Os autores verificaram ainda, que os leites fermentados apenas com *Lactobacillus acidophilus* ou *Bifidobacterium longum* apresentaram pH mais elevado (4,7 e 5,0 respectivamente) ao final de 21 dias de estocagem.

5.2.3 Análises microbiológicas

As concentrações de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis*, no leite fermentado armazenado a 10 °C durante 64 dias estão apresentadas nas tabelas 26, 27 e 28, respectivamente.

TABELA 26 - CONCENTRAÇÃO DE *Streptococcus thermophilus* NO LEITE FERMENTADO DURANTE O ARMAZENAMENTO A 10 °C

Ensaio	Goma Acácia	Inulina	Concentração			
	(g/L) (x ₁)	(g/L) (x ₂)	1° Dia	22° Dia	43° Dia	64° Dia
1	4,4	4,4	9,28	8,57	7,95	7,45
2	25,6	4,4	9,20	8,77	7,50	7,46
3	4,4	25,6	9,14	9,19	8,38	7,79
4	25,6	25,6	9,11	8,95	7,54	7,55
5	0	15,0	9,29	9,10	8,02	7,76
6	30,0	15,0	9,15	9,17	8,12	7,79
7	15,0	0	9,20	9,01	7,82	7,91
8	15,0	30,0	9,50	9,10	8,43	8,19
9	15,0	15,0	9,29	9,04	7,46	7,39
10	15,0	15,0	9,17	9,07	8,71	8,55
11	15,0	15,0	9,23	9,29	8,09	7,47

TABELA 27 - CONCENTRAÇÃO DE *Lactobacillus acidophilus* NO LEITE FERMENTADO DURANTE O ARMAZENAMENTO A 10 °C

Ensaio	Goma Acácia	Inulina	Concentração			
	(g/L) (x ₁)	(g/L) (x ₂)	1° Dia	22° Dia	43° Dia	64° Dia
1	4,4	4,4	7,47	7,16	6,84	6,64
2	25,6	4,4	7,29	7,24	6,95	6,52
3	4,4	25,6	7,44	7,27	6,91	6,85
4	25,6	25,6	7,27	7,22	6,71	6,64
5	0	15,0	7,38	7,50	6,89	6,34
6	30,0	15,0	7,23	7,04	6,80	6,77
7	15,0	0	7,07	7,36	6,80	6,57
8	15,0	30,0	7,55	7,10	7,03	6,80
9	15,0	15,0	7,17	7,25	6,93	6,46
10	15,0	15,0	7,30	7,00	6,90	6,75
11	15,0	15,0	7,24	7,13	6,70	6,60

TABELA 28 - CONCENTRAÇÃO DE *Bifidobacterium animalis* NO LEITE FERMENTADO DURANTE O ARMAZENAMENTO A 10 °C

Ensaio	Goma Acácia	Inulina	Concentração			
	(g/L)	(g/L)	(Log UFC/g)			
	(x ₁)	(x ₂)	1° Dia	22° Dia	43° Dia	64° Dia
1	4,4	4,4	7,03	6,52	6,62	5,80
2	25,6	4,4	6,77	6,21	6,65	5,59
3	4,4	25,6	6,91	6,93	6,59	6,52
4	25,6	25,6	6,83	6,83	6,55	6,58
5	0	15,0	7,08	7,10	6,90	6,61
6	30,0	15,0	6,46	6,89	6,61	6,71
7	15,0	0	6,71	6,99	6,77	5,63
8	15,0	30,0	6,67	6,57	6,64	6,50
9	15,0	15,0	7,01	6,80	6,40	nd
10	15,0	15,0	6,75	6,92	6,68	6,51
11	15,0	15,0	6,96	7,03	6,50	6,20

nd.- valor não disponível

As tabelas 29, 30 e 31, apresentam os coeficientes do modelo e *p*-valor obtidos na análise do Planejamento Composto Central.

TABELA 29 - COEFICIENTES DO MODELO DA CONCENTRAÇÃO DE *Streptococcus thermophilus* EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS AVALIADAS PARA OS DIFERENTES DIAS DE ARMAZENAMENTO A 10 °C

Termos	1° dia		22° dia		43° dia		64° dia	
	Coef	p-valor	Coef	p-valor	Coef	p-valor	Coef	p-valor
Constante	9,230	0,000	9,133	0,000	8,086	0,000	7,803	0,000
X ₁	-0,038	0,436	0,115	0,920	-0,143	0,443	-0,023	0,893
X ₂	0,024	0,616	0,007	0,160	0,166	0,378	0,103	0,560
X ₁ ²	-0,030	0,596	-0,055	0,537	-0,072	0,739	-0,101	0,628
X ₂ ²	0,034	0,553	-0,095	0,306	-0,044	0,836	0,035	0,863
X ₁ * X ₂	0,012	0,854	-0,110	0,319	-0,097	0,705	-0,062	0,800

TABELA 30 - COEFICIENTES DO MODELO DA CONCENTRAÇÃO DE *Lactobacillus acidophilus* EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS AVALIADAS PARA OS DIFERENTES DIAS DE ARMAZENAMENTO A 10 °C

Termos	1° dia		22° dia		43° dia		64° dia	
	Coef	p-valor	Coef	p-valor	Coef	p-valor	Coef	p-valor
Constante	7,236	0,000	7,126	0,000	6,843	0,000	6,603	0,000
X ₁	-0,070	0,187	-0,077	0,211	-0,027	0,526	0,034	0,601
X ₂	0,078	0,148	-0,034	0,549	0,019	0,647	0,081	0,246
X ₁ ²	0,049	0,410	0,064	0,360	-0,006	0,904	-0,013	0,862
X ₂ ²	0,051	0,388	0,044	0,517	0,028	0,568	0,051	0,519
X ₁ * X ₂	0,002	0,971	-0,032	0,688	-0,077	0,228	-0,022	0,809

TABELA 31 - COEFICIENTES DO MODELO DA CONCENTRAÇÃO DE *Bifidobacterium animalis* EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS AVALIADAS PARA OS DIFERENTES DIAS DE ARMAZENAMENTO A 10 °C

Termos	1° dia		22° dia		43° dia		64° dia	
	Coef	p-valor	Coef	p-valor	Coef	p-valor	Coef	p-valor
Constante	6,901	0,000	6,916	0,000	6,526	0,000	6,355	0,000
X ₁	-0,152	0,040	-0,088	0,464	-0,052	0,326	-0,001	0,990
X ₂	-0,014	0,803	0,054	0,646	-0,039	0,453	0,368	0,010
X ₁ ²	-0,029	0,672	-0,134	0,846	0,082	0,211	0,0925	0,429
X ₂ ²	-0,069	0,338	-0,027	0,357	0,057	0,364	-0,205	0,123
X ₁ * X ₂	0,045	0,590	0,052	0,753	-0,017	0,808	0,068	0,581

Verifica-se nas tabelas 29 e 30, que para todos os tempos de armazenamento os coeficientes dos modelos não são significativos $p > 0,1$, indicando que a adição de goma acácia e inulina não influenciaram significativamente a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus thermophilus*, no leite fermentado durante os 64 dias de armazenamento a 10 °C.

Vários autores também verificaram que prebióticos, como a inulina e FOS, não influenciam a sobrevivência de *Lactobacillus* e *Streptococcus thermophilus* no alimento. No trabalho de Fuchs *et al.* (2006), a adição de 1 % de inulina e 5 % de oligofrutose em iogurte não influenciou a sobrevivência de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* durante 28 dias de armazenamento a 4 °C. Aragon-Alegro *et al.* (2007) e Buriti, Komatsu e Saad (2007) verificaram que a inulina não influenciou a sobrevivência de *Lactobacillus paracasei*

em mousse de chocolate e de *Lactobacillus acidophilus* em mousse de maracujá, respectivamente. Akalin, Fernderya e Akbulut (2004), verificaram que a concentração de *Streptococcus thermophilus* em iogurte contendo 2 % de FOS não apresentou diferença significativa em relação ao produto sem o prebiótico.

Para *Bifidobacterium*, a análise do Planejamento Composto Central, mostra que o termo linear da inulina (X_2), em 64 dias de armazenamento, é significativo ($p = 0,010$), indicando a influência deste fator na sobrevivência do microorganismo no leite fermentado (Tabela 31). A análise de variância do modelo, considerando $\alpha = 0,1$, mostra que a regressão é significativa ($p = 0,056$) e a falta de ajuste é não significativa ($p = 0,595$) (Tabela 32).

TABELA 32 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O MODELO DA CONCENTRAÇÃO DE *Bifidobacterium animalis* EM 64 DIAS DE ARMAZENAMENTO

Fonte	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	p-valor
Regressão	1,473	5	0,295	0,056
Resíduo	0,203	4	0,051	
Falta de ajuste	0,155	3	0,052	0,595
Erro puro	0,048	1	0,048	
Total	1,676	9		

$$R^2 = 0,88$$

Dessa forma, a influência de goma acácia e inulina na concentração de *Bifidobacterium animalis* no leite fermentado armazenado por 64 dias pode ser representada pela equação 7:

$$\text{Log (UFC/g)} = 6,355 - 0,001X_1 + 0,368X_2 + 0,0925X_1^2 - 0,205X_2^2 + 0,068X_1X_2 \quad (7)$$

A superfície de resposta e as curvas de contorno correspondentes à equação 7 estão representada na figura 13 e 14, respectivamente.

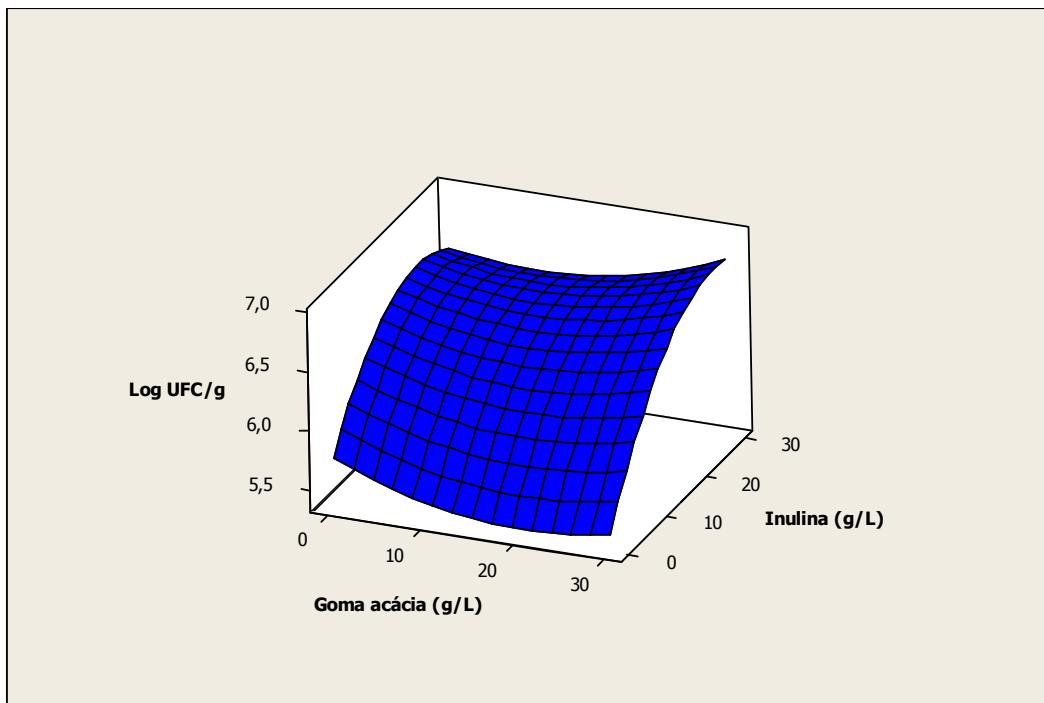


FIGURA 13 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DA CONCENTRAÇÃO DE *Bifidobacterium animalis* EM 64 DIAS DE ARMAZENAMENTO

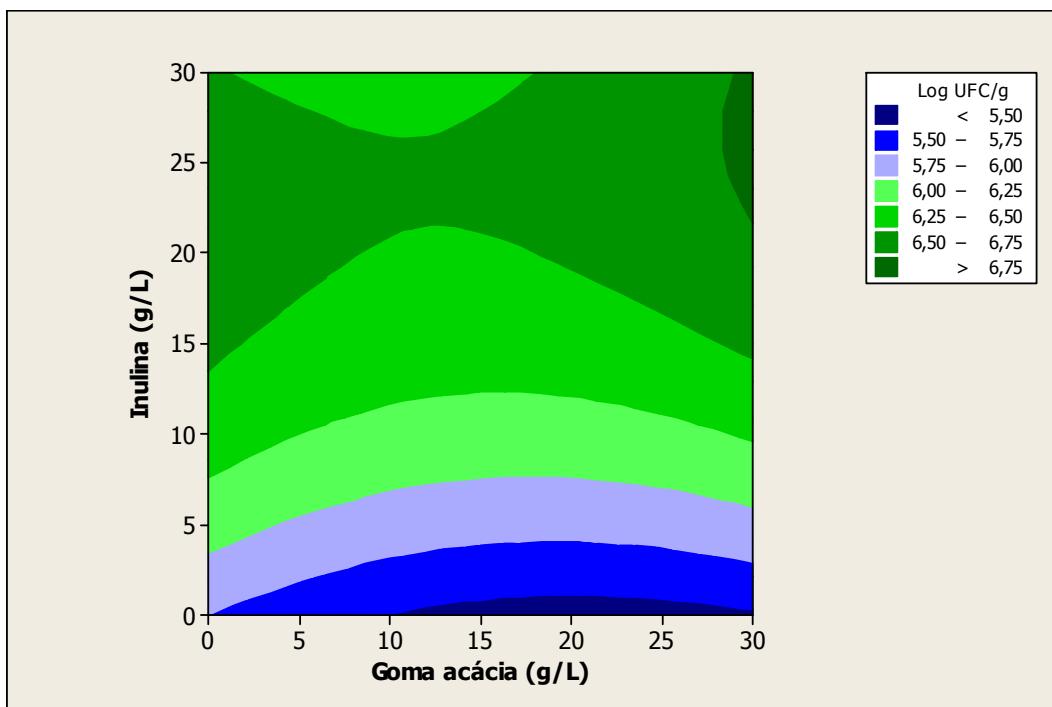


FIGURA 14 - CURVAS DE CONTOURNO PARA O MODELO DA CONCENTRAÇÃO DE *Bifidobacterium animalis* EM 64 DIAS DE ARMAZENAMENTO

Através da análise da superfície de resposta e curvas de contorno, figuras 13 e 14 respectivamente, verifica-se pouca influência da goma acácia na concentração de

Bifidobacterium animalis. Por outro lado, o aumento da concentração de inulina favoreceu a sobrevivência do microorganismo. Para uma concentração de inulina 25 g/L a população do microorganismo permanece acima de 6,5 Log UFC/g e abaixo 7,5 g de inulina/L, a concentração de *Bifidobacterium animalis* atinge valores abaixo de 6,0 Log UFC/g em 64 dias de armazenamento a 10 °C.

A influência de inulina na sobrevivência de *Bifidobacterium bifidum* também foi verificada por Özer, Akin e Özer (2005), entretanto diferente do observado no presente estudo o aumento da sobrevivência do microorganismo em iogurte AB, ocorreu durante 14 dias de armazenamento em temperaturas abaixo de 6 °C. Nenhum efeito da inulina na sobrevivência de *L. acidophilus* foi verificado. Capela, Hay e Shah (2006) verificaram que a presença de 2 % de inulina aumentou a sobrevivência conjunta de *L. acidophilus*, *L. casei*, *B. longum* e *L. rhamnosus* em 1,15 Log UFC/g em 4 semanas de armazenamento a 4 °C. A influência da inulina, individualmente, sobre cada microorganismo não foi determinada. O prebiótico que mais favoreceu a sobrevivência dos microorganismos, diferença de 1,42 Log UFC/g em relação ao controle, foi o FOS (Frutooligossacarídeo). Shin *et al.* (2000), também verificaram maior influência do FOS sobre o crescimento e sobrevivência de *Bifidobacterium* em relação à inulina. O efeito do FOS foi observado para concentrações a partir de 1 %, enquanto 5 % de inulina foram necessárias para o estímulo do microorganismo. Segundo os autores, carboidratos com menor grau de polimerização, como o FOS, são melhores substratos para *Bifidobacterium*. O aumento da sobrevivência de *Bifidobacterium animalis* e de *Bifidobacterium longum* em iogurte contendo 2 % de FOS armazenado por 28 dias a 4 °C também foi verificado por Akalin, Fernderya e Akbulut (2004).

No presente estudo a inulina apresentou influência na sobrevivência de *Bifidobacterium* apenas em 64 dias de armazenamento, o que pode ser decorrente das baixas concentrações avaliadas (máximo 3 %) e ainda das características do produto comercial empregado OraftiTM Synergy1, composto de cerca de 50 % de inulina (grau de polimerização de 10 a 60) e 50 % de oligofrutose (grau de polimerização de 2 a 7) (ROBERFROID, 2007). Além desses fatos, o erro experimental na metodologia utilizada para quantificar *Bifidobacterium animalis* possivelmente não permitiu avaliar pequenas diferenças que ocorreram entre os ensaios do Planejamento Composto Central em tempos de armazenamento inferiores a 64 dias.

Embora em alguns estudos a ação de prebióticos não seja comprovada no

alimento, em muitos casos, seu efeito é comprovado em meio de cultura e *in vivo*, (COLLINS; GIBSON, 1999; KOLIDA; GIBSON, 2007). Rochat *et al.* (2001) ao estudarem a sinergia dos prebióticos no estímulo da microbiota intestinal humana, demonstraram que a ingestão de uma mistura de dois prebióticos (frutooligossacarídeos e goma acácia) estimula mais efetivamente o crescimento das bifidobactérias do que a ingestão destes prebióticos separadamente. Cherbut *et al.* (2003) realizaram um estudo para comprovar que a goma acácia é uma fibra dietética bifidogênica com alta tolerância digestiva. O efeito prebiótico foi comprovado através do aumento da concentração de bifidobactérias e bactérias lácticas totais nas fezes de indivíduos que consumiram o produto por 10 dias. Além de bifidobactérias e lactobacilos nenhum outro grupo de bactérias analisadas apresentou crescimento da população.

Os dados da literatura comprovam que existe influência dos prebióticos no crescimento e sobrevivência de bactérias probióticas quando os resultados são medidos pela análise do crescimento das culturas desejadas nas fezes. Porém não existem muitos dados sobre o aumento da população de probióticos nos produtos simbióticos durante a estocagem de alimentos. Nas condições aqui estudadas, a presença de goma acácia no leite fermentado não afetou a contagem dos microorganismos probióticos, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* e a inulina influenciou apenas a sobrevivência de *Bifidobacterium*.

Durante os 64 dias de armazenamento do leite fermentado a 10 °C, a redução média da população de *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus thermophilus* foi de 0,6; 0,7 e 1,4 Log UFC/g ($p < 0,05$) respectivamente. Para *Bifidobacterium* até o 42º dia de armazenamento a variação média da população não foi significativa ($p > 0,05$) enquanto os demais microorganismos apresentaram uma variação não significativa até o 22º dia de armazenamento ($p > 0,05$) (Tabela 33). Zacarchenco e Massaguer-Roig (2006), também verificaram que as populações de *S. thermophilus* e *B. longum* mantiveram-se constantes nos leites fermentados até 21 dias de estocagem a 4 °C, entretanto a população de *L. acidophilus* apresentou redução de um ciclo logarítmico no mesmo período.

Com exceção dos produtos com baixa concentração de inulina, todas as demais formulações do Planejamento Composto Central mantiveram os níveis de bactérias probióticas exigidos pela legislação (acima de 10^6 UFC/g), durante os 64 dias de armazenamento a 10 °C.

TABELA 33 - CONCENTRAÇÃO MÉDIA DOS MICROORGANISMOS NO LEITE FERMENTADO EM DIFERENTES TEMPOS DE ARMAZENAMENTO A 10 °C

Microorganismo	Log (UFC/g) *			
	1° dia	22° dia	42° dia	64° dia
<i>Bifidobacterium</i>	6,8 ± 0,2 ^a	6,8 ± 0,2 ^a	6,6 ± 0,1 ^a	6,2 ± 0,5 ^b
<i>Lactobacillus</i>	7,3 ± 0,1 ^a	7,2 ± 0,1 ^a	6,9 ± 0,1 ^b	6,6 ± 0,2 ^c
<i>Streptococcus</i>	9,2 ± 0,1 ^a	9,0 ± 0,2 ^a	8,0 ± 0,4 ^b	7,8 ± 0,4 ^b

* Média de 11 determinações ± desvio-padrão.

a,b,c Médias, com letras diferentes na mesma linha, apresentam diferença significativa ($p < 0,05$)

Segundo Akalin, Fenderya e Akabulut (2004) a viabilidade de *Bifidobacterium* no alimento depende da espécie. Assim como no presente trabalho, os autores verificaram que a população de *Bifidobacterium animalis* permaneceu constante em iogurte armazenado por 28 dias a 5 °C, entretanto a população de *Bifidobacterium longum* foi reduzida em 99 % no mesmo período.

Outros fatores como a concentração de ácido e a presença de peróxido de hidrogênio, produzido por bactérias tradicionais de iogurte, também podem influenciar a viabilidade de microorganismos probióticos (SHAH; LANKAPUTHRA, 1997; GROSSO; FAVARO-TRINDADE, 2004). De modo geral, linhagens de *Lactobacillus acidophilus* toleram melhor ambientes ácidos que bifidobactérias (SAKAI *et al.*, 1987; SHAH *et al.*, 1995).

Bactérias láticas adicionadas ao leite fermentado podem inibir as bactérias probióticas, assim como os probióticos podem inibir as bactérias láticas (VINDEROLA; MOSCHIUTTI; REINHEIMER, 2002). Por outro lado, a presença de *Streptococcus thermophilus* pode favorecer a sobrevivência de *Bifidobacterium*, devido a sua alta capacidade de utilização de oxigênio, reduzindo o nível de O₂ dissolvido no leite (VINDEROLA *et al.*, 2000). No presente estudo, ambas as bactérias probióticas apresentaram boa sobrevivência durante o armazenamento, o que pode ser decorrente de um pH mais elevado devido à ausência de *Lactobacillus bulgaricus*. Em média o pH variou de 4,5 ± 0,1 a 4,22 ± 0,05, durante os 64 dias de armazenamento a 10 °C.

O sucesso da adição de culturas probióticas depende das espécies e linhagens usadas; das interações metabólicas com bactérias láticas; das condições de fermentação; do pH do produto; da presença de oxigênio e da temperatura de estocagem (VINDEROLA; REINHEIMER, 1999).

5.2.4 Análises de textura

O leite fermentado simbótico foi armazenado por 64 dias a 10 °C e a cada 21 dias foram retiradas amostras para acompanhamento da Elasticidade e Firmeza. As tabelas 34 e 35 apresentam os resultados obtidos.

A análise dos coeficientes dos modelos para as duas respostas de interesse (Tabelas 36 e 37) mostra que a presença de goma acácia e a inulina não influenciou a elasticidade e firmeza dos produtos ($p > 0,05$) durante os 64 dias de armazenamento a 10 °C.

TABELA 34 – VALORES DE ELASTICIDADE DO LEITE FERMENTADO DURANTE O ARMAZENAMENTO A 10 °C

Ensaio	Goma Acácia	Inulina	Elasticidade			
	(g/L) (x ₁)	(g/L) (x ₂)	1° Dia	22° Dia	43° Dia	64° Dia
1	4,4	4,4	0,114	0,161	0,180	0,181
2	25,6	4,4	0,123	0,153	0,167	0,179
3	4,4	25,6	0,064	0,098	0,098	0,099
4	25,6	25,6	0,105	0,166	0,174	0,171
5	0	15,0	0,103	0,160	0,166	0,175
6	30,0	15,0	0,010	nd	0,076	0,141
7	15,0	0	0,101	0,155	0,179	0,177
8	15,0	30,0	0,048	nd	0,102	0,147
9	15,0	15,0	0,134	0,185	0,211	0,216
10	15,0	15,0	0,094	0,162	0,148	0,207

nd – valor não disponível

TABELA 35 – VALORES DE FIRMEZA DO LEITE FERMENTADO DURANTE O ARMAZENAMENTO A 10 °C

Ensaio	Goma Acácia	Inulina	Firmeza			
	(g/L) (x ₁)	(g/L) (x ₂)	1° Dia	22° Dia	43° Dia	64° Dia
1	4,4	4,4	0,229	0,283	0,296	0,287
2	25,6	4,4	0,229	0,272	0,279	0,293
3	4,4	25,6	0,161	0,202	0,199	0,200
4	25,6	25,6	0,216	0,283	0,284	0,282
5	0	15,0	0,211	0,271	0,270	0,285
6	30,0	15,0	0,100	nd	0,174	0,231
7	15,0	0	0,218	0,274	0,290	0,292
8	15,0	30,0	0,149	nd	0,210	0,241
9	15,0	15,0	0,251	0,300	0,316	0,329
10	15,0	15,0	0,200	0,289	0,259	0,207

nd – valor não disponível

TABELA 36 - COEFICIENTES DO MODELO DE ELASTICIDADE EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS AVALIADAS DURANTE O ARMAZENAMENTO A 10 °C

Termos	1° dia		22° dia		43° dia		64° dia	
	Coef	P	Coef	P	Coef	P	Coef	P
Constante	0,1121	0,001	0,1667	0,000	0,1738	0,002	0,1966	0,001
x_1	0,0130	0,192	0,0123	0,195	0,0129	0,403	0,0147	0,261
x_2	-0,0164	0,125	-0,0151	0,136	-0,0215	0,206	-0,0249	0,102
x_1^2	0,0054	0,602	0,0019	0,839	0,0016	0,927	-0,0040	0,776
x_2^2	-0,0164	0,178	-0,0202	0,110	-0,0165	0,381	-0,0311	0,095
$x_1 * x_2$	0,0080	0,407	0,0187	0,100	0,0220	0,222	0,0186	0,202

TABELA 37 - COEFICIENTES DO MODELO DE FIRMEZA EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS AVALIADAS DURANTE O ARMAZENAMENTO A 10 °C

Termos	1° dia		22° dia		43° dia		64° dia	
	Coef	P	Coef	P	Coef	P	Coef	P
Constante	0,2221	0,000	0,2843	0,000	0,0279	0,000	0,2720	0,003
x_1	0,0132	0,279	0,0151	0,155	0,0150	0,322	0,0183	0,503
x_2	-0,0204	0,135	-0,0198	0,089	-0,0251	0,143	-0,0281	0,329
x_1^2	0,0037	0,777	0,0011	0,916	0,0034	0,836	0,0144	0,655
x_2^2	-0,0166	0,264	-0,0221	0,105	-0,0150	0,401	-0,0152	0,638
$x_1 * x_2$	0,0137	0,291	0,0231	0,074	0,0255	0,158	0,0188	0,519

Durante os 64 dias de armazenamento a elasticidade do leite fermentado variou em média de $0,09 \pm 0,04$ N/mm para $0,17 \pm 0,03$ N/mm e a firmeza de $0,20 \pm 0,05$ N para $0,27 \pm 0,04$ N.

Fagan *et al.*, (2006) estudaram o efeito da adição de fibras na cinética de coagulação do leite. A adição de 1 a 3 % de goma acácia diminuiu significativamente o tempo para formação do gel e este apresentou uma rede de caseína mais aberta do que o gel de controle. A adição de 2 % de inulina foi necessária para diminuir o tempo para formação do gel e tempo para firmeza do coágulo.

Gel-Nagar *et al.*, (2002) observaram que o acréscimo de inulina em sorvete de iogurte com baixo teor de gorduras aumenta significativamente sua viscosidade devido às interações da fibra solúvel com a parte aquosa do produto. A funcionalidade da inulina está baseada em seu efeito sobre soluções aquosas a vários níveis de sólidos. À medida que a concentração de inulina aumenta, a viscosidade aumenta gradativamente.

No trabalho de Buriti, Cardarelli e Saad (2008), avaliou-se o efeito da adição do probiótico *Lactobacillus paracasei* e da fibra prebiótica inulina sobre o perfil de textura

e as características sensoriais de queijo fresco cremoso. O perfil de textura instrumental foi determinado após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento. A presença de *Lactobacillus paracasei* e inulina nos queijos não alterou significativamente o perfil de textura ($p > 0,05$). Esperava-se que a adição de inulina no queijo pudesse produzir uma maior variação nos parâmetros de textura instrumental, particularmente na firmeza, uma vez que, de acordo com Murphy (2001), já foi comprovado que a inulina é capaz de atuar como modificador de textura em produtos alimentícios. Segundo o mesmo autor, a funcionalidade tecnológica da inulina está baseada no seu efeito em soluções aquosas com vários teores de sólidos; em baixas concentrações, a inulina causa um significante aumento da viscosidade e pode ser utilizada como um modificador reológico, conferindo ao produto a mesma sensação cremosa oferecida pelos lipídios.

No presente estudo, a adição de inulina ao leite não influenciou significativamente a firmeza e a elasticidade do leite fermentado, possivelmente devido às baixas concentrações utilizadas, máximo 3 %, e às características do produto comercial, Synergy1, composto de cerca de 50 % de inulina e 50 % de FOS. Mendoza et al. (2001) verificaram que a adição de inulina em lingüiça seca fermentada com baixo teor de gordura proporcionou uma melhoria da textura do produto, que apresentou redução da firmeza, porém com elasticidade e adesividade similares às de lingüiças convencionais. Wang, Rosell, Benedito De Barber (2002) verificaram que a adição de inulina na fabricação de pães aumentou a firmeza do miolo, porém não interferiu na coesividade e elasticidade da massa.

A goma acácia dissolve-se facilmente em água quente e origina soluções pouco viscosas, podendo ser utilizada em concentrações de até 10 % como fibra solúvel, sem modificar a textura (THEBAUDIN, 1997, PHILLIPS; OGASAWARA; USHIDA, 2007). Atualmente no Brasil, os preparados para refresco que contém fibras, são formulados com goma acácia. Por possuir baixa viscosidade em solução (cerca de 100 cps a 25 % ou 5 cps a 1 %), quando empregada na concentração de 55 %, a goma acácia se equipara a concentração média de 5 % de outras gomas convencionais. Tais características justificam o fato da goma acácia não ter influenciado a firmeza e a elasticidade do leite fermentado simbótico, já que a máxima concentração utilizada foi de 3 %.

5.2.5 Análise sensorial

a) Teste de preferência indireta

O teste de preferência utilizado foi com a Escala Hedônica de 9 pontos, de gostei extremamente até desgostei extremamente (DUTCOSKY, 1996). Este teste representa o somatório de todas as percepções sensoriais e expressa o julgamento, por parte do provador, sobre a qualidade do produto. Quatro amostras de leite fermentado foram avaliadas, sendo: P (formulação padrão, sem prebiótico); A (com 3 % de goma acácia); B (com 3 % de inulina) e C (com 1,5 % de inulina e 1,5 % de goma acácia). O índice de aceitação médio (notas iguais ou superiores a 6) para os leites fermentados foi de 90 %, sendo 85 % para amostra P, 92 % para amostra A, 90 % para amostra B e 93 % para amostra C, conforme mostra a figura 15.

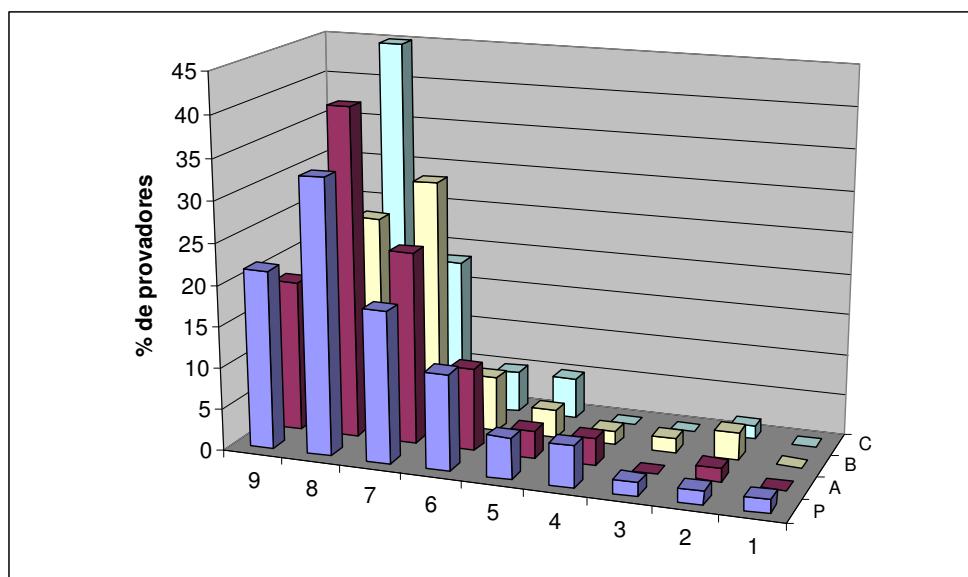


FIGURA 15 – DISTRIBUIÇÃO DAS NOTAS DOS PROVADORES PARA OS LEITES FERMENTADOS SIMBIÓTICOS (P: FORMULAÇÃO PADRÃO, A: GOMA ACÁCIA, B: INULINA E C: MISTURA DE GOMA ACÁCIA E INULINA)

A tabela 38 apresenta as notas médias da análise sensorial para o teste de preferência indireta dos lotes de leite fermentado avaliados.

TABELA 38 - NOTAS MÉDIAS DA ANÁLISE SENSORIAL DOS LEITES FERMENTADOS

	Leite fermentado (*)			
	P	A	B	C
Notas médias	7,2	7,4	7,4	7,6

(*) - (P: FORMULAÇÃO PADRÃO, A: GOMA ACÁCIA, B: INULINA E C: MISTURA DE GOMA ACÁCIA E INULINA)

Pela observação dos resultados da tabela 38, verifica-se uma aceitação muito próxima das quatro amostras de leite fermentado, entre 7,2 a 7,6. As amostras A e B obtiveram exatamente a mesma pontuação e a amostra C obteve a maior pontuação. Entretanto, através da análise de variância (ANOVA) dos resultados (Tabela 39), pode-se afirmar que não existe diferença significativa na preferência das amostras, já que o F encontrado 0,55 foi menor que o F tabelado 2,60 ($F < F_{crítico}$), ao nível de significância de 5 %, para o grupo total de provadores. Pode-se afirmar também que os provadores possuem o mesmo conceito de avaliação para os leites fermentados produzidos, ou seja, respondem de forma homogênea à ficha de avaliação, pois F encontrado 1,68 foi menor que o valor tabelado 2,76 ao nível de significância de 5 %.

TABELA 39 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O TESTE DE PREFERÊNCIA INDIRETA DOS LEITES FERMENTADOS

Fonte de variação	sq	Gl	MQ	F	F crítico
Amostra	5,78	3	1,93	0,55	2,60
Provador	205,75	59	3,48	1,68	2,76
Resíduo	367,47	177	2,07		
Total	579	239			

b) Intenção de compra das amostras

Esta análise de intenção de compra do leite fermentado pelos provadores foi realizada para comprovação do resultado de preferência apresentado. Para a análise de resultados foi utilizado o seguinte critério de pontuação para as amostras: 3 (SIM - eu certamente compraria este produto), 2 (Talvez - eu talvez compraria este produto) e 1 (NÃO - eu certamente não compraria este produto). O índice de intenção de compra médio (provadores que consideraram SIM e TALVEZ) foi de 93 %, sendo 88 % para a amostra P, 95 % para a amostra A, 92 % para a amostra B e 97 % para a amostra C,

conforme mostra a figura 16.

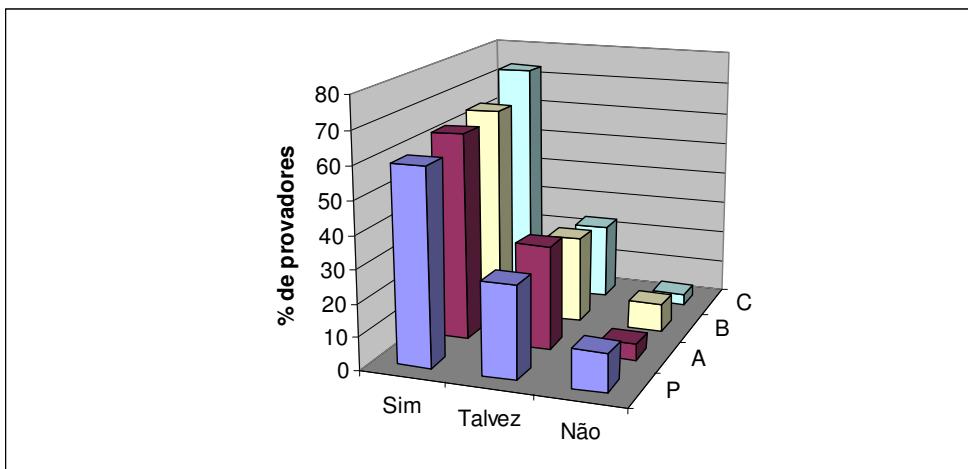


FIGURA 16 – PORCENTAGEM DE INTENÇÃO DE COMPRA DOS LEITES FERMENTADOS SIMBIÓTICOS (P: FORMULAÇÃO PADRÃO, A: GOMA ACÁCIA, B: INULINA E C: MISTURA DE GOMA ACÁCIA E INULINA)

A avaliação foi realizada para o grupo total de degustadores. Foi solicitado também aos provadores que observassem bem as características visuais das amostras. A tabela 40 mostra as médias das notas da análise sensorial para intenção de compra dos lotes de leite fermentado avaliados.

TABELA 40 - NOTAS MÉDIAS DA INTENÇÃO DE COMPRA DOS DEGUSTADORES PARA OS LEITES FERMENTADOS

	Leite fermentado			
	P	A	B	C
Notas Médias	2,5	2,6	2,6	2,7

(*) – (P: FORMULAÇÃO PADRÃO, A: GOMA ACÁCIA, B: INULINA E C: MISTURA DE GOMA ACÁCIA E INULINA)

Pela observação dos resultados da tabela 40, pode-se verificar uma aceitação bem próxima das quatro amostras de leite fermentado, entre 2,5 a 2,7. As amostras A e B obtiveram exatamente a mesma pontuação e a amostra C obteve a maior pontuação. A análise de variância (ANOVA) dos resultados (Tabela 41) mostra que não existe diferença significativa na intenção de compra entre as amostras, já que o F encontrado 1,09 foi menor que o F tabelado 2,60 ($F < F_{crítico}$), ao nível de significância de 5 %, para o grupo total de provadores. Pode-se afirmar também que os provadores possuem o mesmo conceito de avaliação para os leites fermentados produzidos, ou seja, respondem de forma homogênea à ficha de avaliação, pois F encontrado 1,19 foi menor que o valor

tabelado 2,76 ao nível de significância de 5 %.

TABELA 41 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA TESTE DE INTENÇÃO DE COMPRA DOS LEITES FERMENTADOS

Fonte da variação	SQ	G1	MQ	F	F crítico
Amostras	1,43	3	0,47	1,09	2,60
Provador	25,83	59	0,43	1,19	
Resíduo	65,07	177	0,36		
Total	92,33	229			

Portanto, a análise sensorial de preferência e intenção de compra entre as quatro amostras de leite fermentado (amostra padrão P, sem adição de prebiótico, amostra A, com adição de 3 % de goma acácia, amostra B, com adição de 3 % de inulina e amostra C com 1,5 % de goma acácia mais 1,5 % de inulina) mostra estatisticamente que, para um nível de significância de 5 %, não há diferença significativa entre as amostras.

Madureira e Penna (2004) avaliaram a influência dos teores de soro (40, 50 e 55 %), sacarose (6, 7 e 8 %) e oligofrutoses (1, 2 e 3 %) nas características microbiológicas e sensoriais de bebidas lácteas funcionais e concluíram que as amostras com maiores aceitabilidades sensoriais foram preparadas com maiores teores de sacarose e sólidos totais. Embora as amostras avaliadas no presente trabalho tenham apresentado uma diferença não significativa ($p > 0,05$), as maiores notas foram atribuídas para os produtos com prebióticos, ou seja, com maior teor de sólidos totais.

Em mousse de chocolate contendo *Lactobacillus paracasei*, Aragon-Alegro *et al.* (2007) verificaram que a adição de 5 % de inulina não interferiu nas características sensoriais do produto. Em suco de laranja com cenoura, Freitas e Jackix (2004), verificaram que a adição de 1 a 19 % de FOS não influenciou os atributos sensoriais do produto.

6 CONCLUSÕES

- ❖ A temperatura de fermentação (37, 39 e 41 °C) não influenciou a concentração final de *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* e *Bifidobacterium animalis* no leite fermentado.
- ❖ Os prebióticos goma acácia e inulina não influenciaram a produção de ácido láctico durante a fermentação.
- ❖ As menores variações de pH durante a fermentação ocorreram quando concentrações de goma acácia acima de 25 g/L foram adicionadas ao leite fermentado.
- ❖ A adição dos prebióticos goma acácia e inulina não influenciou significativamente a sobrevivência de *L. acidophilus* e *S. thermophilus*, no leite fermentado durante os 64 dias de armazenamento a 10 °C.
- ❖ A adição de inulina favoreceu a sobrevivência de *Bifidobacterium* no leite fermentado armazenado, com exceção dos produtos com baixa concentração de inulina, todas as demais formulações mantiveram os níveis de bactérias probióticas exigidos pela legislação (acima de 10^6 UFC/g) por 64 dias a 10 °C.
- ❖ A presença de goma acácia e a inulina não influenciou a elasticidade e firmeza dos produtos ($p > 0,05$) durante os 64 dias de armazenamento a 10 °C.
- ❖ A análise sensorial de preferência e intenção de compra do leite fermentado mostrou que não há diferença significativa entre as amostras de leite fermentado com e sem a adição de inulina e goma acácia.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, D. S. P. **Estresse oxidativo e alimentação.** In: TIRAPEGUI (org.) Nutrição: fundamentos e aspectos atuais. São Paulo: Atheneu, 2000.
- ADA (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION). Functional Foods – Position of ADA. **J.Am.Diet.Assoc.**, vol. 99, p. 1278-1285, 1999.
- ALEGRO, J. H. A. ; OKASAKI, T. Y. ; ROCHA, J. S. ; SAAD, S. M. I. **Comportamento de Microorganismos Probióticos e Indicadores em Queijo Minas Frescal Probiótico.** In: 9. SIICUSP - Simpósio Internacional de Iniciação Científica, 2001, Ribeirão Preto. CD, 2001.
- ALMEIDA, K. E. ; BONASSI, I. A. ; ROÇA, R. O. **Características Físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo Minas Frescal.** **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, vol. 21, nº 2, Campinas May/Aug. 2001.
- AKALIN, A. S. ; FENDERYA, S. ; AKBULUT, N. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. **International Journal of Food Science & Technology**, 39, p. 613–621, 2004.
- ANDRADE, V. T. ; BRANDÃO, S. C. C. B. ; SARAIVA, C. B. ; LEITE, M. O. Desenvolvimento de sorvete com prebiótico e probiótico. **Revista do Instituto de Lacticínios Cândido Tostes**, vol. 59, nº 339, Juiz de Fora, jul./ago, 2004.
- ANDRIGHETTO, C. ; GOMES, M. I. F. V. Produção de Picolés Utilizando Leite Acidófilo. **Braz. J. Food Technol.**, vol. 6, nº 2, p. 267-271, 2003.
- ANJO, D. L. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**. vol. 3, nº 2, p. 145-154, 2004.
- ANN, E. Y. ; KIM, Y. ; OH, S. ; IMM, J. Y. ; PARK, D. J. ; HAN, K. S. ; KIM, S. H. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridisation system. **International Journal of Food Science and Technology**, vol. 42, p. 411-419, 2007.
- ANTUNES, A. E. C. ; MARASCA, E. T. G. ; MORENO, I. ; DOURADO, F. M. ; RODRIGUES, L. G. ; LERAYER, A. L. S. Desenvolvimento de *buttermilk* probiótico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, vol. 27, nº 1, p. 83-90, 2007.
- ANTUNES, A. E. C. ; MOTTA, E. M. P. ; ANTUNES, A. J. Perfil de textura e capacidade de retenção de água de géis ácidos de concentrado protéico de soro de leite. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, vol. 23 (supl): p. 183-189, 2003.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, **Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional ou de Saúde**, Resolução RDC nº 2, 7 de janeiro de 2002.
- ARAGON-ALEGRO, L. C. ; ALEGRO, J. H. A. ; CARDARELLI, H. R. ; CHIU, M. C. ; SAAD, S. M. I. Potentially probiotic and symbiotic chocolate Mousse. **LWT - Food Science and Technology** vol. 40, Issue 4, May, p. 669-675, 2007.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – A.O.A.C. **Official methods of analysis**. 16.ed., 4.rev., 2v., 1018p, Washington: 1998.

BARROS NETO, B. ; SCARMINIO, I. S. ; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da Universidade de Campinas. 299p., 1995.

BIELECKA, M. ; BIERDRZYCKA, E. ; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their vivo effectiveness. **Food Research International**, vol. 35, p. 125-131, 2002.

BOND'T, V. Novas tendências para bebidas funcionais. **Brasil Alimentos**, vol. 18, p. 26-27, 2003.

BORGES, V. C. **Alimentos Funcionais: Prebióticos, Probióticos, Fitoquímicos e Simbióticos**. In: Waitzberg, D. L. Nutrição Enteral e Parenteral na Prática Clínica. São Paulo: Atheneu, 2001.

BORGES, F. M. O. ; SALGARELLO, R. M. ; GURIAN, T. M. **Recentes avanços na nutrição de cães e gatos**. II Simpósio sobre Nutrição de animais de Estimação. Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2003.

BORTOLOZO, E. Q. ; QUADROS, M. H. R. Aplicação de inulina e sucralose em iogurte. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, vol.01, nº 01, p 37-47, 2007.

BOURLIOUX, P. ; KOLETZO, B. ; GUARNER, F. **The intestine and microflora are partners for the protection of the host**: report on the danone Symposium “The Intelligent Intestine”, held in Paris, June 14, 2002. **Am J Clin Nutr**, vol. 78, p. 675-83, 2003.

BRANDÃO, W. A. P. L. N. T. M. ; SEIBERT, D. ; MENDONÇA, S. N. T. G. ; KATSUDA, M. S. Bebida fermentada probiótica de soro de leite. **Higiene Alimentar**, vol.20, nº143, agosto, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução n. 18*, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Brasília, 1999a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução n. 19*, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. Brasília, 1999b.

BUDIÑO, F. E. L. **Probiótico e/ou prebiótico em dietas de leitões recém desmamados**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004. 76 p.

BURITI, F. C. A. ; CARDARELLI, H. R. ; SAAD, S. M. I. Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco cremoso simbiótico: implicações da adição de *Lactobacillus paracasei* e inulina. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** vol.44, nº 1, São Paulo, Jan./Mar., 2008.

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

- BURITI, F. C. A. ; ROCHA, J. S. ; SAAD, S. M. I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal** vol.15, p. 1279-1288, 2005.
- 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*. **Lebensm.-Wiss. U.-Technol.** vol. 38, p. 173-180, 2005.
- CANDIDO, L. M. B. ; CAMPOS, A. M. **Alimentos para fins especiais: Dietéticos**. São Paulo: Livraria Varela; 1995.
- CAPELA, P. ; HAY, T. K. C. ; SHAH, N. P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. **Food Research International**, vol. 39, Issue 2, March, p. 203-211, 2006.
- CAUSEY, J. L. ; FEIRTAG, J.M. ; GALLAHER, D. D. ; TUNGSPLAN, B.S ; SLAVIN J L. Effect of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and gastrointestinal environment in hypercholesterolemic men. **Nutrition Research** vol. 12, p. 191-201, 2000.
- CHERBUT, C. ; MICHEL, C. ; RAISON, V. ; KRAVTCHENKO, T. P. ; MEANCE, S. Acacia gum is a bifidogenic dietary fiber with high digestive tolerance in healthy humans. **Microbial Ecology in Health and Disease** vol. 15, p. 43-50, 2003.
- CHRISTIAN HANSEN. **Method for counting probiotic bacteria**. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacteria* in milk products made with nutrish cultures. 1999. 5 p. [Procedimento Analítico].
- CLYSDALE, F. M. **A Proposal for the Establishment of Scientific Criteria for Health Claims for Functional Foods**. **Nutrition Reviews**. Boston: vol. 55, nº12, December 1997. p. 413-422. Apud SCOTT, F. W. ; LEE, N. S. *Recommendations for defining and dealing with functional foods. Report of the Bureau of Nutritional Sciences Committee on Functional Foods*, Canada, 1996.
- COLLINS, M. D. ; GIBSON, G. R. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, vol.69, p. 10525-10575, 1999.
- CORRALES, A. ; HENDERSON, M. ; MORALES, I. Sobrevivencia de microorganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* em helado batido. **Revista Chilena de Nutrición**, junio, ano/vol. 34, nº 002, Sociedad Chilena de Nutrición, Bromatología y Toxicología, Santiago, Chile, 2007.
- COSTA, N. M. B. ; BORÉM, A. **Biotecnologia em Nutrição – saiba como o DNA pode enriquecer os alimentos**. São Paulo: Editora Nobel, 2003.
- DAMIM, M. R. ; EMILIO, K. A. ; MINOWA, E. ; OLIVEIRA, M. N. Propriedades físico-químicas e viabilidade de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* em diferentes marcas de iogurtes comerciais no período final de vida de prateleira. **Revista Leite e Derivados**, p. 20-30, set/out, 2006.
- DAVE, R. I. ; SHAH, N. P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. **Int. Dairy J.**, nº 7, p. 31-41, 1997.

- DESMOND, C. ; ROSS, R. P. ; CALLAGHAN, E. O. ; FITZGERALD, G. ; STANTON, C. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC338 in spray-dried powders containing gum acacia. **Journal of Applied Microbiology**, nº 93, p. 1003-1011, 2002.
- DE ROOS, N. M. ; KATAN, M. B. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. **Am J Clin Nutr**; vol. 71, p. 405-11, 2000.
- DEN HOND, E. ; GEYPENS, B. ; GHOOS, Y. Effect Of High Performance Chicory Inulin on Constipation. **Nutrition Research**, vol. 20, p. 731-736, 2000.
- DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. Editora Universitária Champagnat, Curitiba, 1996. 123 p.
- FADINI, A. L. ; FACCHINI, F. ; QUEIROZ, M. B. ; YOTSUNYAGI, K. Influência de diferentes ingredientes na textura de balas moles produzidas com e sem goma gelana. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, vol. 21, nº 1, p. 131-140, 2003.
- FAGAN, C. C. ; O'DONNELL, C. P. ; CULLEN, P. J. ; BRENNAN, C. S. The effect of dietary fibre inclusion on milk coagulation kinetics. **Journal of Food Engineering**, nº 77, p. 261-268, 2006.
- FAGUNDES, R. L. M. ; COSTA, Y. R. Uso de alimentos funcionais na alimentação. **Higiene Alimentar**; vol. 17, p. 47, 2003.
- FREITAS, D. G. C. ; JACKIX, M. N. H. Physico-chemical characterization and sensory acceptance of functional drink added of fructoligosaccharides and soluble fiber. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, vol. 22, nº 2, p. 355-374, 2004.
- FUCHS, R. H. B. ; TANAMATI, A. A. C. ; ANTONIOLI, C. M.C. ; GASparello, E. A. ; DONEDA, I. Utilização de *Lactobacillus casei* e cultura iniciadora na obtenção de iogurte suplementado com inulina e oligofrutose. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, vol. 24, nº 1, p. 83-98, 2006.
- FUCHS, R. H. B. ; BORSATO, B. ; BONA, E. ; HAULY, M. C. O. “Iogurte” de soja suplementado com oligofrutose e inulina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 25, nº 1, p. 175-181, 2005.
- FULLER, R. ; GIBSON, G. R. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. **Scand. Journal Gastroenterology**, Suppl. 222, p. 28-31, 1997.
- GEL-NAGAR, G. ; CLOWES, G. ; TUDORICÂ, C. M. ; KURI, V. ReoLogical quality and stability of yog-ice cream with added inulin. **International Journal of Dairy Technology**, vol. 55, nº 2, p. 889-893, 2002.
- GIBSON, G. R. Dietary modulation of the human gut microbiota using the prebiotics oligofructose and inulin. **Journal of Nutrition**, vol. 129, p. 1438-1441, 1999.
- GIBSON, G. R. ; FULLER, R. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **Journal of Nutrition**, p. 391-395, 2000.

- GILLILAND, S. E. ; REILLY, S. S. ; KIM, H. S. Viability during storage of selected probiotic lactobacilli and bifidobacteria in yogurt-like product. **Food Microbiology and Safety**, vol. 67, nº 8, p. 3091-3095, oct., 2002.
- GOMES, A. M. P. ; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Technology**, vol. 10, p. 139-157, 1999.
- GROSSO, C. R. F. ; FAVARO-TRINDADE, C. S. Estabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* nas formas livre e imobilizada em leite acidificado e de *B. lactis* imobilizado em iogurte. **Braz. J. Microbiol.**, vol.35, nº 1-2, p. 151-156, 2004.
- GUARNER, F. ; SCHAAFSMA, G. J. Probiotics. **Int. J. Food Microbiol.**, vol. 39, p. 237-238, 1998.
- GUPTA, P. K. ; MITAL, B. K. ; GARG, S. K. Preparation and evaluation of *Acidophilus* yoghurt. **J. Food Sci. Technol.**, vol. 34, nº 2, p. 168-170, 1997.
- HADDADIN, M. S. Y. ; AWAISHED, S. S. ; ROBINSON, R. K. The production of yoghurt with probiotic bacteria isolated from infants in Jordan. **Pakistan Journal of Nutrition**, vol. 3, nº 5, p. 290-293, 2004.
- HARTEMINK, R. ; VANLAERE, K. M. J. ; ROMBOUTS, F. M. Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, Wageningen, vol .383, p. 367-374, 1997.
- HASLER, C. M. Functional Foods: their role in disease prevention and health promotion. **Food Technology**, vol. 52, nº 11, p. 63-70, 1998.
- HAULY, M. C. O. ; MOSCATTO, J. A. **Inulina e Oligofrutoses: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeito prebiótico e importância na indústria de alimentos.** Seminário: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, vol. 23, nº 1, p. 105-118, 2002.
- HAULY, M. C. O. ; FUCHS, R. H. B. ; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Suplementação de iogurte de soja com frutooligossacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. **Rev. Nutr.**, vol. 18, nº 5, p. 613-622, 2005.
- HELLER, K. J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **Am J Clin Nutr**; vol. 73(suppl), p. 374S-379S, 2001.
- HIRAYAMA, K. ; RAFTER, J. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. **Microbes and Infection**, vol. 2, p. 681-686, 2000.
- HOIER, E. Use of probiotic starter cultures in dairy products. **Food in Australia**, vol 44, p. 418-420, 1992.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise dos alimentos.** 3.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, vol.1, 1985. 371 p.
- ISHIBASHI, N. ; SHIMAMURA, S. Bifidobacteria: research and development in Japan. **Food Technology**, vol. 47, p. 126-134, 1993.

JURKIEWICZ, C. H. **Avaliação das características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais de queijo minas frescal elaborado com culturas probióticas de *Lactobacillus acidophilus*.** Tese de doutorado. São Paulo: Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 1999.

KAUR, N. ; GUPTA, A. K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **J. Biosci**, vol.27, n°7, p. 703-714, 2002.

KLAENHAMMER, T. R. Probiotic bacteria: today and tomorrow. **J Nutr**; vol. 130 Suppl. 2S, p. 415S-416S, 2000.

KOLIDA, S. ; GIBSON, G. R. Prebiotic Capacity of Inulin-Type Fructans. **J. Nutr.** vol. 137, p. 2503S-2506S, 2007.

KRAVTCHENKO, T. ; MICHEL, C. ; CHERBUT, C. La gomme d' Acacia modifie la composition bactérienne et l'activité métabolique de la flore fécale humaine. **Journées Francophones de Nutrition**, Paris, 26-28 nov. 1997.

LAJOLO, F. M. **Alimentos Funcionais: uma visão geral.** In: DE ANGELIS, R.C. Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia de nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas, São Paulo: ed Atheneu, 2001.

LANKAPUTHRA, W. E. V. ; SHAH, N. P. **Investigation of factors affecting viability of *Lactobacillus acidophilus* and bifidobacteria in yoghurt.** In: 24th International Dairy Congress Proceedings, Melbourne, Australia, p.292, 1994.

LEE, Y. ; SALMINEM, S. The coming of age of probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, vol. 6, p. 241-244, 1995.

LOURENS-HATTINGH, A. ; VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, vol. 11, p. 1-17, 2001.

MADEIRA, M. ; MOURA, M. R. L. **Nutraceutico, o alimento em forma de pílula,** URL <http://www.unikey.com.br/aqcom/nutritiva>, 3p., cons.18 julho de 1999.

MADUREIRA, F. C. P. ; PENNA, A. L. B. Influência dos teores de soro, sacarose e oligofructose nas características microbiológicas e sensoriais de bebidas lácteas funcionais. **Revista do ILCT**, Juiz de Fora, vol. 59, n° 339, jul/ago, 2004.

MAIORKA, A. ; SANTIN, E. ; SUGETA, S. M. ; ALMEIDA, J. G. ; MACARI, M. Utilização de Prebióticos, Probióticos ou Simbióticos em Dietas para Frangos. **Rev. Bras. Cienc. Avic.** Campinas, vol. 3, n. 1, 2001.

MARTI DEL MORAL, A. ; MORENO-ALIAGA, M. A. ; HERNANDEZ, A. M. Efecto de los prebioticos sobre el metabolismo lipídico. **Rev. Nutr. Hosp.** XVIII, vol. 4, p. 181-188. 2003.

MARUYAMA, L. Y. ; CARDARELLI, H. R. ; BURITI, F. C. A. ; SAAD, S. M. I. Textura instrumental de queijo petit-suisse potencialmente probiótico: influência de diferentes combinações de gomas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, vol. 26, n° 2, p. 386-393, 2006.

MATSUZAKI, T. ; CHIN, J. Modulating immune responses with probiotic bacteria. **Immunol Cell Biol**, vol. 78, p. 67-73, 2000.

- MAY, T. ; MACKIE, R. I. ; FAHEY, G. C. Jr. ; CREMIN, J. C. ; GARLEB, K. A. Effect of fiber source on short-chain fatty acid production and on the growth and toxin production by *Clostridium difficile*. **Scand. J. Gastroenterol.**, vol. 29, p. 916-922, 1994.
- MCINTOSH, G. H. Dairy foods on colon cancer prevention. **Australian Journal Dairy Technol.**, vol. 58, p. 140-143, 2003.
- MENDOZA, E. ; GARCÍA, M. L. ; CASAS, C. ; SELGAS, M. D. Inulin as fat substitute in low fat, dry fermented sausages. **Meat Sci.**, vol. 57, p. 387-393, 2001.
- MICHEL, C. ; KRAVTCHENKO, T. P. ; DAVID, A. ; GUENEAU, S. ; KOZOLOWSKI, F. ; CHERBUT, C. In vitro prebiotic effects of acácia gums onto the human intestinal microbiota depends on both botanical origin and environmental pH. **Anaerobe**, p. 257-266. 1998.
- MOIRA, H. Future for dairy products in the functional foods market. **Australian Journal Dairy Technol.**, vol. 58, p. 98-103, 2003.
- MORAES, F. P. ; COLLA, L. M. Alimentos Funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, vol 3, nº2, p. 109-122, 2006.
- MOREIRA, M. ; ABRAHAM, A. ; De ANTONI, G. TechnoLogical properties of milks fermented with thermophilic lactic acid bacteria at suboptimal temperature. **J. Dairy Sci.**, vol. 83, p. 395-400, 2000.
- MORENO, M. M. ; MONTESANTI, R. **Desenvolvimento de iogurte especial para terceira idade**. Trabalho de graduação. São Caetano do Sul: Escola de Engenharia Mauá. 2002.
- MURPHY, O. Non-polyol low-digestible carbohydrates: food applications and functional benefits. **Br. J. Nutr.**, vol.85, suppl.1, p. S47-S53, 2001.
- NEVEN, E. Inulina e oligofrutose – ingredientes multifuncionais para o desenvolvimento de produtos lácteos, **Revista Leite e Derivados**, vol. 11, nº 6, 2001.
- NITSCHKE, M. ; UMBELINO, D. C. Frutooligossacarídeos: Novos ingredientes funcionais. **Boletim SBCTA**, vol. 36, nº 1, p. 27-34, 2002.
- OLIVEIRA, M. N. ; DAMIN, M. R. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Dec., vol.23, suppl, p.172-176, 2003.
- O'RIORDAN, K. ; ANDREWS, D. ; BUCKLE, K. ; CONWAY, P. Evaluation of microencapsulation of *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 91, p. 1059-1066, 2001.
- OKASAKI, T Y. ; ROCHA, J. S. ; SAAD, S. M. I. ; ALEGRO, J. H. A. **Comportamento de microorganismos probióticos e indicadores em queijo minas frescal probiótico**. Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo (9: Ribeirão Preto); vol. 1, p. 347 res. 15.13. TRABALHO DE EVENTO-RESUMO, 2001.

- OZER, D. ; AKIN, S. ; OZER, B. Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in acidophilus-bifidus yoghurt. **Food Sci Tech Int**, vol. 11, nº 1, p. 019-026, 2005.
- PALOU, A. ; SERRA, P. Perspectivas europeas sobre alimentos funcionales. **Alim Nutr Salud**, vol. 7, nº 3, p. 76-90, 2000.
- PASSOS, L. M. L. ; PARK, Y. K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Cienc. Rural**, vol. 33, nº 2, Santa Maria, Mar./Apr., 2003.
- PENNA, F. J. ; FILHO, L. A. P. ; CALÇADO, A. C. ; JUNIOR, H. R. ; NICOLI, JR. Bases experimentais e clínicas atuais para o emprego dos probióticos. **J Pediatr**; Suppl. vol. 2, p. 209S-17S, 2000.
- PEREIRA, K. D. Amido Resistente, a última geração no controle de energia e digestão saudável. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, vol. 27(supl.), p. 88-92, ago. 2007.
- PEREIRA, M. A. ; ALMEIDA, D. M. ; SAUER, E. **Avaliação da concentração de bactérias lácticas viáveis em iogurtes com polpas de frutas**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Campus Ponta Grossa – Paraná – Brasil, v.01, p. 07-13, 2007.
- PHILLIPS, G. O., OGASAWARA, T., USHIDA, K. The regulatory and scientific approach to defining gum Arabic (*Acacia Senegal* and *Acacia Seyal*) as a dietary fibre. **Food Hydrocolloids**, n. 22, p. 24-35, 2007.
- QUINTANA, A., V. ; RAMON, A. N. Formulacion de um producto fermentado prebiotico a partir de leche de cabra. **Tecnologia Láctea Latinoamericana**, n. 44, p. 44-50, 2007.
- RASTALL, R. A. ; MAITIN, V. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 13, nº 5, 1 October, p. 490-496(7), 2002.
- REBELO, M. **Congresso internacional discute produção de alimentos funcionais no Brasil**. Agência Brasil, São Paulo, 25 mar. 2006. Disponível em:
<http://www.portaldoconsumidor.gov.br/noticia.asp?busca=sim&id=5656> Acesso em: 05 jan. 2008.
- REID, G. ; SANDERS, M. E. ; REX GASKINS, H. ; GIBSON, G. R. ; MERCENIER, A. ; RASTALL, R. ; ROBERFROID, M. ; ROWLAND, I. ; CHERBUT, C. ; KLAENHAMMER, T. R. New scientific paradigms for probiotic and prebiotics. **J. Clin Gastroenterol**, vol. 37, nº 2, p. 105-118, 2003.
- ROBERFROID, M. D. The bifidogenics nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **J. Nutr**, vol. 128, p. 1-9, 1988.
- ROBERFROID, M. Prebiotics revisited. **J. Nutri.**, vol. 137, p. 830S-837S, 2007.
- ROCHAT, F. ; BAUMGARTNER, M. ; JANN, A. ; ROCHAT, C. ; NIELSEN, G. ; REUTELER, G. ; BALLEVRE, O. **Synergistic effect of prebiotics on human intestinal**. Nestlé Research Center, CH1026, Lausanne, Switzerland, 2001.

- RODAS, M. A. B. ; RODRIGUES, R. M. M. S. ; SAKUMA, H. ; TAVARES, L. Z. ; SGARBI, C. R. ; LOPES, W. C. C. Caracterização físico-química, histológica e viabilidade de bactérias láticas em iogurtes com frutas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, vol. 21, nº 3, p. 304-309, 2001.
- ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrintestinal health. **J Nutr**; vol. 130, Suppl. 2S, p. 396S-402S, 2000.
- ROSS, R. P. ; DESMOND, C. ; FITZGERALD, G. F. ; STANTON, C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotics food. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 98, p. 1410-1417, 2005.
- RYBKA, S. ; FLEET, G. H. Populations of *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species in Australian yoghurts. **Food Australian**, vol. 49, nº 10, October, 1997.
- RYCROFT, C. E. ; JONES, M. R. ; GIBSON, G. R. ; RASTALL, R. A. A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 91, p. 878-887, 2001.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol.42, nº 1, jan./mar., 2006.
- SAARELA, M. ; MOGENSEN, G. ; FONDÉN, R. ; MAITTO, J. ; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, vol. 84, p. 197-215, 2000.
- SAAVEDRA, J. Probiotics and infectious diarrhea. **Am J Gastroenterol**; vol. 95, Suppl. 1S, p. 16S-8S, 2000.
- SAKAI, K. ; TACHIKI, T. ; KUMAGAI, H. ; TOCHIKURA, T. Hidrolysis of alfa-D-galactosyl oligosaccharides in soymilk by alfa-D-galactosidase of *Bifidobacterium breve* 203. **Agric. Biol. Chem.**, vol. 51, nº 2, p. 315-322, 1987.
- SALINAS, R. J. Higiene quality of commercial yoghurts. **Alimentaria**, Madrid, vol. 178, p. 27-30, 1986.
- SALYERS, A. A. ; PALMER, J. K. ; WILKINS, T. D. Degradation of polysaccharides by intestinal bacterial enzymes. **Am. J. Clin. Nutr.**, vol. 31, p. 128-130, 1978.
- SAMONA, A. ; ROBINSON, R. K. ; MARAKIS, S. Acid production by bifidobacteria and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk. **Food Microbiology**, vol. 13, p. 275-280, 1996.
- SAMONA, R. ; ROBINSON, R. K. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, vol. 44, nº 3, p. 64-66, 1991.
- SANDERS, M. E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bactéria. **Dairy Journal**, vol. 8, p. 341-347, 1998.
- SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, vol.61, nº 3, 2003.

SCHREZENMEIR, J. ; VRESE, M. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, vol. 73, p. 3615-3645, 2001.

SGARBIERI, V. C. ; PACHECO, M. T. B. Revisão: Alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, vol. 2, nº 1-2, p. 7-19, 1999.

SHAH, N. P. ; LANKAPUTHRA, W. E. V. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and bifidobacteria in yogurt using two step fermentation and neutralised mix. **Food Australia**, vol. 49, nº 8, p. 363-366, 1997.

SHAH, N. P. ; LANKAPUTHRA, W. E. V. ; BRITZ, M. ; KYLE, W. S. A. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. **International Dairy Journal**, vol. 5, p. 515-521, 1995.

SHIN, H. S. ; LEE, J. H. ; PESTKA, J. J. ; USTUNOL, Z. Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp in skin milk containing oligosaccharide and inulin. **Journal of Food Science**, vol. 65, nº 5, 2000.

SIMHON, A. ; DOUGLAS, J. R. ; DRASAR, B. S. ; SOOTHILL, J. F. Effect of feeding on infants' faecal flora. **Arch Dis Child**; vol. 57, p. 54-8, 1982.

STANTON, C. ; DESMOND, C. ; FITZGERALD, G. ; ROSS, R. P. Probiotic health benefits – reality or myth? **Australian Journal of Dairy Technol.**, vol. 58, p. 107-113, 2003.

SUN, W. ; GRIFFITHS, M. W. Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 61, p. 17-25, 2000.

TAMIME, A. Y. ; MARSHALL, V. ; ROBINSON, R. Microbial and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. **Journal of Dairy Research**, vol. 62, nº 1, p. 151-187, 1995.

TAMIME, A. Y. ; ROBINSON, R. K. **Yoghurt: science and technology**. 2.ed. Boca Raton: CRC, 1999. 368 p.

TAMIME, A. Y. ; ROBINSON, A. **YOGUR: ciencia y tecnología**. Zaragoza (España): Acribia, 1991. 279 p.

TANNOCK, G. W. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. **International Dairy Journal**, vol. 8, p. 527-533, 1998.

THEBAUDIN, J. Y. Dietary fibres: Nutritional and Technological interest. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 8, n. 2, p. 41-47, 1997.

THAMER, K. G. ; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, vol. 26, nº 3, p. 589-595, jul.-set., 2006.

THAMER, K. G. ; PENNA, A. L. B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligosacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 41, nº 03, 2005.

TORRES, R. **Flora intestinal, probioticos y salud.** Guadalajara. Edit Gráfica Nueva, Yakult, 1999.

TRINDADE, C. S. F. **Encapsulação de *Lactobacillus acidophilus* (La-05) e *Bifidobacterium lactis* (Bb-12) e avaliação “in vitro” do nível de tolerância dos mesmos às secreções gastrointestinais.** Tese de doutorado. Campinas: UNICAMP. 2001.

TULUNG, B. ; REMESY, C. ; DEMIGNE, C. Specific effect of guar gum or gum arabic on adaptation cecal digestion to high fiber diets in the rat. **J. Nutr.**, vol. 106, p. 118-123, 1987.

TUOHY, K. M. ; PROBERT, H. M. ; SMEJKAL, C. W. ; GIBSON, G. R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **DDT**, vol.8, n° 15, p. 692-700, 2003.

VEDAMUTHU, E.R. The yogurt story-past, present, and future. **Dairy, Food, and Environmental Sanitation**, vol. 11, n° 4, p. 202-203, 1991.

VINDEROLA, C. G. ; REINHEIMER, J. A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. **Int. Dairy J.**, vol. 9, p. 497-505, 1999.

VINDEROLA, C. G. ; PROSELLO, W. ; GHIBERTO, D. ; REINHEIMER, J. A. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. **J. Dairy Sci.**, vol.83, n° 9, p. 1905-1911, 2000.

VINDEROLA, C. G. ; MOCCHIUTTI, P. ; REINHEIMER, J. A. Interation among lactic acid starter and probiotic bactéria used for fermented dairy products. **J. Dairy Sci.**, vol. 85, n° 4, p. 721-729, 2002.

VRESE, M. ; MARTEAU, P. R. Supplement: Effects of Probiotics and Prebiotics - Probiotics and Prebiotics: Effects on Diarrhea. **J. Nutr.**, vol. 137, p. 803S-811S, March, 2007.

WANG, J. ; ROSELL, C. M. ; BENEDITO DE BARBER, C. Effect of the addition of different fibres on wheat dough performance and bread quality. **Food Chem.**, vol.79, n° 2, p.221-226, 2002.

WHISTLER, R. L. ; BEMILLER, J. N. Starch. In: **Carbohydrate Chemistry for Food Scientists**. Saint Paul: AACC, Eagan Press, p. 117-151, 1997.

WYATT, G. M. ; BAYLISS, C. E. ; HOLCROFT, J. D. A change in human faecal flora in response to inclusion of gum arabic in the diet. **Br. J. Nutr.**, vol. 55, p. 261-266, 1986.

YUKI, N. ; WATANABE, K. ; MIKE, A. ; TAGAMI, Y. ; TANAKA, R. ; OHWAKI, M. Survival of a probiotic, *Lactobacillus casei* strain *Shirota*, in the gastrintestinal tract: selective isolation from faeces and identification using monoclonal antibodies. **Int. J. Food. Microbiol.**, vol. 48, p. 51-7, 1999.

ZACARCHENCO, P. B. ; MASSAGUER-ROIG, S. Properties of *Streptococcus thermophilus* fermented milk containing variable concentrations of *Bifidobacterium*

longum and *Lactobacillus acidophilus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 37, nº 3, 2006.

ZACARCHENCO, P. B. ; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida de prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 24, nº 4, p. 674-679, 2004.

ANEXO I - GOMA ACÁCIA

129, Chemin de Croiseli^{et}
B.P.4151 - 76723 Rouen
France
Tél. 33.032.32.83.18.18
Fax 33.032.32.83.18.19



REFERENCE OF PRODUCT : FIBREGUM B IRX 61380

COMPOSITION : Acacia gum bleached, purified and instantised.

USAGE : Soluble dietary fibre.

FA61380-00a

ANALYTICAL DATA

Total dietary fibre	Méthode AOAC 985-29 : on dry weight.....	≥ 90 %
Moisture	MOLCQ 14.004 :	≤ 10 %
Total ashes	MOLCQ 14.015 :	≤ 4 %
Acid Insoluble matters	MOLCQ 14.016 :	≤ 0.1 %
Viscosity	MOLCQ 14.020 : 25% solution in water Brookfield LVF 50 rpm.....	60-130 mPa.s
Colour	MOLCQ 14.003 : 25% solution in water Lovibond AF 900.....	≤ 8
pH *	MOLCQ 14.002 : 25% solution in water.....	4.1 – 5.0
Mesh size *	MOLCQ 14.005 : through 250 mesh (63 µm)	≤ 15 %
Total plate count	MOLCQ 14.041 :	≤ 1 000 ufc/g
E.coli	MOLCQ 14.043 :	abs/ 5g
Salmonella	MOLCQ 14.057 :	abs/25g

***Storage** : in a cool and dry place

Expiration time : 3 years

*indicative specifications

The information contained in this bulletin is correct to the best of our knowledge. The recommendations or suggestions herein are made without guarantee or representation as to result, since the conditions of use are beyond our control. We suggest that you evaluate the recommendations contained in this bulletin in your own laboratory prior to use. No statement is to be construed as violating any copyright or patent. They are intended only as source of information.

ANEXO I - GOMA ACÁCIA

129, Chemin de Croisset
 B.P. 4151
 76723 Rouen cedex 3
 France
 Tl : + 33 (0) 2 32 83 18 18
 Fax : + 33 (0) 2 32 83 19 19



TECHNICAL DATA SHEET	FIBREGUM B	
Version : 1	Created on : 14/10/2005	Last update : N/A
Content : Acacia gum purified and instantised (soluble dietary fiber)		
Legal position : 96/77/EC, 95/2/EC, USP/NF, FCC, Eur.Ph.		
Standard Packaging : Net 25 kg paper bags with inner polyethylene liner		
Maximum Storage : 3 years	Storage Condition : Keep closed in cool and dry place	

MATERIAL CHARACTERISTICS

Physical and chemical data						
Analysis	Description	MINI	MAXI	Unit	Test method	
Moisture	5h @ 105°C		10	%	USP <921>	Method III
Colour @ 25%	Aqueous solution 25% - Lovibond AF900		10	-	-	-
Ashes @ 600°C	8h @ 600°C		4	%	Eur. Ph.	
Acid insoluble ashes	Ashes + acid hydrolysis		0,5	%	USP<561>	
Acid insoluble matters	Gravimetric determination after acid hydrolysis	*	0,1	%	-	-
pH	25% aqueous solution, @ 20°C	4,1	5,0	-	Eur. Ph. 2,3,3	
Viscosity	25%, Brookfield LVF 60 rpm @ 20°C	60	100	mPa.s	-	-
Total dietary fibre (on dry weight)	Enzymatic & gravimetric	90		%	AOAC 985-29 method	
Mesh size powder through 63µm	Vacuum sieving		15	%	-	-
Bacteriology						
Analysis	Description	MINI	MAXI	Unit	Test method	
Total Plate Count	72 h @ 30°C - PCA		500	ufc/g	ISO 4833	
E. coli (test for the presence of)	48 h @ 44°C - EP without indole + Kovacs reagent			abs/5g	NF V 08-017	
Salmonella (test for the presence of)	Pré-enrich, 24 h @ 41°C - SRTEM (Oxoid)			abs/25g	ISO 6579	



1 / 1

28/10/2005

The information contained in this bulletin is correct to the best of our knowledge. The recommendations or suggestions herein are made without guarantee or representation as to result, since the conditions of use are beyond our control. We suggest that you evaluate the recommendations contained in this bulletin in your own laboratory prior to use. No statement is to be construed as violating any copyright or patent. They are intended only as source of information. (Used date format : dd/mm/yyyy).

ANEXO II – INULINA




Doc A3-40*01/02

Description

RAFTILOSE®Synergy1

- is an **enriched chicory inulin** powder* containing a carefully selected DP distribution (DP = Degree of Polymerisation = chain length of the molecules);
- is a combination of chicory inulin molecules with selected chain lengths, enriched by a specific fraction of oligofructose produced by partial enzymatic hydrolysis of chicory inulin;
- is a food ingredient containing inulin, oligofructose, fructose, glucose and sucrose;
- is exactly the same product as the one used in the clinical research that shows that the daily intake of 8 g significantly increases calcium uptake in humans *

Chicory inulin
is a mixture of polysaccharides which are composed of fructose units linked together by $\beta(2-1)$ linkages. Almost every molecule is terminated by a glucose unit. The total number of fructose or glucose units of chicory inulin ranges mainly between 2 and 60.

Chicory Oligofructose
• is a mixture of oligosaccharides which are composed of fructose units linked together by $\beta(2-1)$ linkages. Part of these molecules are terminated by a glucose unit. The total number of fructose or glucose units (= Degree of Polymerisation or DP) of chicory oligofructose ranges mainly between 2 and 8.

* patent pending

Compositional Specifications

All values expressed on dry matter.
Analytical Methods : see our Technical Brochures.

Inulin	90 – 94 %
Glucose + Fructose	4 – 6 %
Sucrose	2 – 4 %
Dry Matter (d.m.)	97 ± 1.5 %
Carbohydrate content	> 99.5 %
Ash (sulphated)	< 0.2 %
Conductivity (20° Brix)	< 250 μ S
Heavy Metals	Pb, As each < 0.1 mg/kg Cd, Hg each < 0.01mg/kg
pH (10°Brix)	5.0 – 7.0

Microbiological Specifications

All values expressed on dry matter.
Analytical Methods : see our Technical Brochures.

Mesophilic bacteria – total count	max. 1000/g
yeasts	max. 20/g
moulds	max. 20/g
Thermophilic aerobic spores	max. 1000/g
Anaerobic H ₂ S producing thermophilic spores	max. 25/g
Enterobacteriaceae	absent in 1 g
Bacillus cereus	max. 100/g
Staphylococcus aureus	absent in 1 g
Escherichia coli	absent in 1 g
Clostridium perfringens	absent in 1 g
Clostridium botulinum	absent in 1 g
Salmonella	absent in 100 g
Shigella	absent in 10 g

DRAFT Active Food Ingredients • Alardstraat 1, B-3300 Tielt, Belgium • Tel +32 (0)16 601 301 • Fax +32 (0)16 601 308
info@orafti.com • www.orafti.com

ANEXO II - INULINA

Labelling

All values are average values expressed per 100 g commercial product.

Carbohydrates	8 (97 ¹⁾)	gluten	absent
Sugars	8	lactose	absent
Dietary Fibre ²⁾	89	Milk/meat/egg components	absent
Protein	absent	Seed/soy components	absent
Fat	absent	Insecticides, pesticides	absent
Vitamins and Minerals	Negligeable	Nuts, nut components	absent
Caloric value ³⁾	165 kcal/693 kJ	Colza	absent
Broteinheiten ⁴⁾	0.6	Other allergens	absent
		Enzymatic activity	absent
		Folate	absent

N.D. = Not Detectable N/A = Not Applicable

1) including dietary fibre

2) measured by AOAC Method 997.08

3) based on a caloric value of 1.5 kcal/g for pure inulin and oligofructose. To be adapted to local regulations.

4) in accordance with German regulations.

Other Informationsee also our Technical Brochures

Aspect	fine white powder
Behaviour	hygroscopic
Taste	slightly sweet (~25% comp. to sucrose), without aftertaste
Solubility in water	About 5% at room temperature
Wettability in water	Fairly good
Dispersability in water	Fairly good, requires stirring
Properties and Applications	See our Technical Brochures.
Particle Sizes	Max. 25% < 50µm – max. 20% > 125µm
Density	Approx. 600 +/- 50 g/l
Labelling - Ingredients List	«Enriched Inulin» or «inulin, oligofructose»
Safety	Safe. Not toxic. Not dangerous. Excessive consumption may cause laxative effects. Is, like other fine powders, when mixed with air and ignited, capable of causing an explosion.
Packaging	Paper bags 25 kg on pallets 1000 kg.
Optimal storage conditions	Cool and dry, in its original airtight packaging.
Maximum durability	See packaging (minimum 18 months upon delivery)
Transport conditions	According to document 'Transport Conditions'
Irradiation	Not irradiated
GMO	Not containing GMOs or GMO-derived components. Not produced using GMO-based technology.
Kosher	Certified, Orthodox Union
Halal	Certified, Halal Feed and Food Inspection Authority
Plant origin	Suitable for vegetarians & vegans
Produced by	ORAFI - address on first page

Represented by :

To the best of our knowledge, this information is reliable but should not be considered as a warranty of any kind.
Specifications might be subject to change without notice.

ANEXO III - INFORMATIVO BIORICH

01 de Junho de 2001
EBH/AWI/HP/Bb-12-IL

Aos Clientes da Chr Hansen

Taxonomia de *Bifidobacterium Bb-12*

Por mais de uma década, a Chr Hansen usou esta cepa para produtos, como: Bb-12, Bb-12.17^a, Trevis® e outros. Nós fomos os primeiros a perceber as excelentes propriedades dessa linhagem, mas também os primeiros a nos deparar com as dificuldades taxonômicas.

Inicialmente, erroneamente nós classificamos essa cepa como *Bifidobacterium bifidum*. Subseqüentemente, vimos que o nome *Bifidobacterium animalis* era mais correto, embora a cepa não fosse um *Bifidobacterium animalis* típico. Ela difere de *Bifidobacterium animalis* em vários aspectos, como descrito por Meile et al (1997), que sugeriram tratar-se de uma nova espécie: *Bifidobacterium lactis*. Este nome de espécie foi, mais tarde, validado na lista no. 62 na USB (1997). Muito tem sido discutido sobre o status de *Bifidobacterium lactis* desde a publicação e Meiles et al (1997). Baseado nesses resultados, o Comitê Internacional de Bacteriologia Sistemática (International Committee on Systematic Bacteriology) , Subcomitê de Taxonomia de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e organismos afins decidiu que *Bifidobacterium lactis* não pode ser reconhecido como espécie (Minutes, IJSEM, 2001).

Hoje, a taxonomia correta de Bifidobacterium Bb-12 é *Bifidobacterium animalis* (*Syn. Bifidobacterium lactis*), que é o nome que Chr Hansen utilizará nos certificados de identificação após 1 janeiro de 2001.

Indiferente a discussão taxonômica de anos, a cepa Bb-12 não mudou. A Chr Hansen determinou o genótipo da Bb-12 através dos mesmos controles de qualidade feitos para todas as linhagens em produção, desde que ela tenha sido colocada no mercado e nenhuma mudança no genótipo foi observada.

Eu espero que esta mudança de nome não lhes cause nenhum inconveniente.

Atenciosamente

Chr. Hansen A/S
Gerenciamento de Pesquisa e Desenvolvimento

Egon Bech Hansen
Grupo VP

Ref.: Meile et al. (1997) System. Appl. Microbiol. **20**, 57-64
List no. 62 (1997), Int. J. Syst. Bacteriol. **47**, 915-916
Cai et al. (2000) Microbiol. Immunol. **44**, 815-820
Minutes (2001) Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**, 259-261

ANEXO IV - FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL

ANÁLISE SENSORIAL DE IOGURTE																	
<p>Sexo: <input type="checkbox"/> Feminino <input type="checkbox"/> Masculino</p> <p>Idade: _____ anos</p> <p>Você está recebendo 4 amostras de iogurte. Por favor prove as amostras e assinale na escala abaixo a sua opinião sobre os produtos.</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; text-align: center; padding: 10px;"> <p>-----</p> <p><input type="checkbox"/> Gostei extremamente <input type="checkbox"/> Gostei muito <input type="checkbox"/> Gostei regularmente <input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Indiferente <input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Desgostei regularmente <input type="checkbox"/> Desgostei muito <input type="checkbox"/> Desgostei extremamente</p> </td> <td style="width: 25%; text-align: center; padding: 10px;"> <p>-----</p> <p><input type="checkbox"/> Gostei extremamente <input type="checkbox"/> Gostei muito <input type="checkbox"/> Gostei regularmente <input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Indiferente <input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Desgostei regularmente <input type="checkbox"/> Desgostei muito <input type="checkbox"/> Desgostei extremamente</p> </td> <td style="width: 25%; text-align: center; padding: 10px;"> <p>-----</p> <p><input type="checkbox"/> Gostei extremamente <input type="checkbox"/> Gostei muito <input type="checkbox"/> Gostei regularmente <input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Indiferente <input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Desgostei regularmente <input type="checkbox"/> Desgostei muito <input type="checkbox"/> Desgostei extremamente</p> </td> <td style="width: 25%; text-align: center; padding: 10px;"> <p>-----</p> <p><input type="checkbox"/> Gostei extremamente <input type="checkbox"/> Gostei muito <input type="checkbox"/> Gostei regularmente <input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Indiferente <input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Desgostei regularmente <input type="checkbox"/> Desgostei muito <input type="checkbox"/> Desgostei extremamente</p> </td> </tr> </table> <p>Você compraria este produto? Você compraria este produto? Você compraria este produto? Você compraria este produto?</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; text-align: center; padding: 10px;"> <p><input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Talvez</p> </td> <td style="width: 25%; text-align: center; padding: 10px;"> <p><input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Talvez</p> </td> <td style="width: 25%; text-align: center; padding: 10px;"> <p><input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Talvez</p> </td> <td style="width: 25%; text-align: center; padding: 10px;"> <p><input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Talvez</p> </td> </tr> </table> <p>Com que frequência você consome iogurte?</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; text-align: center; padding: 10px;"> <p><input type="checkbox"/> Frequentemente <input type="checkbox"/> Ocasionalmente</p> </td> <td style="width: 50%; text-align: center; padding: 10px;"> <p><input type="checkbox"/> Raramente <input type="checkbox"/> Nunca</p> </td> </tr> </table> <p>Comentários: _____</p> <p>_____</p>								<p>-----</p> <p><input type="checkbox"/> Gostei extremamente <input type="checkbox"/> Gostei muito <input type="checkbox"/> Gostei regularmente <input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Indiferente <input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Desgostei regularmente <input type="checkbox"/> Desgostei muito <input type="checkbox"/> Desgostei extremamente</p>	<p>-----</p> <p><input type="checkbox"/> Gostei extremamente <input type="checkbox"/> Gostei muito <input type="checkbox"/> Gostei regularmente <input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Indiferente <input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Desgostei regularmente <input type="checkbox"/> Desgostei muito <input type="checkbox"/> Desgostei extremamente</p>	<p>-----</p> <p><input type="checkbox"/> Gostei extremamente <input type="checkbox"/> Gostei muito <input type="checkbox"/> Gostei regularmente <input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Indiferente <input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Desgostei regularmente <input type="checkbox"/> Desgostei muito <input type="checkbox"/> Desgostei extremamente</p>	<p>-----</p> <p><input type="checkbox"/> Gostei extremamente <input type="checkbox"/> Gostei muito <input type="checkbox"/> Gostei regularmente <input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Indiferente <input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Desgostei regularmente <input type="checkbox"/> Desgostei muito <input type="checkbox"/> Desgostei extremamente</p>	<p><input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Talvez</p>	<p><input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Talvez</p>	<p><input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Talvez</p>	<p><input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Talvez</p>	<p><input type="checkbox"/> Frequentemente <input type="checkbox"/> Ocasionalmente</p>	<p><input type="checkbox"/> Raramente <input type="checkbox"/> Nunca</p>
<p>-----</p> <p><input type="checkbox"/> Gostei extremamente <input type="checkbox"/> Gostei muito <input type="checkbox"/> Gostei regularmente <input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Indiferente <input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Desgostei regularmente <input type="checkbox"/> Desgostei muito <input type="checkbox"/> Desgostei extremamente</p>	<p>-----</p> <p><input type="checkbox"/> Gostei extremamente <input type="checkbox"/> Gostei muito <input type="checkbox"/> Gostei regularmente <input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Indiferente <input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Desgostei regularmente <input type="checkbox"/> Desgostei muito <input type="checkbox"/> Desgostei extremamente</p>	<p>-----</p> <p><input type="checkbox"/> Gostei extremamente <input type="checkbox"/> Gostei muito <input type="checkbox"/> Gostei regularmente <input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Indiferente <input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Desgostei regularmente <input type="checkbox"/> Desgostei muito <input type="checkbox"/> Desgostei extremamente</p>	<p>-----</p> <p><input type="checkbox"/> Gostei extremamente <input type="checkbox"/> Gostei muito <input type="checkbox"/> Gostei regularmente <input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Indiferente <input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Desgostei regularmente <input type="checkbox"/> Desgostei muito <input type="checkbox"/> Desgostei extremamente</p>														
<p><input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Talvez</p>	<p><input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Talvez</p>	<p><input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Talvez</p>	<p><input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Talvez</p>														
<p><input type="checkbox"/> Frequentemente <input type="checkbox"/> Ocasionalmente</p>	<p><input type="checkbox"/> Raramente <input type="checkbox"/> Nunca</p>																