

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Otimização de pectina e farinha de acerola em leite fermentado
simbiótico e sobrevivência probiótica frente simulação de
condições gastrointestinais *in vitro***

Letícia Sgarbosa

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós Graduação em Alimentos e
Nutrição para obtenção de título de
Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciência dos
Alimentos.

Orientador(a): Prof(a) Dr(a) Katia
Sivieri.

Araraquara

2017

**Otimização de concentrações de pectina e farinha de acerola em
leite fermentado simbiótico e sobrevivência probiótica frente
simulação de condições gastrointestinais *in vitro***

Letícia Sgarbosa

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós Graduação em Alimentos e
Nutrição para obtenção de título de
Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciência dos
Alimentos.

Orientador(a): Prof(a) Dr(a) Katia
Sivieri.

Araraquara

2017

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S524o Sgarbosa, Letícia
Otimização de pectina e farinha de acerola em leite fermentado simbiótico e sobrevivência probiótica frente simulação de condições gastrointestinais *in vitro* / Letícia Sgarbosa. – Araraquara, 2017.
69 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de pesquisa em Ciências dos Alimentos.

Orientadora: Katia Sivieri.

1. Alimento funcional. 2. Lácteos. 3. Viabilidade gastrointestinal *in vitro*. I. Sivieri, Kátia, orient. I. Título.

CAPES: 50700006

AGRADECIMENTOS

À Prof(a). Dr(a). Katia Sivieri por toda orientação, dedicação e suporte.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
(CNPq).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP,
processo número 2015/13965-0.

Ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos.

RESUMO

Objetivo: desenvolver um leite fermentado com *Lactobacillus acidophilus*- LA-5, *Bifidobacterium lactis*- BB-12 e *Streptococcus thermophilus* com concentrações otimizadas de farinha de acerola e pectina. Verificar as características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas da formulação otimizada. Avaliar a viabilidade dos microrganismos e a sobrevivência dos microrganismos probióticos frente à simulação das condições gastrointestinais *in vitro*. **Métodos:** a farinha de acerola foi avaliada com relação ao conteúdo fenólico, atividade antioxidante e teor de fibras totais. Foi utilizada a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) para obtenção das concentrações otimizadas de farinha de acerola e pectina no leite fermentado. O leite fermentado otimizado foi avaliado durante 28 dias de armazenamento refrigerado (5 ± 1 °C) quanto às características físico-químicas: composição centesimal, pH, acidez Dornic, atividade antioxidante, sinérese, perfil de textura; às características sensoriais: sabor, impressão global e textura e às características microbiológicas: viabilidade dos microrganismos e sobrevivência gastrointestinal a partir de simulação de condições gastrointestinais *in vitro* dos microrganismos probióticos. **Resultados:** a farinha de acerola apresentou 52,50 mg EAG g⁻¹ de compostos fenólicos totais, 226,86 mmols ET g⁻¹ de atividade antioxidante segundo método de DPPH e 51mmol ET g⁻¹ por FRAP com 56,28 ± 0,19 % de fibras totais. Somente a farinha de acerola influenciou significativamente ($p < 0,05$) os atributos sensoriais do leite fermentado simbiótico. O modelo matemático desenvolvido foi eficaz para determinar a região otimizada das variáveis independentes. A formulação otimizada apresentou 18,42 ± 0,75 g 100 g⁻¹ de fibras dietéticas. Durante todo o período de estocagem não houve diferença estatística ($p < 0,05$) nos valores de pH comparando as formulações tratamento e controle. Em relação à acidez Dornic, verifica-se diferença estatística ($p < 0,05$) entre as formulações controle e tratamento. Embora declínio na atividade antioxidante do leite fermentado, observa-se expressiva atividade antioxidante mesmo ao final do período de armazenamento (1325,34 ± 39,95 mM eq. Trolox/g). Verifica-se aumento crescente nos valores de sinérese durante o tempo de estocagem dos leites fermentados. Somente para os parâmetros adesividade e gomosidade houve diferença estatística entre as formulações. O atributo sabor não apresentou diferença significativa ao longo dos 28 dias de armazenamento, diferentemente dos atributos impressão global e textura. A adição dos prebióticos reduziu significativamente ($p < 0,05$) a viabilidade dos microrganismos e a sobrevivência dos microrganismos probióticos após a simulação das condições gastrointestinais *in vitro*, com concentrações finais inferiores as da formulação controle ($p < 0,05$). **Conclusão:** a farinha de acerola apresentou elevada concentração de compostos fenólicos, atividade antioxidante e fibras, sendo a única variável que influenciou a aceitação sensorial do produto fermentado. O leite fermentado simbiótico apresentou alto conteúdo de fibras, elevada atividade antioxidante e boa aceitação sensorial durante 28 dias de armazenamento. A adição da farinha de acerola e da pectina não contribuiu com a viabilidade dos microrganismos e a sobrevivência probiótica frente ao processo de digestão gastrointestinal *in vitro*. A utilização de um subproduto agroindustrial é uma alternativa de aproveitamento e contribuição positiva ao meio ambiente.

Palavras-chave: Alimento funcional, lácteos, viabilidade gastrointestinal.

ABSTRACT

Objective: to develop fermented milk with *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium lactis* Bb-12 and *Streptococcus thermophilus* with optimized concentrations of acerola flour and pectin. The physical-chemical, sensorial and microbiological characteristics of the optimized formulation was verified. To assess the viability of microorganisms and the survival of probiotic microorganisms against the simulation of gastrointestinal conditions *in vitro*. **Methods:** acerola flour was evaluated for phenolic content, antioxidant activity and total fiber content. The Response Surface Methodology was used to obtain optimum concentrations of acerola flour and pectin in fermented milk. The optimized fermented milk was evaluated during 28 days of refrigerated storage (5 ± 1 °C) for the physico-chemical characteristics: centesimal composition, pH, Dornic acidity, antioxidant activity, syneresis, texture profile; sensory: taste, overall impression and texture and microbiological: viability of microorganisms and gastrointestinal survival from simulation of *in vitro* gastrointestinal conditions of probiotic microorganisms. **Results:** acerola flour presented 52.50 mg GAE g⁻¹ of total phenolic compounds, 226.86 mmols TE g⁻¹ of antioxidant activity according to DPPH method and 51 mmol TE g⁻¹ by FRAP with 56.28 ± 0.19% of total fibers. Only acerola flour significantly influenced ($p < 0.05$) the sensorial attributes of symbiotic fermented milk. The developed mathematical model was effective in determining the optimized region of the independent variables. The optimized formulation showed 18.42 ± 0.75 g 100 g⁻¹ dietary fiber. During the storage period there was no statistical difference ($p < 0.05$) in the pH values comparing the treatment and control formulations. In relation to Dornic acidity, there was a statistical difference ($p < 0.05$) between control and treatment formulations. Although a decline in the antioxidant activity of fermented milk, significant antioxidant activity is observed even at the end of the storage period (1325.34 ± 39.95 mM Trolox/g eq.). There is an increasing in syneresis values during the storage time of the fermented milks. Only for the adhesiveness and gum parameters, there was a statistical difference between the formulations. The flavor attribute did not present significant difference during the 28 days of storage, unlike the attributes global impression and texture. The addition of prebiotics significantly reduced ($p < 0.05$) the viability of microorganisms and the survival of probiotic microorganisms after simulation of gastrointestinal conditions *in vitro*, with final concentrations lower than those of the control formulation ($p < 0.05$). **Conclusion:** The acerola flour presented high concentration of phenolic compounds, antioxidant activity and fibers, being the only variable that influenced the sensorial acceptance of the fermented product. Symbiotic fermented milk presented high fiber content, high antioxidant activity and good sensory acceptance during 28 days of storage. The addition of acerola flour and pectin did not contribute to the viability of microorganisms and to the probiotic survival in the gastrointestinal digestion process *in vitro*. The use of an agroindustrial by-product is an alternative to the use and positive contribution to the environment.

Key words: Functional food, dairy, gastrointestinal viability.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ABTS⁺: ABTS radical cation

DF: dietary fibers

GAE: gallic acid equivalent

TE: trolox equivalent

TP: texture profile

SFM: synbiotic fermented milk

LISTA DE TABELA

Capítulo 1

Table 1. Experimental design for the preparation of the formulations of synbiotic fermented milk.....	55
Table 2. Estimation of the regression coefficients of the mathematical model and value of "p" for the flavor and global impression attributes.....	56
Table 3. Centesimal composition of the synbiotic fermented milk.....	57
Table 4. Average pH and acidity values (°D) for control and synbiotic fermented milk after 01, 07, 14, 21 and 28 days of storage at 5 °C during the storage period.....	58
Table 5. Average texture profile of control and synbiotic fermented milk after 01, 07, 14, 21 and 28 days of storage at 5 °C during the storage period.....	59
Table 6. Count of probiotic and non-probiotic viable cells (log ufc/ ml) in control and synbiotic fermented milk after 01, 14 and 28 days of storage at 5 °C during the storage period.....	59

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Fig 1. Response surfaces plots showing interaction effect of variables acerola flour and pectin on the flavor (A1, A2) and overall impression (B1, B2) of fermented symbiotic milk.....61

Fig 2. Intention to buy of synbiotic fermented milk after 01, 14 and 28 days of storage at 5 °C during the storage period. 1: Certainly would not buy; 2: I probably would not buy it; 3: Doubts whether to buy or not; 4: I would probably buy it; 5: I would certainly buy62

Fig 3. Survival of *L. acidophilus* La-5 (log cfu/ ml) in synbiotic and control fermented milk during storage for 01, 14 and 28 days (i, ii, iii, respectively) before (0 h) and during the exposure to *in vitro* simulated gastric (2 h) and enteric (4 and 6 h) conditions. ^{a,b} Different lowercase superscript letters in a row denote significant differences between trials ($p < 0.05$); ^{A,D} Different superscript capital letters in a column for each microorganism denote significant differences during storage period ($p < 0.05$). SFM: synbiotic fermented milk.....63

Fig 4. Survival of *L. acidophilus* La-5 (log cfu/ ml) in synbiotic and control fermented milk during storage for 01, 14 and 28 days (i, ii, iii, respectively) before (0 h) and during the exposure to *in vitro* simulated gastric (2 h) and enteric (4 and 6 h) conditions. ^{a,b} Different lowercase superscript letters in a row denote significant differences between trials ($p < 0.05$); ^{A,D} Different superscript capital letters in a column for each microorganism denote significant differences during storage period ($p < 0.05$). SFM: synbiotic fermented milk.....64

Fig 5. % survival of *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium animalis* Bb-12 and *Streptococcus thermophilus* under gastrointestinal conditions during the storage period. Values are expressed as mean \pm SD. ^{a,b} Different lowercase superscript letters in a row denote significant differences between trials ($p < 0.05$); ^{A-C} Different superscript capital letters in a column for each microorganism denote significant differences during storage period ($p < 0.05$).....65

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A. Teste de Aceitação e Intenção de Compra.....	66
Apêndice B. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Subproduto do processamento da acerola.....	14
1.2 Pectina	15
1.3 Probióticos.....	16
1.4 Leites fermentados como veículos de probióticos e prebióticos.....	21
1.5 Metodologia de Superfície de Resposta.....	22
CAPÍTULO 1.	30
1. Introduction	32
2. Materials and Methods	32
2.1. Production of acerola flour.....	32
2.2. Characterization of acerola flour.....	33
2.2.1. Phenolic compounds extraction	33
2.2.2. Total phenolic content.....	33
2.2.3. Antioxidant activity by FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) and DPPH• (sequestration of radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).....	34
2.2.4. Determination of Total Fiber	35
2.3. Fermented milk manufacture: synbiotic (SFM) and control	35
2.4. Experimental design.....	36
2.4.1. Sensory Analysis (Acceptance Test – “flavor” and “overall impression”).....	37
2.5. Evaluation of optimized SFM during cold storage	37
2.5.1 Fermented milk post-acidification.....	37
2.5.2. Extraction of Phenolic Compounds	37
2.5.3. Determining Total Phenolic Compounds and Antioxidant Activity....	38
2.5.4. Instrumental Texture Profile.....	38
2.5.5. Centesimal Composition	38

2.5.6. Microbial Analyses	39
2.5.7. Sensory Analysis (Acceptance Test - "Flavor", "Global Impression" and "Texture")	41
2.5.8. Statistical Analysis	41
3. Results and Discussion	41
3.1. Characterization of Acerola Flour	41
3.1.1. Total phenolic content and antioxidant activity of acerola flour	41
3.1.2. Determination of Total Fibers.....	42
3.2 Optimization of pectin and acerola flour concentration in SFM.....	42
3.3. Characterization of the optimized formulation during 28 days of storage at 5°C.	43
3.3.1.....	43
3.3.2. Fermented milk post-acidification.....	44
3.3.3. SFM Antioxidant Activity	44
3.3.5. Texture profile	45
3.3.6. Sensory analysis.....	45
3.3.7. Viability and survival of <i>L. acidophilus</i> La-5 and <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 against a simulation of gastrointestinal conditions <i>in vitro</i>	46
4. Conclusion.....	48
References	48
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 Subproduto do processamento da acerola

A acerola (*Malpighia glabra* L., *Malpighia punicifolia* L. ou *Malpighia emarginata* DC.) é uma planta de fácil propagação e elevada resistência. A partir da descoberta dos elevados teores de ácido ascórbico, antioxidantes e antocianina, aliado ao baixo valor calórico, despertou-se o interesse em sua potencialidade econômica (1,2). Além de fonte de fibras, a acerola possui elevada concentração das vitaminas A, B1, B2, B3 e C; e dos minerais ferro, cálcio e fósforo (3,4). Apresenta elevada quantidade de carotenoides, especialmente o β -caroteno, tornando-a um fruto rico em antioxidantes com capacidade preventiva a doenças crônicas não transmissíveis como cânceres e doenças cardiovasculares (5, 6,7).

Poucos países cultivam a acerola comercialmente, sendo o Brasil um deles. Inicialmente a aceroleira foi introduzida em Pernambuco se difundindo para o Nordeste e outras regiões do país. Atualmente, todos os estados brasileiros a cultivam, exceto a Região Sul durante o inverno. A maior parte da produção é destinada a exportação como polpa, frutos congelados e suco integral (8,9,3).

A produção de acerola no Brasil é de aproximadamente 150 mil toneladas de frutos, produzidos principalmente pela Região Nordeste. Parte considerável dessa produção não é aproveitada devido à alta perecibilidade dos frutos, estimando-se em 40% as perdas pós-colheita. No mercado interno, a acerola produzida é distribuída entre a indústria (46%), atacado (28%), varejo (19%), bem como cooperativas e outras associações de produtores (7%). Durante o processamento da acerola para produção de polpa ou suco, a prensagem das

frutas, produz um resíduo fibroso (bagaço), que muitas vezes é descartado, gerando um grande volume de resíduos orgânicos (10,11).

O subproduto do processamento da acerola é uma fonte alternativa de fibras dietéticas, contribuindo na prevenção de doenças gastrointestinais e cardiovasculares (12,13). Normalmente, o bagaço de acerola torna-se um problema para indústria, por não possuir um destino específico, além de ser rico em matéria orgânica, também é altamente poluente. Além disso, seu tratamento para o descarte demanda altos custos operacionais. Dessa forma, o aproveitamento do subproduto da acerola contribui com o meio ambiente, além de ser uma estratégia de enriquecimento e desenvolvimento de novos produtos funcionais (14).

1.2 Pectina

Pectinas são membros de uma família de polissacarídeos complexos compostas principalmente por ácido α -D-galacturônicos e monossacarídeos, sendo encontrada na parede celular de plantas e tecidos. A proporção de grupos de ácidos galacturônicos esterificados a partir de metanol estipula seu grau de esterificação. Com isso, elas são divididas entre baixo e alto grau de esterificação (15).

Por apresentar propriedades espessantes, geleificantes e estabilizantes, a pectina é largamente utilizada pela indústria de alimentos, especialmente em bebidas lácteas acidificadas. Possui grande capacidade de retenção de água resultando na formação de géis. Em geral, a pectina é obtida a partir de resíduos vegetais (polpa de maçã ou cascas de frutas cítricas) ou através do açúcar da

polpa da beterraba. Sua extração é realizada por métodos químicos ou enzimáticos (16,17,18,19).

Os principais benefícios da pectina envolvem sua característica de fibra solúvel, portanto, vem sendo apontada com capacidade potencialmente prebiótica (15). Dessa forma, ela não é absorvida no intestino delgado e ao chegar ao intestino grosso, é fermentada pelas bactérias intestinais, podendo promover efeitos fisiológicos benéficos ao organismo. A pectina pode ligar-se as micelas dos sais biliares e impedindo sua reabsorção, conseqüentemente, pode contribuir na redução dos níveis séricos de colesterol. Devido a sua alta capacidade de retenção hídrica, a pectina pode auxiliar contra diarreia e constipação, também é capaz de se ligar a cátions favorecendo a excreção de elementos tóxicos pela urina (20). Sendo altamente fermentável, contribui com o aumento do volume fecal; pode desempenhar efeito protetor a microrganismos probióticos durante seu armazenamento, inclusive a baixas temperaturas (21,17).

1.3 Probióticos

Define-se probióticos como microrganismos viáveis, quando administrados em quantidades adequadas afetam benéficamente a saúde do hospedeiro (22). Para uma cultura ser considerada probiótica, ela deve habitar naturalmente no intestino humano, sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal e desempenhar efeitos positivos ao hospedeiro. A cepa deve ser resistente aos sais biliares, ao pH gástrico, enzimas intestinais e metabólitos tóxicos formados durante o processo da digestão (23).

De acordo com a ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária a alegação de propriedade funcional deve ser comprovada pela empresa a partir da

comprovação da segurança e da eficácia desempenhada pelo produto. A eficácia deve ser comprovada por meio de embasamentos teóricos, estudos clínicos e epidemiológicos. A viabilidade deve ser condizente com a quantidade mínima do microrganismo necessária para que os efeitos funcionais sejam notados (24).

Comercialmente as bactérias probióticas utilizadas com maior frequência em formulações alimentícias pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Os lactobacilos são bactérias Gram-positivas, produtoras de ácido láctico. Fazem-se presentes na microbiota intestinal humana, desempenhando importante função protetora contra a proliferação de agentes patogênicos. A produção de ácido láctico reduz o pH intestinal, resultando em um ambiente desfavorável para o crescimento de organismos patogênicos (25,26).

A cepa probiótica *Lactobacillus acidophilus* LA-5 é uma das mais estudadas, utilizada em diversos produtos lácteos (27). Dentre seus benefícios, destacam-se a capacidade de modulação da microbiota intestinal, efeito hipocolesterolêmico, proteção contra diarreia infecciosa e alívio nos sintomas clínicos de dermatite atópica (28,29,30) .

As bifidobactérias são microrganismos Gram-positivos, isentos da formação de esporos e de flagelos. São anaeróbios e podem apresentar-se como bacilos curtos e curvados, a bacilos bifurcados (31,32). Essas bactérias promovem inúmeros benefícios a seus hospedeiros, como a produção de vitaminas, efeito imunomodulador, atividade hipocolesterolêmica e inibição de patógenos (33,34). Também são capazes de promover a saúde intestinal, produzindo compostos inibidores de microrganismos patogênicos (35). Além de moduladores da microbiota intestinal, podendo prevenir diarreias e doenças inflamatórias intestinais (36).

Bifidobacterium animalis, subsp. *lactis* (*B. lactis*) tem sido amplamente utilizado como ingrediente ativo de produtos lácteos funcionais (37,38). Esta espécie apresenta características tecnológicas desejáveis, como tolerância ao oxigênio, resistência à bile e a ácidos, e capacidade para se desenvolver em meios à base de leite (34,39).

Para que as bactérias probióticas exerçam seus benefícios, elas necessitam manterem-se viáveis, após a passagem pelo trato gastrointestinal e durante todo seu tempo de armazenamento (40,41). Fatores como o teor de umidade, acidez, pH, metabólitos inibidores (ácidos orgânicos, bacteriocinas) podem afetar de forma negativa a viabilidade dos probióticos nas matrizes alimentares (38). Assim, os ingredientes utilizados na formulação de um produto podem influenciar positivamente ou negativamente os efeitos funcionais probióticos.

Para se avaliar a viabilidade dos probióticos durante a digestão, atualmente há uma série de modelos *in vitro* sendo utilizados para este tipo de estudo (42). Nestes modelos há a possibilidade de simular a saliva (amilase), o estômago (controle de pH e pepsina) e o duodeno (pancreatina e sais biliares). Failla e Chitchumroonchokchai (2005) e Verruck et al. (2015) apontam a simplicidade e rapidez de metodologias *in vitro*, contrapondo-se aos ensaios *in vivo*, onde esses demandam altos custos e longos períodos para a realização, além da variabilidade individual. Os ensaios *in vitro* são capazes de simular condições gastrointestinais similares à digestão humana (42,43).

Silva et al (2015) verificaram uma diminuição de 3,82 ciclos logarítmicos do *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1 em sorvete de leite de cabra, após a passagem em modelo *in vitro* simulando as condições

gastrointestinais (44). Rolim et al. (2015) não verificaram alterações significativas de ciclos logarítmicos de células viáveis de *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 em queijo após simulação de condições gastrointestinais em ensaio *in vitro* (45). Oliveira et al. (2014), avaliaram a sobrevivência dos probióticos *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* 01 e *Bifidobacterium lactis* BB-12 incorporados ao queijo coalho em sistema gastrointestinal *in vitro*. Verificou-se diminuição na contagem de células viáveis em todas as cepas probióticas. Inicialmente elas apresentaram 7-8 log UFC/g e após o sistema *in vitro* 5-6 log UFC/g. *B. lactis* BB-12 mostrou-se com contagem superior a 5,5 log UFC/g após a digestão gastrointestinal simulada em modelo *in vitro* (46).

A administração de probióticos combinados com substâncias prebióticas como a inulina, frutooligossacarídeos, galactooligossacarídeos, pectina e lactulose é de grande interesse (41). Sabe-se que a adição de prebióticos a produtos lácteos probióticos fornecem benefícios adicionais a fisiologia do organismo (47), podendo desempenhar efeito protetor às bactérias probióticas contribuindo com sua sobrevivência, proliferação e atividade desses microrganismos nas matrizes alimentares durante a vida de prateleira, além de contribuir com a passagem dos probióticos pelo trato gastrointestinal aumentando sua resistência a sucos gástrico e entérico (48,49).

A relação entre a combinação de probióticos com prebióticos classifica-se como simbiótica e tem sido bastante utilizada em produtos alimentares a fim de aproveitar seus efeitos sinérgicos (50,51). A adição de prebióticos a lácteos tem sido relacionada também, a promoção da saúde intestinal e melhora na absorção de cálcio e outros minerais (52,37).

Dias et al. (2012) produziram uma bebida láctea fermentada a partir de *L. acidophilus* LA-5 e *B. lactis* BB-12 combinada com polpa de yacon. Verificou-se que o sinergismo entre frutooligossacarídeos da polpa do yacon e o *L. acidophilus* LA-5 e o *B. bifidum* BB-12 resultou na contagem satisfatória dos probióticos até os 21 dias de estocagem (53). Oliveira et al., (2012) estudaram o efeito da adição de inulina em leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus* TA040 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BL 04. Observou-se que a adição da inulina reduziu o tempo de fermentação, aumentou os níveis de ácidos láctico e acético, e compostos voláteis. As concentrações finais de ambos os microrganismos foram maiores em relação as suas respectivas culturas puras, mostrando um efeito simbiótico positivo entre probióticos e prebióticos (34).

Bedani, Rossi e Saad (2013) avaliaram o efeito da adição de inulina e farinha de okara em um produto fermentado de soja contendo *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium lactis* BB-12. Verificou-se que adição de prebióticos não afetou a viabilidade dos microrganismos probióticos. Entretanto, comparando uma cultura fresca de *B. lactis* BB-12 a cultura de *B. lactis* BB-12 na bebida fermentada, verificou-se melhora na sobrevivência do microrganismo probiótico agregado à bebida fermentada em seu primeiro dia de armazenamento (47).

Os probióticos podem ser adicionados a diversas matrizes alimentares. No entanto, destaca-se a adição desses microrganismos em produtos lácteos, como iogurtes (37), sorvetes (44); bebidas lácteas fermentadas (54,55) queijos como *petit-suisse* (56), queijo prato (57), queijo fresco cremoso (58) e queijo tipo minas frescal (59).

1.4 Leites fermentados como veículos de probióticos e prebióticos

Dentre os principais alimentos probióticos no mercado, destacam-se os produtos lácteos, especialmente por conta da capacidade tampão do leite que contribui com a viabilidade do probiótico durante sua fermentação e armazenamento. Dos produtos lácteos probióticos, os mais comuns são iogurtes e leites fermentados (55).

O leite fermentado tornou-se bastante conhecido devido aos seus benefícios à saúde e suas propriedades terapêuticas, já o iogurte foi inicialmente aceito como uma boa fonte de cálcio (60). De acordo com a Instrução Normativa nº46, de 23 de outubro de 2007, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, define-se leite fermentado o produto adicionado ou não de outras substâncias alimentícias, obtido por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium spp.*, *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* e/ou outras bactérias ácido lácticas que por sua atividade contribuem para a determinação das características do produto final. Esses microrganismos devem estar viáveis, ativos e abundantes no produto final durante todo o período de estocagem (61).

Ainda de acordo com a Instrução Normativa nº46, de 23 de outubro de 2007, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento o iogurte é o produto obtido pela fermentação realizada com cultivos de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, podendo acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-lácticas que contribuam com as características finais do produto (61). Em contrapartida à legislação brasileira, o *Code of Practice for the Composition and Labelling of Yogurt*

(62) define como iogurte o produto lácteo obtido a partir da fermentação pelas culturas de *Lactobacillus bulgarius* e/ou *Streptococcus thermophilus*.

Nas matrizes alimentares em que estão adicionadas, as bactérias probióticas podem desenvolver padrões de sabor e textura distintos; fazendo com que cada mistura de culturas microbianas resulte em um produto específico (55). Dentre os gêneros utilizados, destacam-se as cepas de *Bifidobacterium* spp como um dos probióticos de maior utilização em produtos lácteos funcionais (43).

1.5 Metodologia de Superfície de Resposta

A Metodologia de Superfície de Resposta engloba técnicas que visam a otimização, verificando a influência de variáveis independentes frente variáveis de resposta. Por meio da identificação e quantificação dessas variáveis independentes, condições otimizadas são estipuladas utilizando-se de modelos preditivos. Dessa forma, a otimização objetiva o aprimoramento máximo de sistemas, processos ou desenvolvimento de produtos (63,64).

Utilizando-se de técnicas matemáticas e estatísticas, a Metodologia de Superfície de Resposta basea-se na adequação de equações polinomiais formadas a partir dos dados experimentais. A partir dessas equações, é possível prever estatisticamente o comportamento das variáveis de resposta. Sendo assim, trata-se de uma metodologia muito útil em situações onde diversas variáveis influenciam a resposta de interesse. Para desenvolver a Metodologia de Superfície de Resposta, inicialmente é necessário definir o desenho experimental a ser utilizado, podendo ser aplicado um modelo linear ou quadrático de acordo com os dados experimentais (65).

Essa metodologia tem sido utilizada largamente pela indústria,

especialmente pela indústria alimentícia para o desenvolvimento de novos produtos, onde a adição de ingredientes ou condições de processos tornam-se um desafio (66,67). Visando substituir a adição de água em formulações de pães por suco de acerola e manga de maneira otimizada, Zambelli et al. (2014) utilizaram o delineamento composto central rotacional a fim de obter as concentrações ótimas de cada variável independente, capaz de contribuir com uma formulação otimizada (68). A fim de obter uma formulação otimizada de um iogurte adicionado de oligofrutose, inulina e polpa de açaí, Espindula e Cardoso (2010) fizeram uso da Metodologia de Superfície de Resposta (69). Silva et al. (2014) utilizaram da Metodologia de Superfície de Resposta para otimizar o pré tratamento do bagaço da laranja (67). Utilizando-se um delineamento composto central rotacional, Balke et al. (2014) obtiveram leite ovino em pó por meio de secagem por Spray Dryer em condições otimizadas (70).

REFERÊNCIAS

1. Petinari RA, Tarsitano MAA. Análise econômica da produção de acerola para mesa, em Jales-SP: um estudo de caso. Rev Bras Frutic. 2002;24(2):411-415.
2. Ritzinger R, Ritzinger CHSP. Cultivo Tropical de Fruteiras: acerola. Inf Agrop. 2011 Set/Out;32(264):17-25.
3. Adriano E, Leonel S. Fenologia da aceroleira cv. Olivier em Junqueirópolis-SP. Rev Bras Frutic. 2012;34(2):469-474.
4. Pelegrine DHG, Andrade MS, Nunes SH. Elaboração de geleias a partir de misturas binárias compostas pelas polpas de laranja e acerola. Ciênc Nat. 2015;37(1):124-129.
5. Matioli G, Rodriguez-Amaya DB. Microencapsulação do licopeno com ciclodextrinas. Ciên. Tecnol. Aliment. 2003;23:102-105.

6. Agostini-Costa T, Vieira RF. Frutas nativas do cerrado: qualidade nutricional e sabor peculiar. Toda Fruta; 2004.
7. Silva MLS, Menezes CC, Portela JVF, Alencar PEBS, Carneiro TB. Teor de carotenoides em polpas de acerola congeladas. Rev Verde. 2013;8(1):170-173.
8. Codevasf. Censo frutícola da Codevasf 2001. Brasília (DF); 2003.
9. Bliska FMM, Leite RSSF. Aspectos econômicos e de mercado. In: São José AR, Alves RE. Acerola no Brasil: produção e mercado. Vitória da Conquista: UESB; 1995:107-123.
10. Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária - Embrapa Mandioca e Fruticultura. Acerola. Cruz das Almas (BA); 2011.
11. Sobrinho ISB. Propriedades nutricionais e funcionais de resíduos de abacaxi, acerola e cajá oriundos da indústria produtora de polpas [dissertação]. Itapetinga (BA): Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia; 2014.
12. Braga ACD, Lima MS, Azevedo LC, Ramos MEC. Caracterização do resíduo de acerola (*malpighia glabra l.*), extraído do decanter no processo de clarificação do suco. V Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica (CONNEPI); 2010: Maceió (AL).
13. Pereira FM, Carvalho CA, Nachtigal JC. Século XXI: nova cultivar de goiabeira de dupla finalidade. Brás Frutic 2003;25(3):498-500.
14. Marques TR. Aproveitamento tecnológico de resíduo de acerola: farinhas e barras de cereais [dissertação]. Lavras (MG): Universidade Federal de Lavras; 2013.
15. Naqash F, Masoodi FA, Rather SA, Wani SM, Gani A. Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin – a review. Carbohydr Polym. 2017;168:227-239.
16. Coelho, MG. Pectina: características e aplicações em alimentos [Trabalho Acadêmico]. Pelotas (RS): Universidade Federal de Pelotas; 2008.
17. Maxwell EG, Belshaw NJ, Waldron KW, Morris VJ. Pectin: an emerging new bioactive food polysaccharide. Trends Food Sci Technol. 2012;24:64-73.

18. Munarin F, Tanzi MC, Petrini P. Advances in biomedical applications of pectin gels. *Int J Biol Macrom.* 2012;51:681-689.
19. Morris VJ, Belshaw NJ, Waldron KW, Maxwell EG. The bioactivity of modified pectin fragments. *Bioact Carbohydr Diet Fib.* 2013;1:21-37.
20. Parkar SG, Redgate EL, Wibisono R, Luo X, Koh ETH, Schröder R. Gut health benefits of kiwifruit pectins: comparison with commercial functional polysaccharides. *J Funct Foods.* 2010;2:210-218.
21. Nazarro F, Fratianni F, Nicolaus B, Poli A, Orlando P. The prebiotic source influences the growth, biochemical features and survival under simulated gastrointestinal conditions of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Anaerobe.* 2012;18(3):280-285.
22. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. Expert consensus document: the international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014;11:506-514.
23. Criscio T, Fratianni A, Mignogna R, Cinquanta L, Coppola R, Sorrentino E, Panfili G. Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams. *J Dairy Sci.* 2010;93:4555-4564.
24. Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lista de alegações de propriedade funcional ou saúde. Brasília (DF); 2016.
25. Vondruskova H, Slamova R, Trckova, M, Zraly Z, Pavlik, I. Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: a review. *Vet Med.* 2010;55(5):199-224.
26. Senanayake SA, Fernando S, Bamunuarachchi A, Arsekularatne M. Application of *Lactobacillus acidophilus* (LA 5) strain in fruit-based ice cream. *Food Sci Nutr.* 2013;1(6):428– 431.
27. Gebara C, Ribeiro MCE, Chaves KS, Gandara AL, Gigante ML. Effectiveness of different methodologies for the selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* La5 from yoghurt and Prato cheese. *Food Sci Technol.* 2015;64:508–513.
28. Savard P, Lamarche B, Paradis ME, Thiboutot H, Laurin E, Roy D. Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. *Int J Food Microbiol.* 2011;149:50-57.
29. Weichert S, Schrotten H, Adam R. The role of prebiotics and probiotics in prevention and treatment of childhood infectious diseases. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31:859–862.

30. Bedani R, Rossi EA, Saad SMI. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium animalis* BB-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiol.* 2013;34:382-389.
31. Morais MB DE, Jacob CMA. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. *J Pediatr.* 2006;82(5):189-197.
32. Nogueira JCR, Gonçalves MCR. Probióticos: revisão da literatura. *Rev Bras Ciênc Saúde.* 2011;15(4):487-492.
33. Ejtahed HS, Mohtadi-Nia J, Homayouni-Rad A, Niafar M., Asghari-Jafarabadi M, Mofid V. Effect of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. *J Dairy Sci.* 2011;94:3288–3294.
34. Oliveira, RPS, Perego P, Oliveira MN, Coverti A. Growth, organic acids profile and sugar metabolism of *Bifidobacterium lactis* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*: the inulin effect. *Food Res Int.* 2012;48:21-27.
35. OMGE - Organização Mundial de Gastroenterologia. Guias práticas: Probióticos e Prebióticos. 2008.
36. Martinez RCR, Cardarelli HR, Borst W, Albrecht S, Schols H, Gutiérrez OP, et al. Effect of galactooligosaccharides and *Bifidobacterium animalis* BB-12 on growth of *Lactobacillus amylovorus* DSM 16698, microbial community structure, and metabolite production in an *in vitro* colonic model set up with human or pig microbiota. *FEMS Microbiol Ecol.* 2013;84:110-123.
37. Gonzalez NJ, Adhikari K, Sancho-Madriz MF. Sensory characteristics of peach-flavored yogurt drinks containing prebiotics and synbiotics. *Food Sci Technol.* 2011;44:158-163.
38. Meira QGS, Magnani M, Júnior FCM, Queiroga RCRE, Madruga MS, Gullón B, et al. Effects of added *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* probiotics on the quality characteristics of goat ricotta and their survival under simulated gastrointestinal conditions. *Food Res Int.* 2015;76:828-838.
39. Chen Q, Ruan H, Zhu D, He G. Isolation and characterization of an oxygen acid and bile resistente *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*. *J Sci Food Agric.* 2010;90:1340-1346.

40. Jensen H, Grimmer S, Naterstad K, Axelsson L. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2012;153:216-222.
41. Klu YAK, Chen J. Effect of peanut butter matrices on the fate of probiotics during simulated gastrointestinal passage. *Food Sci Technol.* 2015;62:983-988.
42. Failla ML, Chitchumroonchokchai C. In vitro models as tools for screening the relative bioavailabilities of provitamin a carotenoids in foods. In: *Harvest plus technical monograph 3*, Washington, DC: International Food Policy Research Institute and International Center of Tropical Agriculture; 2005.
43. Verruck S, Prudêncio ES, Vieira CRW, Amante ER, Amboni RDMC. The buffalo minas frescal cheese as a protective matrix of *Bifidobacterium* BB-12 under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *Food Sci Technol.* 2015;63:1179-1183.
44. Silva PDL, Bezerra MF, Santos KMO, Correia RTP. Potentially probiotic ice cream from goat's milk: Characterization and cell viability during processing, storage and simulated gastrointestinal conditions. *Food Sci Technol.* 2015;62:452-457.
45. Oliveira MEG, Garcia EF, Oliveira CEV, Gomes AMP, Pintado MME, Madureira ARMF, Conceição ML, Queiroga RCRE, Souza EL. Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): Survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. *Food Res Int.* 2014;64:241-247.
46. Rodrigues F, Rolim L, Maria K, Magnani M, Elieidy M, Oliveira G De, et al. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese. *LWT - Food Sci Technol.* 2015;63:807-13.
47. Bedani R, Vieira ADS, Rossi EA, Saad SMI. Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to *in vitro* gastrointestinal stress in synbiotic soy yoghurt with okara during storage. *LWT - Food Sci Technol.* 2014;55(2):436-43.
48. Hernandez-Hernandez O, Muthaiyan A, Moreno FJ, Montilla A, Sanz M. L, Ricke SC. Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. *Food Microbiol.* 2012;30:355-361.
49. Casarotti SN, Carneiro BM, Penna ALB. Evaluation of the effect of supplementing fermented milk with quinoa flour on probiotic activity. *J Dairy Sci [Internet]. Elsevier;* 2014;97(10):6027-35.

50. Allgeyer LC, Miller MJ, Lee S. Sensory and microbiological quality of yogurt drinks with prebiotics and probiotics. J Dairy Sci [Internet]. Elsevier; 2010;93(10):4471–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2009-2582>
51. Valero-Cases E, Frutos MJ. Effect of different types of encapsulation on the survival of *Lactobacillus plantarum* during storage with inulin and *in vitro* digestion. Food Sci Technol. 2015;64:824-828.
52. Scholz-Ahrens KE, Ade P, Marten B, Weber P, Timm W, Açil Y., et al. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. J Nutr. 2007;137:838-846.
53. Dias MLLA. Bebida fermentada simbiótica: características físico-químicas, sensoriais e viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* [dissertação] Recife (PE): Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco; 2012.
54. Burkert JFM, Fonseca RAS, Moraes JO, Sganzerla J, Kalil SJ, Burkert CA. Aceitação sensorial de bebidas lácteas potencialmente simbióticas. Braz. J Food Technol. 2012;15(4):1-8.
55. Mani-lópez E, Palou E, López-Malo, A. Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. J Dairy Sci. 2014;97:2578–2590.
56. Maruyama LY, Cardarelli HR, Buriti FCA, Saad SMI. Textura instrumental de queijo *petit-suisse* potencialmente probiótico: influência de diferentes combinações de gomas. Ciênc Tecnol Aliment. 2006;26(2):386-393.
57. Cichoski AJ, Cunico CDI, Luccio M, Zitkoski JL, Carvalho RT. Efeito da adição de probióticos sobre as características de queijo prato com reduzido teor de gordura fabricado com fibras e lactato de potássio. Ciênc. Tecnol. Aliment. 2008;28(1):214-219.
58. Buriti FC. A. Desenvolvimento de queijo fresco cremoso simbiótico [Dissertação]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2005.
59. Ribeiro EP, Simões LG, Jurkiewicz CH. Desenvolvimento de queijo minas frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzido a partir de retentados de ultrafiltração. Ciênc Tecnol Aliment. 2009;29(1):9-23.
60. Sumarmono J, Sulistyowati M, Soenarto. Fatty acids profiles of fresh milk, yogurt and concentrated yogurt from peranakan etawah goat milk. Procedia Food Sci. 2015;3:216-222.
61. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº43, de 23 de Outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. 2007.

62. Industry D, Industry D, Uk D, Federation PT. Code of practice for the composition and labelling. 2015;(March 1986):4–8.
63. Torriani S, Gardini F, Guerzoni ME, Dellaglio F. Use of Response Surface Methodology to Evaluate some Variables Affecting the Growth and Acidification Characteristics of Yoghurt Cultures. *Int. Dairy J.* 1996;6:625–636.
64. Pandey SM, Mishra HN. Optimization of the prebiotic & probiotic concentration and incubation temperature for the preparation of synbiotic soy yoghurt using response surface methodology. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;62(1):458–467. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.003>.
65. Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escalera A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta.* 2008;76:965–77.
66. Arteaga GE, Li-Chan E, Vazquez-Arteaga, Nakai S. Systematic experimental designs for product formula optimization. *Trends Food Sci Technol.* 1994, 5:243-254.
67. Silva CEF, Gois GNSB, Silva ICC, Silva LMO, Almeida RMRG, Abud, AKS. Avaliação do Potencial de Uso do Bagaço de Laranja Visando a Produção de Etanol 2G. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ); 2014; Florianópolis (SC).
68. Zambelli RA, Araújo MMN, Melo SCP, Pinto LIF, Melo PEF, Pontes DF. Inovação tecnológica no processamento de pães: otimização da incorporação de suco de acerola e manga. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ); 2014; Florianópolis (SC).
69. Espindula NC, Cardoso CE. Formulação de um iogurte suplementado com compostos probióticos, prebióticos e polpa de açaí. *Rev TECCEN.* 2010;3(1): 23-33.
70. Balke M, Kilian J, Steffens C, Soares MBA, Steffens J. Avaliação do Processo de Obtenção de leite em pó pelo processo de secagem em spray dryer. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ) 2014; Florianópolis (SC).

CAPÍTULO 1.

Otimização de pectina e farinha de acerola em potencial leite fermentado simbiótico e sobrevivência dos microrganismos probióticos frente à simulação das condições gastrointestinais

Artigo enviado para publicação em junho de 2017 para a revista

LWT – Food Science and Technology

**OPTIMIZATION OF PECTIN AND ACEROLA FLOUR FOR THE DEVELOP OF
POTENTIAL SYNBIOTIC FERMENTED MILK AND PROBIOTIC SURVIVAL
UNDER *IN VITRO* SIMULATED GASTROINTESTINAL CONDITIONS**

Letícia Sgarbosa^a, Katia Sivieri^a

^aUNESP – Univ. Estadual Paulista, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Department of Food and Nutrition, Rodovia Araraquara Jaú/Km 1 s/n, 14800-903 - Araraquara- SP, Brazil

*Corresponding author:

Katia Sivieri, Department of Food and Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, UNESP. Rodovia Araraquara Jaú/Km 1 s/n, 14800-903 - Araraquara- SP, Brazil

Telefone No.: +55 16 3301 6931. E-mail: sivierik@fcar.unesp.br

Abstract

During the processing of acerola a pollutant fibrous residue is generated, however, the residue is rich in fibers and bioactive compounds. The objective of study was to develop a potential probiotic fermented milk with acerola flour and pectin using surface response methodology (MSR), verify the physicochemical characteristics of fermented synbiotic milk during the 28 days refrigerated storage (5 ± 1 °C), to evaluate the sensorial acceptance of the formulation and the survival of gastrointestinal conditions *in vitro*. Only acerola flour significantly influenced ($p < 0.05$) the sensory attributes of synbiotic fermented milk. The optimized formulation showed 18.42 ± 0.75 g 100 g/dietary fiber. There is significant antioxidant activity even at 28 days of storage (1325.34 ± 39.95 mM Trolox / g eq.). During 28 days of storage the flavor attribute showed no significant difference. The addition of prebiotics significantly reduced ($p < 0.05$) the viability of microorganisms and the survival of probiotic microorganisms after the simulation of gastrointestinal conditions *in vitro*. It was concluded that the acerola flour presented a high concentration of phenolic compounds, antioxidant activity and fibers, being the only variable that influences the sensorial acceptance of the product. Potential fermented synbiotic milk showed high fiber content and expressive antioxidant activity. The addition of acerola flour and pectin did not contribute to the viability of microorganisms and survival in the gastrointestinal digestion process *in vitro* during the 28 days of storage.

Keywords: functional foods, dairy, gastrointestinal viability.

1. Introduction

During pulp or juice processing, fruit pressing produces a fibrous residue (bagasse), which is often discarded, generating a large volume of organic waste (Sobrinho, 2014). The acerola flour is an alternative source of dietary fiber, contributing to the prevention of gastrointestinal and cardiovascular diseases (Braga, Lima, Azevedo, & Ramos, 2010). Pectin is a complex polysaccharide containing α -d-galacturonic acid residues, being found in the cell wall of fruits and vegetables with capacity prebiotic (Nazzaro, Fratianni, Nicolaus, Poli, & Orlando, 2012).

Thus, prebiotic ingredients may have a protective effect on probiotic bacteria, which may contribute to the survival and activity of these microorganisms in the alimentary matrix during shelf life, besides helping to maintain the viability of probiotics after passage through the gastrointestinal tract (Bedani et al., 2014; Costa, Valença, Garruti, & Freitas, 2014). In this context, the present work aimed at the development of a potential synbiotic fermented milk formulation using MSR and the investigation of the effect of acerola and pectin flour on the viability of *L. acidophilus* La-5 and *B. animalis* BB-12 under simulation of conditions gastrointestinal *in vitro*.

2. Materials and Methods

2.1. Production of acerola flour

Ripe acerola (*M. emarginata* D.C.), cabocla variety, São Paulo region cultivation, were purchased from a frozen distributor (Pura Polpa, Araraquara, Brazil). The dried acerola by-product was produced in laboratorial scale. For

this purpose, sanitization and bleaching of the fresh fruits was conducted, followed by crushing in a sieve (0.5 mm mesh), and the pulp was separate of the skin and seeds. The dried skin, seeds and residues of pulp were dried in an oven at 60 °C for 24 h. Subsequently, the dry by-product was treated in a blender (1 min.) and sieved (0.5 mm mesh) in order to obtain an acerola flour. The acerola flour was then packed hermetically and stored under refrigeration at $5 \pm 1^\circ \text{C}$.

2.2. Characterization of acerola flour

2.2.1. Phenolic compounds extraction

1 g of acerola flour were extracted in triplicates with 20 ml of aqueous methanol (methanol: water, 70: 30 v/v), for one hour at 25 °C, with a magnetic stirrer. Afterwards, it was centrifuged (at 10000 rpm) for 15 minutes at 10 °C. Next, the supernatant was kept and pellet re-extraction was performed by adding 20 ml of aqueous methanol (methanol: water, 70: 30 v/v) and mixing it in an ultra turrax (Polytron-Kinematica GnbH- Luzers, 3 times for 1 minutes at speed 4). After this process, the solution was again centrifuged (10000 rpm/ 15 min. at 10 °C), the supernatant was added to the kept one and their volume completed to 50 ml with aqueous methanol (methanol: water, 70:30 v/v) (Nóbrega, Oliveira, Genovese, & Correia, 2015).

2.2.2. Total phenolic content

According Genovese, Santos, Hassimotto, & Lajolo, 2003, an aliquot of extract was mixed with 0.25 ml Folin-Ciocalteu reagent and 2 ml distilled water. After 3 minutes at room temperature, 0.25 ml of a saturated sodium carbonate

solution (Na₂CO₃) was added and the mixture was kept at 37 °C in water bath for 30 minutes. The absorbance was measured at 750 nm through an Ultrospec 2000 spectrophotometer model (Amersham Biosciences, Cambridge, U.K.). Gallic acid was used as reference standard. Results were expressed in equivalent gallic acid (GAE) in mg/g of sample on a dry basis.

2.2.3. Antioxidant activity by FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) and DPPH• (sequestration of radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

The antioxidant activity was determined by FRAP, according to Benzie and Strain (1996). 20 µL of the diluted extract and 150 µL of the FRAP reagent (sodium acetate buffer/ TPTZ solution/ HCl solution) were added to a 96 wells polystyrene microplate (Costar, Cambridge, MA). After 5 minutes of incubation at 37 °C, the absorbance was read at 593 nm with a Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer (Synergy™ H1, Biotek Instruments Inc., Vermont, USA). The results were expressed in µmoles of Trolox equivalents (TE) per g of sample (d. b.) and carried out in triplicates.

The antioxidant activity was also determined by DPPH•, according to Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995), with modifications by Duarte-Almeida, Santos, Genovese, and Lajolo (2006). After 20 minutes of reaction time, the absorbance was read at 517 nm on a microplate spectrophotometer and converted to antioxidant activity percentage terms. The analyses were carried out in triplicates and the results expressed in µmoles of Trolox equivalent/g of sample.

2.2.4. Determination of Total Fiber

The total fiber content present in acerola flour was obtained by the non-enzymatic gravimetric method, according AOAC (2010).

2.3. Fermented milk manufacture: synbiotic (SFM) and control

Beverages were developed by the Laboratory of Food Microbiology located at the Faculty of Pharmaceutical Sciences of State University Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Arararaquá/ SP. For SFM, the pectin Amidated LM Pectin – Orange based (CPKelco®, Dinamarca) and sucrose (1:3) were added in UHT whole cow's milk of 60 ° C for 10 minutes using a magnetic stirrer. Thereafter, 4 % skim milk powder and 7.5 % sucrose were added, homogenized and pasteurized (85 ° C/ 15 minutes). The dairy was cooled until 37 °C and added 1 % of an ABT-4 culture (Christian Hansen, Hørsholm, Denmark), containing the probiotic strains *L. acidophilus* La-5 and *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 and the starter culture *Streptococcus thermophilus*. Fermentation took place at 43 °C until reaching a pH of 4.7. Next, the product was cooled in an ice-bath and refrigerated (4 ± 1 °C) for 24 h. Then, were incorporated of the acerola flour was done after the breaking of coagulum. The synbiotic beverages were stored under refrigeration (4 ± 1 °C) for 28 days. Controlled fermented milk was produced following the same procedure. The ABT-4 culture was added and absent from the addition of acerola flour and pectin.

2.4. Experimental design

Using The Central Composite Rotatable Design (CCRD), Statistica software, version 10.0 (StatSoft Inc., USA), 11 experiments was designing combining different concentrations of acerola flour and pectin. Preliminary experiments were used like parameters. The dependent variables (responses) were constituted by the acceptance of the formulations through the acceptance test, considering the attributes "flavor" and "global impression". The concentration of independent variables were coded as x_1 and x_2 , respectively (Table 1). The quadratic polynomial model that was fitted to each response show in Equation (1), where x_1 and x_2 represented, respectively, the contents of acerola flour and pectin; β_0 , β_1 , β_2 , β_{11} , β_{22} and β_{12} performed the parameters to be estimated - coefficients and y was composed by the dependent variables.

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 \dots\dots\dots(1)$$

Using Statistica software, version 10.0 (StatSoft Inc., USA), the analysis of variance (ANOVA) were made and the effect and regression coefficients of individual linear, quadratic and interaction terms were stipulated, considering the terms statistically significant for $p < 0.05$. The values of regression coefficients were used to generate contour maps from the regression models.

2.4.1. Sensory Analysis (Acceptance Test – “flavor” and “overall impression”)

The SFM were evaluated by a untrained panel of 112 consumers (Hough et al., 2006) by the Acceptance Test compound for hedonic scale of 9 points according to Peryam and Pilgrim, 1957. The evaluated attributes were flavor and overall impression. 25 ml of samples (5 ± 1 °C) were presented in blocks of three and four coded with three random digits in complete randomized blocks for monadic form in individual booths equipped at Laboratory of Sensorial Analysis of the Department of Food and Nutrition of the Faculty of Pharmaceutical Sciences - UNESP Araraquara/ SP. The participants signed and received the Term of Free and Informed Consent (CAAE: 49683215600005426).

2.5. Evaluation of optimized SFM during cold storage

2.5.1 Fermented milk post-acidification

Fermented milk post-acidification was evaluated in synbiotic fermented milk and control, in triplicate, during the 28 days of cold storage (5 ± 1 °C) according to Adolfo Lutz (2008). It was determined through a pH meter in triplicate using a pH meter model PG1800 (Gehaka, São Paulo, Brazil) and acidity expressed as Dornic acidity (°D).

2.5.2. Extraction of Phenolic Compounds

According Karaaslan Ozden, Vardin, and Turkoglu (2011), polyphenols presents in the optimized SFM were extracted using acidified methanol (concentrated HCl, 0.1 g/100 ml) with modifications. Six ml of acidified methanol was added to each 0.01 g of freeze-dried samples. The samples were kept

overnight at 4 ± 1 °C and centrifuged at 1700 rpm at 4 ± 1 °C for 2 minutes. Transfer the precipitate to cuvette.

2.5.3. Determining Total Phenolic Compounds and Antioxidant Activity

Using ABTS⁺, the antioxidant activity was determined according method proposed by Serpen, Capuano, Fogliano, and Gökmen (2007). The results obtained were expressed as mmol Trolox equivalent (mmol TE/g).

2.5.4. Instrumental Texture Profile

The instrumental texture profile was evaluated according Hickisch, Beer, Vogel, & Toelstede (2016) using the equipment TA.XT plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Surrey, United Kingdom) equipped with a 5 kg load cell and a 25 mm cylindrical probe. The depth of immersion was 5 mm at a constant speed of 0.5 mm/s. The compression was carried out one time using a trigger force of 0.03 N. Force–time curves were recorded and textural parameters firmness, adhesiveness, cohesiveness and gum were calculated with Exponent software 6.

2.5.5. Centesimal Composition

It was analyzed in SFM the lipid content (L) (Soxhlet method), protein content (P) (micro-Kjeldahl method), moisture content (M) and ash content (A), respectively, by the methods of drying in an oven at 105 °C, and incinerating at 550 °C. The methods were in accordance with AOAC (2010). The quantity total of dietary fiber and its fractions were determined according to methodology proposed by Mañas, Bravo e Saura-Calixto (1994).

The total carbohydrate content (C) was calculated by the difference, as represented in Eq. (2), where M = moisture (g/100 g); A = ash content (g/100 g); L = lipid content (g/100 g); and P = protein content (g/100 g):

$$C \left(\frac{\text{g}}{100\text{g}} \right) = 100 - (U + C + L + P) \dots \dots \dots (2)$$

2.5.6. Microbial Analyses

25 ml of sample was suspended in 225 ml of sterile peptone water solution and the serial dilutions were performed. *Lactobacillus acidophilus* LA-5 were inoculated in agar MRS (Himedia, India) for 37 °C/48 h in aerobiose; *Bifidobacterium lactis* BB-12 in agar MRS (Himedia, India) added of sodium propionate (3 g/L) (Sigma e Aldrich, St. Louis, MO, USA) and lithium chloride (2 g/L) (Merck, Darmstadt, Germany) for 37 °C/72 h in anaerobiosis and *Streptococcus thermophilus* in M-17 agar (Oxoid®, United Kingdom) with sterile lactose solution lactose (10% w/ v) (Oxoid®) for 43 °C/48 h in anaerobiosis. The results were expressed in log cfu/ g (Matias, Padilha, Bedani, & Saad, 2016).

2.5.6.1. Survival of strains under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions

According Buriti, Castro and Saad (2010), with modifications, the *in vitro* assays were carried out after 01, 14, and 28 days of refrigerated storage. In order to enumerate the microorganisms before and after the *in vitro* assays, samples were collected initially (time 0) and after 2 h (first step – after the gastric phase), 4 h (after the first enteric phase), and 6 h after the beginning of the assay (after the second enteric phase).

For the *in vitro* procedure, in each sample collection, 10 ml from each triplicate dilution in 0.5% NaCl solution (blended in a Bag Mixer 400) was transferred to 3 sterile flasks, totalizing 9 flasks, and the pH of flasks was adjusted to 2.0–2.5 with 0.2 ml of 1 N HCl. Pepsin (from porcine stomach mucosa, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and lipase (Amano lipase from *Penicillium camemberti*, Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, USA) solutions were added to samples to reach a concentration of 3 g/l and of 0.9 mg/l, respectively.

Flasks were incubated at 37 °C, with agitation of approximately 150 rpm in a metabolic water bath (Dubnoff MA-095, Marconi, Piracicaba, Brazil), during 2 h (first step - gastric phase). In the next step (first enteric phase), the pH of samples was increased to 4.5–5.5, using 1ml of solution pH 12 (1N-NaOH, PO₄H₂Na·2H₂O and distilled water). Bile (bovine bile, Sigma-Aldrich) and pancreatin (from porcine pancreas, Sigma-Aldrich) were added to reach a concentration of 10.0 g/l and of 1.0 g/l, respectively. Samples were incubated again at 37 °C for 2 h under agitation. In the last step, the pH was increased to 6.5–7.5, using 1.6 ml the same alkaline solution. Bile and pancreatin concentrations were adjusted (10.0 g/l and 1.0 g/l, respectively), and samples were incubated again at 37 °C for 2 h under agitation (second enteric phase), achieving 6 h of the *in vitro* assay. All results were presented as log cfu/ ml.

To verify the survival rate of the microorganisms, equation 3 was used (Guo et al., 2009).

$$\text{Survival rate (\%)} = \frac{\log cfu N_1}{\log cfu N_0} \times 100 \dots\dots\dots(3)$$

N_1 , the total viable count of microorganisms strains after exposure to *in vitro* simulated gastrointestinal conditions (6 h); N_0 , the total viable count of probiotic strains before exposure to *in vitro* simulated gastrointestinal conditions (0 h).

2.5.7. Sensory Analysis (Acceptance Test - "Flavor", "Global Impression" and "Texture")

To perform the sensory analysis during cold storage, the same methodology was used as described in item 2.4.1, including the texture attribute.

2.5.8. Statistical Analysis

All the results obtained through analysis were expressed through mean \pm standard deviation, and were submitted to analysis of variance (ANOVA). As post test was used Tukey's Test ($p < 0.05$) to verify the difference between the means. All analysis was performed using XLSTAT/Excel® software.

3. Results and Discussion

3.1. Characterization of Acerola Flour

3.1.1. Total phenolic content and antioxidant activity of acerola flour

The value of total phenolic compounds found in acerola flour was 52.50 ± 1.25 mg EGA/g. Regarding the antioxidant capacity, the values found were 226.86 ± 4.84 mmol TE/g according to the DPPH method and 51.00 ± 16.91

mmol TE/g for FRAP. Other authors evaluated the content of total phenolic compounds present in the acerola flour and found values between 3.75 mg EGA/g and 72.65 mg EGA/g (Borges, 2011; Silva et al., 2014). Vasco, Ruales, & Kamal-eldin (2008) suggested classifications according to the total phenolic compounds content, being high amounts concentrations higher than 10 mg EGA/ g. Pereira et al., 2013 using the free radical DPPH obtained an average value of 416.44 μg / ml. Correia, Borges, Medeiros, & Genovese (2011) found the following values: 191.66 ± 1.04 mmol Trolox/g per DPPH and 7.87 ± 0.19 mmol Trolox eq/g per FRAP. The difference between the values may be associated with the different agricultural practices, soil composition, climatic variations, type of drying, extraction method and solvent used, and different stages of fruit ripening (Morales-Soto et al., 2014; Paz et al., 2015).

3.1.2. Determination of Total Fibers

The acerola flour presented $56.28 \pm 0.19\%$ of total fibers. Silva et al. (2014) observed 51.22% of fibers in acerola by-product and Pereira et al. (2010) 61.84%.

3.2 Optimization of pectin and acerola flour concentration in SFM

Figure 1 presents the response surfaces plots showing interaction effect of independents variables on flavor and overall impression of the SFM. According ANOVA, the model was significant ($p < 0.05$) and the lack of a non-significant adjustment (Table 2). Only acerola flour showed significance ($p < 0.05$) regarding the dependent variables. Seeking an optimum region with mean values of flavor attributes and overall impression between 6.0-7.5; the

proportions of independent variables used reached the optimized region, confirming the efficacy of the mathematical model.

The intake of dietary fiber is related to the decrease in the prevalence of cardiovascular disease, plays an important role in intestinal health, including laxative effects and is involved with lower body weight (Slavin, 2013). In order to formulate a product considered as a source of fiber and to reconcile the results found in the sensory evaluation, were used 2.00% of the acerola flour and 0.20% pectin to develop the optimized formulation.

3.3. Characterization of the optimized formulation during 28 days of storage at 5°C.

3.3.1.

Table 3 presents the centesimal composition of SFM. It is observed that the product has a high amount of total dietary fibers (DF) (18.42 ± 0.75 g 100/g). According international surveys and local guides, 100 ml or 100 g of the food with 2.5 g of fiber is considerate a product with a high content of DF (BRASIL, 2012). Formulation of fermented products with ingredients from fruit by-products rich in total DF has increased in recent years, being convenient to their association with probiotic bacteria for the promotion of the intestinal health (Espírito-Santo et al, 2013). DF can be fractioned into two major groups of components, the water-insoluble and the water-soluble fraction. While the insoluble fraction stimulates the intestinal peristalsis, the soluble one promotes the selective growth of the indigenous microbiota, acting as a prebiotic (Sembries et al., 2003). Soluble fiber, in special, is also related to a decrease in the serum cholesterol and glucose levels. Besides the regularization of

intestinal disorders, improving constipation and diarrhea frames (McRorie & McKeown, 2016).

3.3.2. Fermented milk post-acidification

The results of fermented milk post-acidification of the control and synbiotic formulations are shown in Table 4. Acid production by microorganisms decrease pH during fermentation at 42°C, and this decrease continues during storage at 5 °C (Shah, 2000). The results shown that pH value decreased slightly, while titratable acidity increased over the 28 day storage period for control and SFM. However, during the entire storage period, there was no statistical difference in the pH values between SFM and control. Similar result was reported for yogurt supplemented with commercial fibres from apple, wheat, bamboo, inulin which the addition of this ingredients no changed on pH of yogurt (Staffolo et al., 2004).

3.3.3. SFM Antioxidant Activity

The SFM antioxidant activity values ranged from 1693.80 ± 84.85 mM eq. Trolox/g at the initial time and 1325.34 ± 39.95 mM eq. Trolox/g at the end of the storage period. It shows a significant decrease ($p < 0.05$) and decreasing the antioxidant activity values proportional to the course of the storage period. Phenolic compounds are sensitive to some factors such as low stability, temperature, pH, presence of light and oxygen; which may negatively interfere with a number of antioxidant compounds present in the product over the course of the storage period (De Rosso & Mercadante, 2007).

3.3.5. Texture profile

The TP represented the yogurt textural characteristics. Firmness, cohesiveness, gumminess and adhesiveness are commonly evaluated in determining yogurt texture (Buriti et al., 2014; Iličić et al., 2014). Table 5 indicates the texture profile of the control and SFM formulations. There was no statistical difference between the formulations on the firmness and cohesivity attributes. Gel formation is one of the main texture properties of yogurt. This structure is result of casein aggregation, however, others attributes such as ingredients, process, storage conditions and starter culture are able to change a gel structure formation (Costa et al., 2015).

For the adhesiveness parameter, it is noted that the control formulation indicated higher values in relation to LSF. Adhesiveness is strongly linked to firmness. Consumers prefer fermented dairy products with adhesiveness values of -0.024 to -0.049 N·s, and they describe them as soft. Gels with adhesiveness of <-0.024 are not perceived as consistent (Mani-López et al., 2015). According Espírito-Santo et al. (2013) addition higher amounts of fibers from by-product influenced apparent viscosity of yoghurts. These fibers act as cutting blades during shearing, breaking the casein cross-links and dropping down the apparent viscosity. Similar behavior may have occurred in this study.

3.3.6. Sensory analysis

Using the equations 4 and 5 predicted by the MSR, having as results, values of 5.47 for the flavor attribute and 5.52 for the overall impression attributes. However, the average scores founded experimentally during 28 days of cold storage at 5 °C were 7.15 ± 0.01 for flavor and 6.97 ± 0.13 for overall

impression, ranging from “liked very much” and “liked moderately”. The SFM flavor scores were maintained throughout the storage period without statistical difference. The sensory texture parameter was indicated with higher averages at times 14 (6.96 ± 1.32) and 28 (7.12 ± 1.15) differing significantly from time 01 day (6.85 ± 1.19). The purchase intent results showed that more than 40% of the consumers would probably buy the SFM (Figure 2). Good results have been found in recent studies with different categories of food products with addition of probiotic microorganisms (Lalicic-Petronijevic et al., 2015, Witzler et al., 2017).

$$Y = 6.41 - 0.76x_1 - 0.26x_2 + 0.16x_1^2 - 0.32x_2^2 \dots\dots\dots(4)$$

$$Y = 6.22 - 0.76x_1 - 0.26x_2 + 0.22x_1^2 - 0.30x_2^2 \dots\dots\dots(5)$$

3.3.7. Viability and survival of *L. acidophilus* La-5 and *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 against a simulation of gastrointestinal conditions *in vitro*

Table 6 shows the viability of the microorganisms during the 28 days of storage. It is noted a lower decrease on viability of the microorganisms present in the control formulation and SFM throughout until 14th of the storage. However in SFM in the 28th of the storage was observed the decrease about of 3 log cycles for *L. acidophilus* and for *Bifidobacterium animalis* BB-12. Acerola flour is rich in phenolic compounds, ascorbic acid and carotenoid (De Rosso, 2007). Probably after 28 days of refrigerate storage the intrinsic characteristics of acerola flour decrease the counts of *L. acidophilus* or bifidobacteria. Some studies using different supplements reported that soybean, pea, lemon, orange, apple and banana flours can increase or decrease the counts of *L. acidophilus* or bifidobacteria (Sendra et al. 2008., Matias et al. 2014., Casarotti et al., 2015),

showing that the probiotic counts can vary depending on the composition of food matrix and days of storage.

Figures 3 and 4 present the probiotic survival against of the simulation of gastrointestinal conditions. At the time 01 day, the strains started the digestion process starting from a similar concentration. After the simulation of the digestion process, there was an average reduction of approximately 4 log cfu/ml in the survival of the probiotics present in the control formulation and a reduction of approximately 6 log cfu/ml on SFM.

Silva et al. (2015) evaluating the viability of *Bifidobacterium animalis* subs. *lactis* BLC1 against the simulation of gastrointestinal conditions, there was a reduction of 3.82 log cfu/g in the samples at the end of the storage period. Bedani et al. (2014) verified the survival of the probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* BB-12, added to a soybean-based yogurt plus fruit pulp versus the *in vitro* simulation of gastrointestinal conditions. After the simulation of gastrointestinal conditions, there was a significant ($p < 0.05$) decrease in the survival rate of probiotics. The authors concluded that the addition of fruit pulps may lead to a decline in the functionality of probiotics (Bedani et al., 2014).

Figure 5 indicates the percentage of survival of the microorganisms against the simulation of gastrointestinal conditions. The control formulation presented higher survival concentration of probiotic strains and *Streptococcus thermophilus*, differing significantly ($p < 0.05$) from SFM.

The development of new formulations including probiotics, prebiotics, and synbiotics, is increasing. However, studies reporting the influence of these food matrices on the functionality of probiotics, although fundamental, are rarely

found. The incorporation vehicle may cause an effect on the physiology, survival, and potentiality of probiotics (Sanders & Marco, 2010).

4. Conclusion

The response surface methodology, along with the mathematical models developed, was able to predict optimum concentrations of acerola flour and pectin in the development of SFM with good sensory acceptability. Only the concentration of the acerola flour influenced significantly ($p < 0.05$) in relation to the flavor and overall impression attributes of SFM. The addition of acerola flour and pectin did not contribute to the viability of the probiotic microorganisms during the storage time. The synbiotic fermented milk shows high concentrations of dietary fiber and expressive antioxidant activity. The incorporation of by-product fruit flour into milk can be an interesting alternative for functional fermented milk production.

Acknowledgments

This work was supported by grants from National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and FAPESP, process number 2015/13965-0.

References

Agil, R., Gaget, A., Gliwa, J., Avis, T. J., Willmore, W. G., & Hosseinian, F. (2013). Lentils enhance probiotic growth in yogurt and provide added benefit of antioxidant protection. *LWT e Food Science and Technology*, 50, 45e49.

- Antunes, A.E.C., Liserre, A.M., Coelho, A.L.A., Menezes, C.R., Moreno, I., Yotsuyanagi, K., Azambuja, N.C. Acerola nectar with added microencapsulated probiotic. *LWT - Food Science and Technology*, 54, 125-131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.04.018>
- AOAC (2010). *Official methods of analysis of the association official analytical chemists* (18th ed.). Arlington: Association of Official Analytical Chemists.
- Bedani, R., Vieira, A. D. S., Rossi, E. A., Saad, S. M. I. (2014). Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to in vitro gastrointestinal stress in synbiotic soy yoghurt with okara during storage. *LWT - Food Science and Technology*, 55(2), 436–443.
- Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Borges, K. C. (2011). *Estudo das características físico-químicas e funcionalidade de bagaços de frutas tropicais desidratados em leite de jorro*. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- Braga, A. C. D., Lima, M. dos S., Azevedo, L. C., & Ramos, M. E. C. (2010). Caracterização do resíduo de acerola (*malpighia glabra* L.), extraído do decanter no processo de clarificação do suco. In *V Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica (CONNEPI)*. Maceió - AL.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Labensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28, 25-30.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - *RDC 54, de 12 de novembro de 2012*. Aprova Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar.
- Buriti, F. C. A., Castro, I. A., Saad, S. M. I. (2010). Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 121-129.
- Casarotti, S.N., Penna, A.L.B. (2015). Acidification profile, probiotic in vitro gastrointestinal tolerance and viability in fermented milk with fruit flours. *International Dairy Journal* 41 (2015) 1e6.
- Cardoso, V. M. de O. (2014). *Síntese e caracterização de hidrogéis de amido retrogradado e goma gelana utilizados como matriz em sistemas de liberação cólon específica de fármacos*. Universidade Estadual Paulista.
- Correia, R. T. P., Borges, K. C., Medeiros, M. F., Gnovesse, M. I. (2011). *Food Science and Technology International*, 18(6), 539-547.

- Costa, E. de A., Valença, A. de P., Garruti, D. dos S. G., & Freitas, M. M. de M. (2014). Aceitação sensorial da barra de cereais com fibra de acerola (*Malpighia glabra* L) orgânica. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 16(85), 187–194.
- Costa, M.P., Frasco, B.S., Silva, A.C.O., Freitas, M.Q., Franco, R.M., Conte-Junior, C.A. (2015). Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) pulp, probiotic, and prebiotic: Influence on color, apparent viscosity, and texture of goat milk yogurts. *Journal of Dairy Science*, 98 (9).
- De Rosso, V. V., & Mercadante, A. Z. (2007). The high ascorbic acid content is the main cause of the low stability of anthocyanin extracts from acerola. *Food Chemistry*, 103, 935–943. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.047>.
- Duarte-Almeida, J. M., Santos, R. J., Genovese, M. I., Lajoto, F. (2006) Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(2), 446-452.
- Espírito-Santo, A.P., Lagazzo, A., Sousa, A.L.O.P., Perego, P., Converti, A. Oliveira, M.O. (2013). Rheology, spontaneous whey separation, microstructure and sensorial characteristics of probiotic yoghurts enriched with passion fruit fiber. *Food Research International*, 50 , 224–231.
- Genovese, M. I., Santos, R. J., Hassimoto, N. M. A., Lajolo, F. M. (2003). Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 39, 67-69.
- Guo, Z., Wang, J., Yan, L., Chen, W., Liu, X-M., & Zhang, H-P. (2009). In vitro comparison of probiotic properties of *Lactacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1640-1646.
- Hickisch, A., Beer, R., Vogel, R. F., & Toelstede, S. (2016). Influence of lupin-based milk alternative heat treatment and exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria on the physical characteristics of lupin-based yogurt alternatives. *Food Research International*, 84, 180–188. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.037>.
- Hough, G., Wakeling, I., Mucci, A., Chambers IV, E., Gallardo, I. M., & Alves, L. R. (2006). Number of consumers necessary for sensory acceptability tests. *Food Quality and Preference*, 17, 522–526. <http://doi.org/10.1016/j.foodqual.2005.07.002>.
- Instituto Adolfo Lutz. (2008). *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos físico-químicos para análise de alimentos [Analytical standards of the Instituto Adolfo Lutz: physico-chemical methods for food analysis]*. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz.

- Lalicic-Petronijevic, J., Popov-Raljic, J., Obradovic, D., Radulovic, Z., Paunovic, D., Petrusic, M., et al. (2015). Viability of probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* NCFM® and *Bifidobacterium lactis* HN019 and their impact on sensory and rheological properties of milk and dark chocolates during storage for 180 days. *Journal of Functional Foods*, 15, 541e550
- karaaslan, M., Ozden, M., Vardin, H., & Turkoglu, H. (2011). Phenolic fortification of yogurt using grape and callu extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 1065-1072.
- Manãs, E., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (1994). Sources of error in dietary fibre analysis. *Food Chemistry*, 50(4), 331-342.
- Matias, N. S., Bedani, R., Castro, I. A., & Saad, S. M. I. (2014). A probiotic soy-based innovative product as an alternative to petit-suisse cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 411–417. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.054>.
- Matias, N. S., Padilha, M., Bedani, R., & Saad, S. M. I. (2016). In vitro gastrointestinal resistance of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* BB-12 in soy and/or milk-based synbiotic apple ice creams. *International Journal of Food Microbiology*, 234, 83–93. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.037>.
- Maruyama, L. Y., Cardarelli, H. R., Buriti, F. C., Saad, S. M. I. (2006) Textura instrumental de queijo *petit-suisse* potencialmente probiótico: influência de diferentes combinações de gomas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 26(2), 386-393.
- McRorie, J. W., & McKeown, N. M. (2016). Understanding the physics of functional fibers in the gastrointestinal tract: an evidence-based approach to resolving enduring misconceptions about insoluble and soluble fiber. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 117, 251–264. <http://doi.org/10.1016/j.jand.2016.09.021>.
- Morales-Soto, A., García-Salas, P., Rodríguez-Pérez, C., Jiménez-Sánchez, C., Cádiz-Gurrea, M. D. L., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2014). Antioxidant capacity of 44 cultivars of fruits and vegetables grown in Andalusia (Spain). *FRIN*, 58, 35–46. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.050>.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Nicolaus, B., Poli, A., & Orlando, P. (2012). Anaerobe The prebiotic source in fl uences the growth , biochemical features and survival under simulated gastrointestinal conditions of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Anaerobe*, 18(3), 280–285. <http://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.03.002>.
- Nóbrega, E. M., Oliveira, E. L., Genovese, M. I., & Correia, R. T. P. (2015). The impact of hot air drying on the physical-chemical characteristics, biactive

- compounds and antioxidant activity of acerola (*Malpighia Emarginata*) residue. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39, 131–141. <http://doi.org/10.1111/jfpp.12213>.
- Paz, M., Gúllon, P., Barroso, M. F., Carvalho, A. P., Domingues, V. F., Gomes, A. M., ... Delerue-Matos, C. (2015). Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: evaluation of bioactive compounds. *Food Chemistry*, 172, 462–468.
- Pereira, C. T. M., Silva, C. R. P., Lima, A., Pereira, D. M., Costa, C. N., Neto, A. A. C. (2013). Obtenção, caracterização físico-química e avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* da farinha de resíduo de acerola (*Malpighia glabra* L.). *Acta Tecnologia*, 6, 50-56.
- Pereira, E. S., Pimentel, P. G., Duarte, L. S., Mizubuti, I. Y., Araújo, G. G. L., Carneiro, M. S. S., Filho, J. G. L. R., Maia, I. S. G. (2010) Determinação das frações proteicas e de carboidratos e estimativa do valor energético de forrageiras e subprodutos da agroindústria produzidos no Nordeste Brasileiro. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(4), 1079-1094.
- Peryam, D. R., Pilgrim, F. J. (1957). Hedonic scale method of measuring food preferences. *Food Technology*, 11(9), 9-14.
- Sanders, M. E., & Marco, M. L. (2010). Food formats for effective delivery of probiotics. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 65–85. <http://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100743>.
- Sendra, E., Fayos, P., Lario, Y., Fernandez-Lopez, J., Sayas-Barbera, E., & Perez-Alvarez, J. A. (2008). Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. *Food Microbiology*, 25, 13e21.
- Serpen, A., Capuano, E., Fogliano, V., & Gökmen, V. (2007). A New Procedure to Measure the Antioxidant Activity of Insoluble Food Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7676-7681.
- Shah, N. P. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairyfoods. *Journal of Dairy Science*, 83, 894-907.
- Silva, E. C. L. (2013). *Análises físico-químicas e comparação de rotulagem de bebidas lácteas e iogurtes*. Universidade de Brasília.
- Silva, L. M. R., Figueiredo, A. T., Ricardo, B. M. P. S., Vieira, I. G. P., Figueiredo, R. W., Brasil, I. M., & Gomes, C. L. (2014). Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 143, 398–404.
- Silva, P. D. L., Bezerra, M. de F., Santos, K. M. O., & Correia, R. T. P. (2015). Potentially probiotic ice cream from goat 's milk: characterization and cell viability during processing, storage and simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 452–457.

<http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.055>.

Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients*, 5(4), 1417-1435.

Sobrinho, I. S. B. (2014). *Propriedades nutricionais e funcionais de resíduos de abacaxi, acerola e cajá oriundos da indústria produtora de polpas*. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Staffolo, M. D., Bertola, N., Martino, M., & Bevilacqua, y. A. (2004). Influence of dietary fibre addition on sensory and rheological properties of yogurt. *International Dairy Journal*, 14, 263-268

Vasco, C., Ruales, J., Kamal-Eldin, A (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 111, 816-823.

Witzler, J.J.P., Pinto, R.A.P., de Valdez, G.F., de Castro, A.D., Cavallini, D.C.U. (2017). Development of a potential probiotic lozenge containing *Enterococcus faecium* CRL 183. *LWT - Food Science and Technology*, 77 (193-199).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados apresentados, conclui-se:

- ✓ A metodologia de superfície de resposta, juntamente com os modelos matemáticos desenvolvidos, foi capaz de prever as variáveis de resposta;

- ✓ Somente a concentração da farinha de acerola influenciou significativamente ($p < 0,05$) frente aos atributos sabor e impressão global do leite fermentado simbiótico;

- ✓ O leite fermentado simbiótico apresentou elevadas concentrações de fibras alimentares e expressiva atividade antioxidante;
- ✓ A adição da farinha de acerola e da pectina não contribuiu com a viabilidade dos microrganismos durante o tempo de estocagem do leite fermentado simbiótico, tão pouco quanto a sobrevivência dos microrganismos probióticos frente à simulação de digestão gastrointestinal *in vitro*;
- ✓ Mais estudos são necessários para verificar o efeito clínico atribuído a bebida desenvolvida.

TABELAS

Table 1. Experimental design for the preparation of the formulations of synbiotic fermented milk.

Number of Tests	Coded Variables		Original Variables	
	X_1 (%)	X_2 (%)	Acerola flour (%)	Pectin (%)
1	-1	-1	1.00	0.04
2	-1	+1	1.00	0.20
3	+1	-1	5.00	0.04
4	+1	+1	5.00	0.20
5	-1.414	0	0.18	0.12
6	+1.414	0	5.82	0.12
7	0	-1.414	3.00	0.01
8	0	+1.414	3.00	0.23
9	0	0	3.00	0.12
10	0	0	3.00	0.12
11	0	0	3.00	0.12

X_1 = % acerola flour; X_2 = % pectin.

Table 2. Estimation of the regression coefficients of the mathematical model and value of "p" for the flavor and global impression attributes.

Factors	Coefficients	Standard Error	t (2)	P
FLAVOR				
Intercept β_0	6.407199*	0.245072*	26.14410*	0.001460*
(1) X_1 (L)	-0.760337*	0.300698*	-5.05716*	0.036948*
X_1 (Q)	0.162279	0.357476	0.90792	0.459757
(2) X_2 (L)	-0.264096	0.304441	-1.73496	0.224884
X_2 (Q)	-0.315317	0.372271	-1.69402	0.232343
OVERALL IMPRESSION				
Intercept β_0	6.220958*	0.161742*	38.46216*	0.000675*
(1) X_1 (L)	-0.757955*	0.198454*	-7.63861*	0.016710*
X_1 (Q)	0.220111	0.235926	1.86593	0.203038
(2) X_2 (L)	-0.255743	0.200924	-2.54567	0.125836
X_2 (Q)	-0.300233	0.245691	-2.44399	0.134462

X_1 = acerola flour; X_2 = pectin.

R^2 flavor = 0.86097.

R^2 overall impression = 0.91007.

Table 3. Centesimal composition of the synbiotic fermented milk.

Centesimal Composition SFM	
Humidity (g/100 g)	76.39 ± 0.67
Ashes (g/100 g)	1.11 ± 0.03
Total Protein (g/100 g)	3.92 ± 0.07
Total Fat (g/100 g)	3.42 ± 0.25
Total Carbohydrate (g/100 g)	15.21 ± 0.88
Total Dietary Fiber (g/100 g)	18.42 ± 0.75
Soluble Fiber (g/100 g)	12.69 ± 0.31
Insoluble Fiber (g/100 g)	2.95 ± 0.03
Lignin (g/100 g)	2.78 ± 0.40
Total Calories (g/100 g)	106.12 ± 1.93

Values are expressed as mean ± SD.
SFM: synbiotic fermented milk.

Table 4. Fermented milk post-acidification of control and synbiotic fermented milk after 01, 07, 14, 21 and 28 days of storage at 5 °C during the storage period.

Time (days)	pH	
	Control	SFM
01	4.86 ± 0.01 ^{a, A}	4.99 ± 0.01 ^{a, B}
07	4.69 ± 0.04 ^{a, A}	4.88 ± 0.01 ^{a, AB}
14	4.65 ± 0.01 ^{a, A}	4.82 ± 0.03 ^{a, AB}
21	4.63 ± 0.07 ^{a, A}	4.81 ± 0.07 ^{a, AB}
28	4.62 ± 0.07 ^{a, A}	4.63 ± 0.02 ^{a, A}
Dornic Acidity (°D)		
01	74.00 ± 0.00 ^{a, A}	73.00 ± 4.24 ^{a, A}
07	72.67 ± 2.31 ^{a, B}	78.00 ± 4.27 ^{a, AB}
14	81.50 ± 2.12 ^{a, C}	82.33 ± 6.03 ^{a, AB}
21	99.00 ± 1.41 ^{b, D}	92.50 ± 0.50 ^{a, AB}
28	104.00 ± 0.00 ^{b, E}	99.00 ± 1.41 ^{a, B}

Values are expressed as mean ± SD. ^{a, b} Different lowercase superscript letters in a row denote significant differences between trials ($p < 0.05$); ^{A, D} Different superscript capital letters in a column for each microorganism denote significant differences during storage period ($p < 0.05$). SFM: synbiotic fermented milk.

Table 5. Average texture profile of control and synbiotic fermented milk after 01, 07, 14, 21 and 28 days of storage at 5 °C during the storage period.

Storage time (days)	Firmness (N.seg)		Adhesiveness (N.seg)	
	Control	SFM	Control	SFM
01	0.12 ± 0.00 ^{a,A}	0.10 ± 0.00 ^{a,A}	-0.03 ± 0.07 ^{a,A}	-0.02 ± 0.01 ^{a,A}
07	0.11 ± 0.00 ^{a,A}	0.12 ± 0.00 ^{a,A}	-0.02 ± 0.08 ^{a,A}	-0.009 ± 0.02 ^{a,B}
14	0.11 ± 0.00 ^{a,A}	0.10 ± 0.00 ^{a,A}	-0.02 ± 0.07 ^{b,A}	-0.009 ± 0.00 ^{b,B}
21	0.11 ± 0.00 ^{a,A}	0.12 ± 0.00 ^{a,A}	-0.02 ± 0.01 ^{b,A}	-0.009 ± 0.00 ^{b,B}
28	0.11 ± 0.00 ^{a,A}	0.13 ± 0.00 ^{a,A}	-0.02 ± 0.02 ^{a,A}	-0.01 ± 0.09 ^{a,AB}
	Cohesiveness		Gum	
01	0.66 ± 0.02 ^{a,A}	0.74 ± 0.02 ^{a,A}	1.31 ± 0.03 ^{a,A}	1.48 ± 0.04 ^{a,A}
07	0.67 ± 0.06 ^{a,A}	0.76 ± 0.01 ^{a,A}	1.34 ± 0.11 ^{a,A}	1.51 ± 0.01 ^{a,A}
14	0.70 ± 0.01 ^{a,A}	0.91 ± 0.05 ^{a,A}	1.39 ± 0.01 ^{a,A}	1.81 ± 0.10 ^{b,B}
21	0.67 ± 0.02 ^{a,A}	0.77 ± 0.01 ^{a,A}	1.33 ± 0.04 ^{a,A}	1.54 ± 0.02 ^{a,A}
28	0.68 ± 0.04 ^{a,A}	0.67 ± 0.07 ^{a,A}	1.36 ± 0.07 ^{a,A}	1.35 ± 0.14 ^{a,A}

Values are expressed as mean ± SD. ^{a,b} Different lowercase superscript letters in a row denote significant differences between trials ($p < 0.05$); ^{A,B} Different superscript capital letters in a column for each microorganism denote significant differences during storage period ($p < 0.05$).
SFM: synbiotic fermented milk.

Table 6. Count of probiotic (log ufc/ ml) in control and synbiotic fermented milk after 01, 14 and 28 days of storage at 5 °C during the storage period.

Microorganism	Time (days)	Formulations	
		SFM	Control
<i>L. acidophilus</i>	01	8.26 ± 0.01 ^{a,C}	8.26 ± 0.02 ^{a,A}
	14	7.69 ± 0.03 ^{a,B}	8.16 ± 0.01 ^{b,A}
	28	4.83 ± 0.00 ^{a,A}	8.09 ± 0.02 ^{b,A}
<i>B. animalis</i>	01	8.23 ± 0.01 ^{a,C}	8.25 ± 0.02 ^{a,A}
	14	7.86 ± 0.05 ^{a,B}	8.16 ± 0.02 ^{b,A}
	28	5.09 ± 0.03 ^{a,A}	8.16 ± 0.03 ^{b,A}

Values are expressed as mean ± SD. ^{a,b} Different lowercase superscript letters in a row denote significant differences between trials ($p < 0.05$); ^{A-C} Different superscript capital letters in a column for each microorganism denote significant differences during storage period ($p < 0.05$).
SFM: synbiotic fermented milk.

FIGURAS

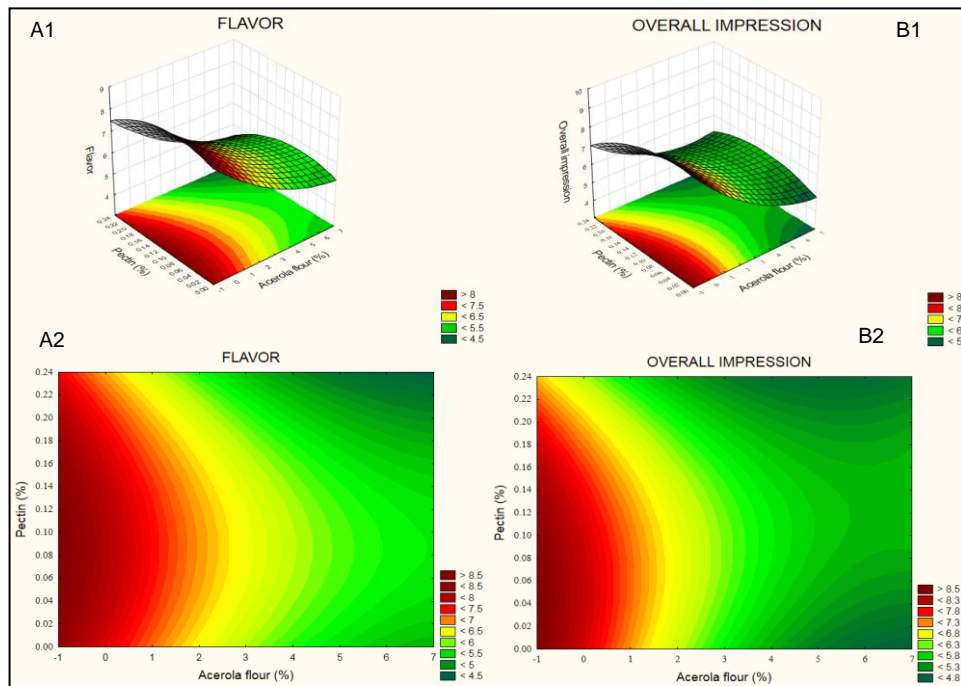


Fig 1. Response surfaces plots showing interaction effect of variables acerola flour and pectin on the flavor (A1, A2) and overall impression (B1, B2) of fermented symbiotic milk.

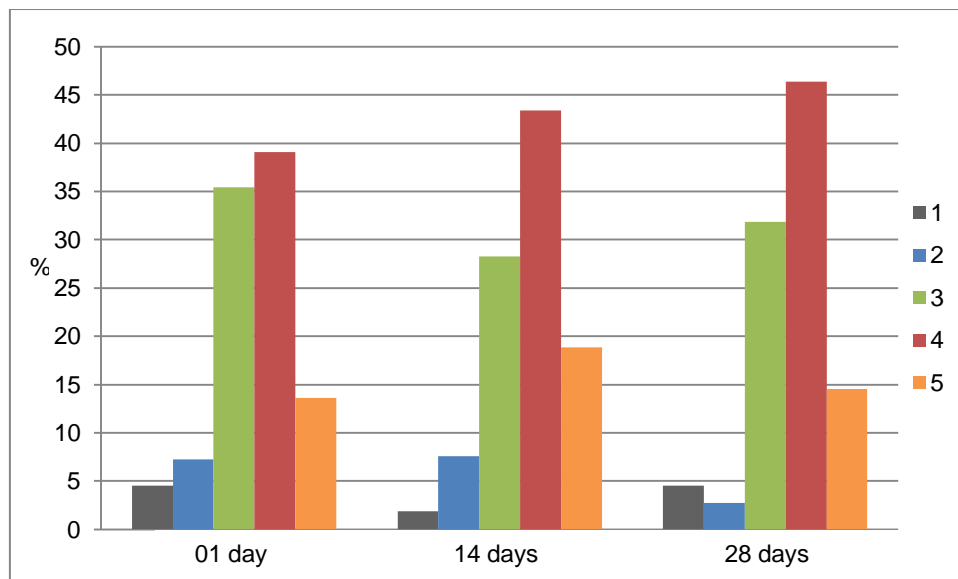


Fig 2. Intention to buy of synbiotic fermented milk after 01, 14 and 28 days of storage at 5 °C during the storage period. 1: Certainly would not buy; 2: I probably would not buy it; 3: Doubts whether to buy or not; 4: I would probably buy it; 5: I would certainly buy.

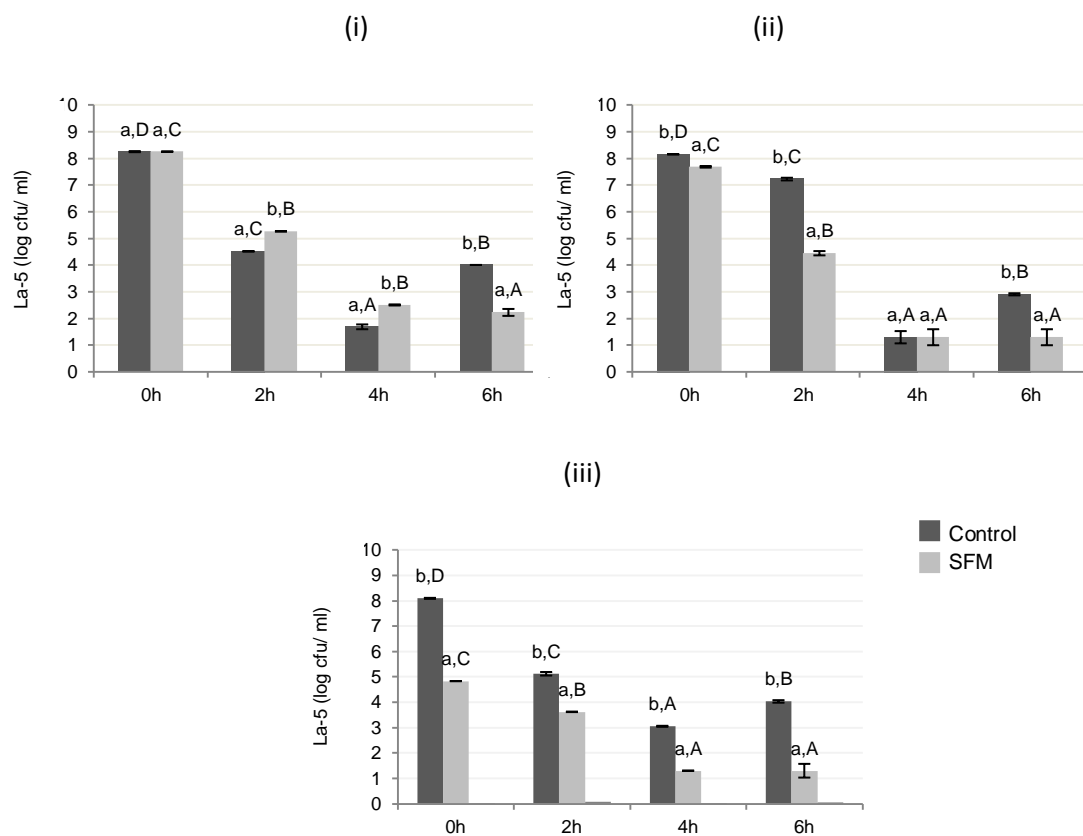


Fig 3. Survival of *L. acidophilus* La-5 (log cfu/ ml) in synbiotic and control fermented milk during storage for 01, 14 and 28 days (i, ii, iii, respectively) before (0 h) and during the exposure to *in vitro* simulated gastric (2 h) and enteric (4 and 6 h) conditions. ^{a,b} Different lowercase superscript letters in a row denote significant differences between trials ($p < 0.05$); ^{A,D} Different superscript capital letters in a column for each microorganism denote significant differences during storage period ($p < 0.05$). SFM: synbiotic fermented milk.

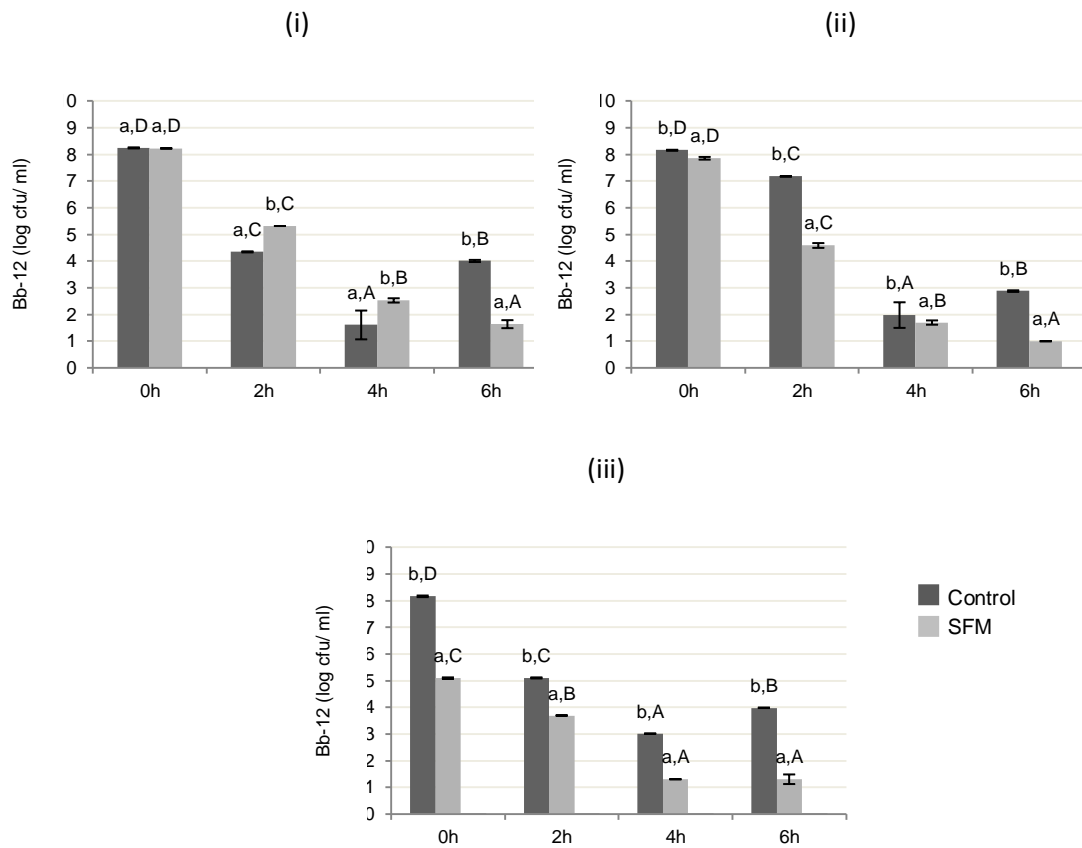


Fig 4. Survival of *L. acidophilus* La-5 (log cfu/ ml) in synbiotic and control fermented milk during storage for 01, 14 and 28 days (i, ii, iii, respectively) before (0 h) and during the exposure to *in vitro* simulated gastric (2 h) and enteric (4 and 6 h) conditions. ^{a,b} Different lowercase superscript letters in a row denote significant differences between trials ($p < 0.05$); ^{A,D} Different superscript capital letters in a column for each microorganism denote significant differences during storage period ($p < 0.05$). SFM: synbiotic fermented milk.

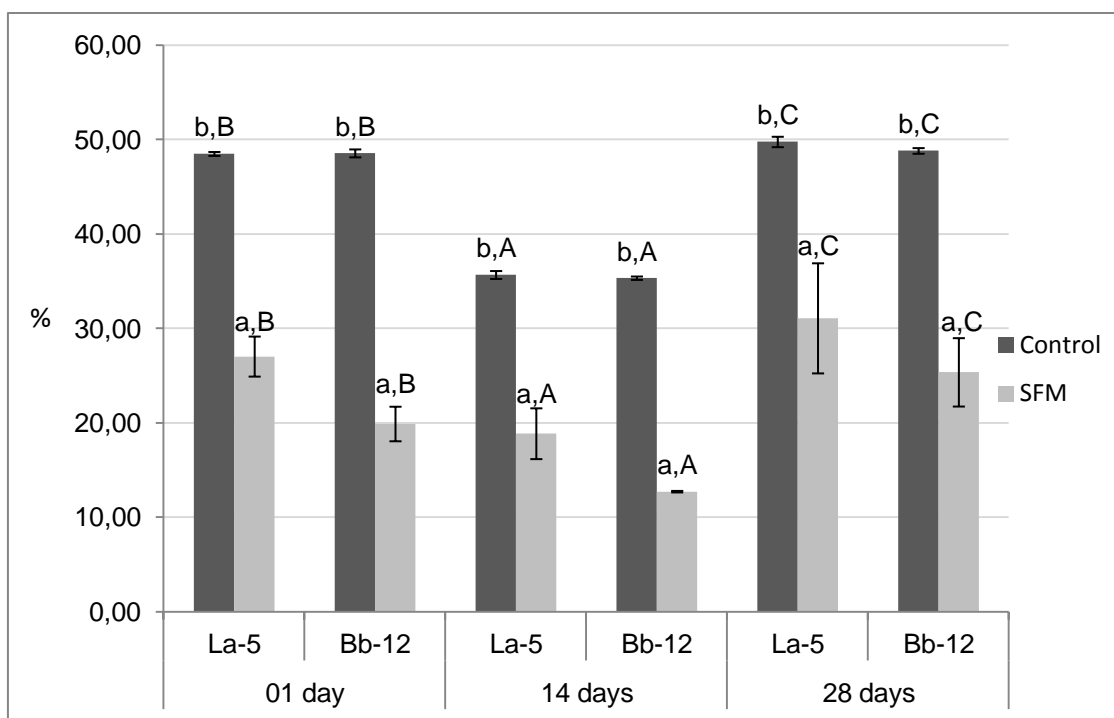


Fig 5. % survival of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb- under gastrointestinal conditions during the storage period. Values are expressed as mean \pm SD. ^{a,b} Different lowercase superscript letters in a row denote significant differences between trials ($p < 0.05$); ^{A-C} Different superscript capital letters in a column for each microorganism denote significant differences during storage period ($p < 0.05$).

APÊNDICES

APÊNDICE A - Teste de Aceitação e Intenção de Compra

Nome _____ Data _____

Prove a amostra e indique sua opinião em relação a sabor e impressão global, utilizando a escala abaixo:

- 1 - Desgostei extremamente
- 2 - Desgostei muito
- 3 - Desgostei moderadamente
- 4 - Desgostei ligeiramente
- 5 - Indiferente
- 6 - Gostei ligeiramente
- 7 - Gostei moderadamente
- 8 - Gostei muito
- 9 - Gostei extremamente

Amostra: _____

Sabor: _____

Impressão Global: _____

Assinale qual seria sua atitude em relação à compra do produto:

- () Eu certamente **não** compraria este produto
- () Eu provavelmente **não** compraria este produto
- () Tenho dúvidas se compraria ou não este produto
- () Eu provavelmente compraria
- () Eu certamente compraria este produto

Comentários:

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____, RG _____,
Estado Civil _____, Idade _____ anos, residente na
_____, nº _____, Bairro
_____, Cidade _____, Telefone
_____.

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem por finalidade desenvolver um iogurte simbiótico formulado a partir de resíduo de acerola, pectina e *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium lactis* BB-12 e *Streptococcus thermophilus*/BiRich® e avaliar a resistência do iogurte simbiótico às condições gastrointestinais *in vitro*;
2. Ao participar desse trabalho estarei contribuindo com a análise sensorial das formulações;
3. A minha participação como voluntário terá a duração de cinco meses, sendo de outubro a dezembro de 2015 e março e abril de 2016;
4. Ao participar dessa pesquisa poderei me sentir constrangido durante a avaliação das formulações, Para isso, as julgarei em cabines individuais, providas de água filtrada e cuspidouro;
5. Após a ingestão do produto fermentado, a possibilidade de haver alguma disfunção gastrointestinal ou quaisquer outros riscos associados é pequena, Caso surja quaisquer sintomas relacionados com o sistema gastrointestinal informar imediatamente a equipe envolvida nesse estudo;
6. Não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo;
7. Meu nome será mantido em sigilo, assegurando assim a minha privacidade e se desejar, serei informado sobre os resultados dessa pesquisa (pela instituição ou profissional competente);
8. Estou ciente de que a análise sensorial realizada será utilizada exclusivamente somente nesse estudo;
9. Poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum prejuízo ou penalização;

10. Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos poderei entrar em contato com a equipe científica do projeto pelo telefone (16) 996061380 com Letícia Sgarbosa;

11. Para notificação de qualquer situação, relacionada com a ética, que não puder ser resolvida pelos pesquisadores deverei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, pelo telefone (0XX16) 3301-6897,

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é um documento emitido em duas vias, sendo uma via de posse do voluntário e outra de posse do pesquisador,

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar, como voluntária(o), do estudo “DESENVOLVIMENTO DE IOGURTE SIMBIÓTICO COM PECTINA E RESÍDUO DE ACEROLA E RESISTÊNCIA DO PROBIÓTICO EM MODELO DE DIGESTÃO GASTROINTESTINAL *IN VITRO*”

Araraquara, _____ de _____ de _____

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Pesquisador