

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/06/2019.

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 puniceifolia* 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).

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.