

MARCELA SARMENTO VALENCIA

**DESENVOLVIMENTO DE SOBREMESA LÁCTEA CREMOSA
DE CHOCOLATE ADICIONADA DE FRUTO-
OLIGOSSACARÍDEO E *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
LBC 81**

RECIFE – PE

2015

Marcela Sarmiento Valencia

**Desenvolvimento de sobremesa láctea cremosa de chocolate
adicionada de fruto-oligossacarídeo e *Lactobacillus paracasei*
subsp. *paracasei* LBC 81**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Nutrição do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco, para obtenção do grau
de Mestre em Nutrição.

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Co-orientador(a): Prof.^a Dr.^a Silvana Magalhães Salgado

Recife – PE

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

V152d Valencia, Marcela Sarmento.
Desenvolvimento de sobremesa láctea cremosa de chocolate
adicionada de fruto-oligossacarídeo e *Lactobacillus paracasei* subsp.
paracasei LBC 81 / Marcela Sarmento Valencia. – Recife: O autor, 2015.
69 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Tânia Lúcia Montenegro Stamford.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2015.
Inclui referências e apêndices.

1. Laticínios. 2. *Lactobacillus*. 3. Frutanos. 4. Viabilidade microbiana.
I. Stamford, Tânia Lúcia Montenegro (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2015-120)

Marcela Sarmiento Valencia

Desenvolvimento de sobremesa láctea cremosa de chocolate adicionada de fruto-oligossacarídeo e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81

Dissertação aprovada em:

Recife, 26/02/2015

Prof.^a Dr.^a Alda Verônica Souza Livera – UFPE

Prof.^a Dr.^a Samara Alvachian Cardoso Andrade - UFPE

Prof.^a Dr.^a Vivianne Montarroyos Padilha - UFPE

Recife - PE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Reitor

Prof.º Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice-reitor

Prof.º Silvio Romero de Barros Marques

Pró-Reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação

Prof.º Francisco de Sousa Ramos

Diretor do Centro de Ciências da Saúde

Prof.º Nicodemos Teles de Pontes Filho

Vice-Diretor do Centro de Ciências da Saúde

Prof.^a Vânia Pinheiro Ramos

Chefe do Departamento de Nutrição

Prof.^a Alda Verônica Souza Livera

Vice-Chefe do Departamento de Nutrição

Prof.^a Juliana Maria Carrazzone Borba

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Nutrição

Prof.^a Elizabeth do Nascimento

Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Nutrição

Prof.^a Margarida Angélica da Silva Vasconcelos

*Dedico este trabalho a Deus, à minha mãe, Lúcia,
luz da minha vida, e a Renato, meu amor.
Com carinho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre, pela paz, luz e amor que sempre guiaram meus caminhos, me dando força e coragem, neste presente sublime que é a vida.

À minha mãe que, com incentivo, paciência, amor e carinho, não mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Sem você, nada seria possível.

Ao meu amor querido, Renato, por todo carinho, paciência, compreensão e paz, em todas as horas. Agradeço por você me receber com amor, alegria e conforto, todos os dias.

À minha tia Sandra, por todo amor. Obrigada por ser este belo exemplo em minha vida.

À minha Orientadora Tânia, por acreditar no meu potencial. Agradeço a confiança e todo o incentivo.

À minha Co-orientadora Silvana por toda atenção e por não medir esforços para me auxiliar durante esses anos. Sua orientação dedicada e paciente foi de extrema importância no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço profundamente seus valiosos ensinamentos.

À Vivianne Montarroyos Padilha pelas importantes sugestões na condução deste trabalho, pela atenção e preciosa amizade por todos esses anos.

À professora Alda Livera, por acompanhar este trabalho desde o início, com valiosas sugestões.

À professora Samara Andrade, por ter me dado a primeira oportunidade, estando ao meu lado desde a iniciação científica. Obrigada também pela atenção e contribuição nas análises estatísticas.

Às professoras Angélica, Karina, Ruth e Viviane Lansky, pelo apoio e compreensão.

Às dedicadas estagiárias de iniciação científica Jéssica e Leidiane, pela amizade e grandiosa ajuda na realização deste trabalho. Só com vocês isto foi possível.

Às amigas, em especial Rita Oliveira pela amizade, força e compreensão em todos os momentos, principalmente nas ausências.

Ao Programa de Pós Graduação em Nutrição da UFPE por esta oportunidade única em minha vida, contribuindo com mais uma etapa na minha profissão.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo incentivo à pesquisa e bolsa concedida.

Ao Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos Prof.^a Nonete Barbosa Guerra - LEAAL, pela disponibilização de equipamentos e materiais na realização das análises experimentais. Em especial Alexandre, Artur, Camilo, Graciliane, Olívia e Vivaldo, pelo auxílio na realização de análises.

Aos provadores, que contribuíram participando da análise sensorial.

Às empresas Beneo e Fermentech por doar e fornecer ingredientes utilizados neste trabalho.

A todos, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho.

“Quando abro a porta de uma nova descoberta, já encontro Deus lá dentro”.

Albert Einstein

RESUMO

Sobremesas lácteas de chocolate despertam a atenção do consumidor, sendo novas opções para adição de probióticos e prebióticos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver sobremesa láctea cremosa, adicionada de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 e fruto-oligossacarídeo (FOS). As sobremesas controle, probiótica, e simbiótica foram caracterizadas quanto ao pH, acidez, índice de sinerese, composição centesimal e análises microbiológicas de *Bacillus cereus*, coliformes termololerantes (45°), estafilococos coagulase positivo, *Salmonella spp*, bolores e leveduras. Durante 28 dias, foram avaliadas a aceitabilidade, intenção de compra, viabilidade e tolerância do *L. paracasei* ao pH ácido. As sobremesas apresentaram bons atributos sensoriais e qualidade higiênico sanitária, não apresentaram sinerese e foram consideradas fonte de fibras alimentares. Durante o armazenamento das sobremesas probiótica e simbiótica houve redução de pH e aumento da acidez, sem interferir na viabilidade do *L. paracasei*. A simulação *in vitro* das condições gástricas demonstrou tolerância do *L. paracasei* ao pH 2,5 e 3,5 mantendo-se viável ao longo do armazenamento e em quantidades superiores a 6 log UFC/g, satisfazendo, assim, o critério para ser considerado alimento probiótico.

Palavras-chave: Laticínios. *Lactobacillus*. Frutanos. Viabilidade microbiana.

ABSTRACT

Chocolate dairy desserts awaken the attention of consumers being new options for adding probiotics and prebiotics. The objective of this study was to develop creamy dairy dessert, added *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 and fructo-oligosaccharide (FOS). The desserts control, probiotic, and symbiotic were characterized for pH, acidity, syneresis index, chemical composition and microbiological testing of *Bacillus cereus*, thermotolerant coliforms (45°), coagulase positive staphylococcus and *Salmonella spp*, molds and yeasts. For 28 days were evaluated acceptability, purchase intent, viability and tolerance of the *L. paracasei* to acidic pH. The desserts presented good sensory attributes and sanitary hygienic quality, did not show syneresis and were considered a source of dietary fiber. During storage of the desserts probiotic and synbiotic there was pH decreased and increased acidity without affecting the viability of *L. paracasei*. The *in vitro* simulation of gastric conditions demonstrated tolerance of *L. paracasei* at pH 2.5 and 3.5 keeping viable during storage and in quantities greater than 6 log CFU/g, satisfying thus the criterion to be considered probiotic food.

Keywords: Dairy products. Lactobacillus. Fructans. Microbial viability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Dissertação (Materiais e Métodos)		Página
Figura 1.	Fluxograma de elaboração das sobremesas lácteas cremosas.....	32
 Artigo		
Figura 1.	pH das sobremesas controle (C), probiótica (P) e simbiótica (S), durante 28 dias de armazenamento, à 5°C.....	44
Figura 2.	Valores de acidez titulável obtidos para as sobremesas controle (C), probiótica (P) e simbiótica (S), durante 28 dias de armazenamento, a 5°C.....	45
Figura 3.	Sobrevivência do <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> LBC 81 adicionado em sobremesas lácteas cremosas P e S durante 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado a 5°C.....	48

LISTA DE TABELAS

Dissertação (Materiais e Métodos)	Página
Tabela 1. Quantidade dos ingredientes ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$) utilizados na formulação das sobremesas lácteas cremosas.....	31
 Artigo	
Tabela 1. Quantidade dos ingredientes ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$) utilizados na formulação das sobremesas lácteas cremosas.....	39
Tabela 2. Composição centesimal das sobremesas lácteas cremosas controle (C), probiótica (P) e simbiótica (S) no 1º e 28º dia de armazenamento sob refrigeração (5°C).....	43
Tabela 3. Médias dos valores da aceitabilidade das sobremesas lácteas cremosas.....	46
Tabela 4. Contagem de <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> LBC 81 em sobremesa láctea cremosa após 1 hora, em pH 1,5, 2,5 e 3,5, durante a estocagem ($\log \text{UFC/g}$)	50
Tabela 5. Contagem de <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> LBC 81 em sobremesa láctea cremosa após 2 horas, em pH 1,5, 2,5 e 3,5, durante a estocagem ($\log \text{UFC/g}$)	50

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
3.1 Alimentos funcionais.....	21
3.2 Sobremesas lácteas.....	22
3.3 Probióticos.....	23
3.4 <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	25
3.5 Prebióticos.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Material.....	30
4.1.1 Ingredientes e cultura probiótica.....	30
4.2 Métodos.....	30
4.2.1 Preparo da cultura láctea.....	30
4.2.2 Elaboração do produto.....	30
4.2.3 Composição química das sobremesas lácteas cremosas.....	32
4.2.4 Estabilidade das sobremesas lácteas cremosas durante o armazenamento refrigerado.....	33
4.2.5 Análise Estatística.....	35
4.2.6 Considerações Éticas.....	35
5 DESENVOLVIMENTO DE SOBREMESA LÁCTEA CREMOSA DE CHOCOLATE ADICIONADA DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEO E <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> LBC 81.....	37
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICE.....	66

Apresentação

1 APRESENTAÇÃO

É crescente o interesse da população por alimentos que além de fornecer os nutrientes básicos promovam o bem estar, tendo em vista as comprovações científicas das relações existentes entre a dieta e a saúde. O tecnólogo de alimentos tem o desafio de desenvolver novos produtos saudáveis, atrativos, tornando a alimentação um ato prazeroso, que ao mesmo tempo promova a saúde e o bem estar. Em resposta à demanda por alimentos funcionais, uma grande variedade de compostos bioativos tem surgido desde os anos 80, com destaque para os alimentos simbióticos (NOBRE, SUVAROV; De WEIRELD, 2014).

A combinação de micro-organismos probióticos e ingredientes prebióticos, sinergicamente, promovem mais benefícios para a saúde do que o consumo individual do probiótico. Isso ocorre porque há uma interação entre o micro-organismo e o substrato prebiótico ainda no produto, ou seja, anterior ao consumo, resultando em uma vantagem competitiva para o micro-organismo, favorecendo sua adaptação à microbiota intestinal humana, a multiplicação e, por consequente, ação funcional (AL-SHERAJI *et al.* 2013).

O desenvolvimento de novos produtos funcionais tem foco nos benefícios que as bactérias probióticas promovem ao manter um equilíbrio da microbiota intestinal do hospedeiro. Qualquer desequilíbrio nessa microflora pode favorecer a multiplicação de bactérias patogênicas, alterando a saúde do indivíduo (BUTEL, 2014).

Dentre os alimentos funcionais, os laticínios merecem destaque, visto que, os consumidores já estão familiarizados com o fato de que essas formulações apresentam bactérias benéficas à saúde, facilitando o consumo de probióticos. Além disso, possuem ingredientes inovadores e sistemas tecnológicos aplicados na indústria láctea, já adaptados e otimizados à sobrevivência dos probióticos (KOMATSU *et al.* 2008; GRANATO *et al.* 2010; VIDIGAL *et al.* 2012).

Além de permanecerem viáveis no produto, o maior desafio dos probióticos é sobreviver às condições adversas de baixo pH e presença de enzimas proteolíticas estomacais, chegando em quantidade satisfatória no intestino. No que diz respeito aos micro-organismos, o *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* vem sendo bastante utilizado, devido a suas comprovadas propriedades probióticas, atestada viabilidade tecnológica de suas cepas e, principalmente, por não alterar as características organolépticas quando incorporados aos produtos lácteos (BALLUS *et al.* 2010)

O fruto-oligossacarídeo (FOS) vem sendo incorporado como ingrediente prebiótico em diversos produtos, pois, pode potencializar os efeitos dos probióticos, e apresenta

propriedades tecnológicas comparáveis às do açúcar, com a vantagem de fornecer aproximadamente um terço das calorias da sacarose. Suas características físico-químicas o tornam um ingrediente ideal para a indústria de alimentos, conferindo maciez e consistência a diversos produtos (PIMENTEL *et al.* 2012; DELGADO *et al.* 2013).

Dos produtos lácteos simbióticos existentes no mercado, há o predomínio dos alimentos fermentados que, ao longo do armazenamento, podem desenvolver sabores muito ácidos, indesejáveis por muitos consumidores. Logo, é relevante o desenvolvimento de novos produtos não fermentados, mais atrativos e com novos aspectos organolépticos, a exemplo das sobremesas lácteas cremosas, para aumentar a oferta de produtos e devido a grande aceitação. Estes produtos lácteos são apreciados pelos consumidores e formulados com vários ingredientes, que interagem, resultando numa grande variedade de texturas e sabores que, por sua vez, influenciam as características físicas e sensoriais do produto, com efeitos diretos sobre a aceitação dos consumidores. Portanto, são novas opções para o desenvolvimento de produtos simbióticos inovadores (MORAIS *et al.* 2014).

Diante dos benefícios associados aos probióticos e prebióticos, este trabalho teve como objetivo desenvolver sobremesa láctea cremosa de chocolate, adicionada de FOS e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 e avaliar a estabilidade do produto do ponto de vista sensorial, físico-químico e funcional durante a estocagem refrigerada.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver sobremesa láctea cremosa de chocolate, adicionada de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 e/ou fruto-oligossacarídeo (FOS).

2.2 Objetivos específicos

- Analisar as características físico-químicas das sobremesas lácteas cremosas;
- Avaliar as propriedades sensoriais das formulações propostas durante o armazenamento;
- Determinar a viabilidade da bactéria probiótica (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81) durante estocagem;
- Testar a tolerância do *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 a diferentes condições ácidas, *in vitro*, durante o armazenamento;

Revisão da Literatura

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Alimentos funcionais

Durante a última década as exigências dos consumidores em relação à qualidade dos alimentos mudaram consideravelmente. Cada vez mais há uma conscientização que os produtos alimentícios contribuem diretamente para a saúde do indivíduo. Assim, os consumidores estão à procura de alimentos que, além de satisfazer a fome e fornecer os nutrientes necessários, sejam capazes de reduzir o risco do desenvolvimento de doenças e que melhorem o bem-estar físico e mental (NOBRE, SUVAROV; De WEIRELD, 2014).

A popularidade dos alimentos funcionais tem aumentado nos últimos anos. Estes produtos são definidos como “alimentos naturais ou processados que contêm compostos biologicamente ativos conhecidos que, quando dosados em quantidades qualitativamente e quantitativamente definidas, fornecem benefícios à saúde, clinicamente comprovados e documentados, sendo assim, uma importante fonte na prevenção, gestão e tratamento de doenças crônicas da era moderna” (Di BARTOLOMEO, STARTEK; VAN DEN ENDE, 2013; SAAD; BEDANI, 2013).

Os alimentos funcionais dominam o mercado alimentício desde o início do século XXI. De fato, mais de 1.700 produtos foram lançados no mercado japonês, berço dos alimentos funcionais, entre 1988 e 1998, com um faturamento estimado de cerca de U\$ 14 milhões em 1999. Em 2005, mais de 500 novos produtos foram rotulados como funcionais e em 2006 o mercado foi estimado em U\$ 5.730 bilhões. O mercado mundial de alimentos funcionais deve crescer 38% até o ano de 2017, com faturamento estimado para US\$ 207 bilhões (SAAD *et al.* 2013).

É estimado que 60 a 70% do mercado de alimentos funcionais seja dominado pelos produtos probióticos. O sucesso desses produtos é significativo e pode ser observado pela grande variedade existente, dentre eles leites fermentados, sorvetes, vários tipos de queijo, alimentos para bebês, leite em pó, creme de leite e soro de leite coalhado. Pode-se observar o predomínio dos produtos de base láctea disponíveis contendo micro-organismos probióticos (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Os laticínios são considerados o principal veículo para o fornecimento das bactérias probióticas ao trato gastrointestinal humano, devido às características do leite, como sua composição química, efeito tamponante e protetor, fato fundamental nessa expansão láctea probiótica. No entanto, alguns fatores como o teor de gordura, concentração e tipo de

proteínas, açúcares e pH do produto podem afetar o crescimento do probiótico e sua sobrevivência em alimentos (BALLUS *et al.* 2010; RANADHEERA *et al.* 2010).

É importante que a cultura probiótica contribua para as boas propriedades sensoriais do produto. Portanto, é necessário estudar a aceitação do consumidor antes de lançar novos alimentos no mercado. Alguns produtos lácteos probióticos fermentados podem apresentar *off flavour*, originado a partir de culturas capazes de produzir substâncias, como o ácido acético, que promovem um forte sabor ácido e aroma indesejável aos laticínios, diminuindo a aceitação, com consequente recusa da ingestão por alguns consumidores. Uma alternativa eficaz para superar esta possível característica organoléptica indesejada é a adição de probióticos em produtos não fermentados, possibilitando aumento do consumo de laticínios funcionais por consumidores que não possuem o hábito de ingerir alimentos fermentados e promovendo o bem-estar a um maior número de pessoas (GRANATO *et al.* 2010).

3.2 Sobremesas lácteas

A comercialização de sobremesas lácteas prontas para consumo tem apresentado considerável crescimento, pois, os ingredientes inovadores e sistemas tecnológicos aplicados nas indústrias de laticínios têm proporcionado novas alternativas às sobremesas clássicas, permitindo a produção de produtos com novos sabores, de melhor valor nutritivo, além de oferecer a oportunidade de explorar a adição de probióticos e prebióticos (VIDIGAL *et al.* 2012; KOMATSU *et al.* 2013).

No Brasil não existe uma legislação específica com definição de padrões de identidade e qualidade para sobremesas lácteas. A composição das sobremesas difere quanto aos ingredientes e suas concentrações utilizadas, assim como na forma de preparo, sendo possível englobar neste grupo todos os produtos em que o leite desempenhe um papel relevante na sua composição. Normalmente apresentam consistência semi-sólida e são basicamente formuladas com leite, hidrocolóides, aroma e corantes. Sua estabilidade depende da tecnologia de fabricação, características intrínsecas de cada ingrediente e estocagem sob condições refrigeradas (ARES *et al.* 2013).

As condições de processamento têm importância fundamental na preparação das sobremesas e devem ser estabelecidas de acordo com a formulação. O processo de fabricação é constituído basicamente das etapas de preparo da mistura, tratamento térmico, homogeneização, resfriamento parcial e estocagem sob refrigeração (NIKAEDO, AMARAL; PENNA, 2004).

Sobremesas lácteas de chocolate são amplamente consumidas em todo o mundo, por consumidores de diferentes faixas etárias, despertando atenção devido as suas características sensoriais como cor, sabor e aroma. Diante disso, são inovadores exemplos de matriz alimentar para culturas probióticas, já que possuem condições favoráveis ao desenvolvimento desses micro-organismos, uma vez que apresentam pH maior que 6,0, umidade superior a 70%, não são fermentados, portanto, não possuem culturas “starter” para competir com os micro-organismos probióticos (ARAGON-ALEGRO *et al.* 2007; SILVA *et al.* 2012).

3.3 Probióticos

Probióticos são atualmente definidos como “micro-organismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro”. A era dos probióticos realmente começou com o ganhador do Prêmio Nobel, Elie Metchnikoff, que correlacionou, no início do Século XX, a longevidade de camponeses búlgaros com seu alto consumo de produtos lácteos fermentados. Essa correlação o levou a sugerir que talvez “nem todos os micróbios são perigosos para a saúde” e que poderia ser benéfico enriquecer a microflora intestinal com bactérias capazes de fermentar a glicose, tais como bactérias lácticas, em substituição aos micro-organismos nocivos (BUTEL, 2014).

Posteriormente, diferentes micro-organismos probióticos foram utilizados, devido sua capacidade de prevenir e curar doenças. O mecanismo de ação dos probióticos não é bem esclarecido. Sugere-se que uma forma de ação é o efeito “barreira”, exercido contra bactérias patogênicas, impedindo ou limitando a sua colonização. Outra forma de ação diz respeito à melhoria da função de barreira da mucosa do intestino, relacionada com a qualidade das junções entre as células epiteliais intestinais além da produção de substâncias antimicrobianas no muco, que atuam como uma camada protetora impedindo qualquer contato das bactérias com o lúmen intestinal. Um terceiro modo de ação, é a modulação do sistema imunológico, que abrange mais de 70% das células do sistema imune, localizadas no intestino, especialmente no intestino delgado (BUTEL, 2014).

De maneira geral, os benefícios atribuídos aos probióticos são o reestabelecimento e balanço da microflora intestinal após antibioticoterapia, aumento da concentração de ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato), produção de ácido linoleico conjugado (CLA), ação bactericida contra micro-organismos patogênicos, modulação do sistema imune, maior digestibilidade da lactose em indivíduos intolerantes, redução do risco de distúrbios intestinais, aumento da biodisponibilidade de nutrientes, atividade anti-carcinogênica,

controle da pressão arterial, diminuição do risco de doenças atópicas e alergia, redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori* e controle da colite induzida por rotavírus e por *Clostridium difficile* (VASILJEVIC; SHAH, 2008; SAAD *et al.* 2013).

Para uma bactéria probiótica fornecer benefícios à saúde humana, deve cumprir alguns critérios. O micro-organismo deve ser adequado para a produção industrial, deve possuir capacidade de sobrevivência e conservar sua funcionalidade durante o processamento e estocagem do produto, até o término do seu prazo de validade, sem promover o desenvolvimento de sabores ou texturas desagradáveis. Deve também sobreviver à passagem do trato gastrointestinal superior, chegando viável ao seu local de atuação, sendo capaz de exercer suas funções neste ambiente (ORTAKCI, *et al.* 2012; TRIPATHI; GIRI, 2014).

Para ser capaz de cumprir todos esses critérios, é essencial que os produtos probióticos contenham um número satisfatório de células ativas no momento do consumo. Vários trabalhos, baseados em diversas regulamentações mundiais, propuseram que a dose mínima diária de culturas probióticas considerada terapêutica corresponde ao consumo de 100 g de produto contendo 6 a 7 log UFC/g. Atualmente, no Brasil, a recomendação é com base na porção diária de micro-organismos viáveis que devem ser ingeridos, sendo o mínimo estipulado de 8 a 9 log UFC/dia (BRASIL, 2008; CHAMPAGNE *et al.* 2011).

Para que os probióticos cheguem viáveis e em quantidade satisfatória ao intestino, inicialmente, os micro-organismos devem resistir às condições adversas do estômago. O suco gástrico é geralmente a mais forte barreira para os micro-organismos probióticos, visto que, possui pepsina, enzima proteolítica com atividade antimicrobiana, e possui pH ácido (SCHELL; BEERMANN, 2014).

A sobrevivência durante às condições gástricas simuladas depende da extensão da neutralização do HCl pelo alimento, conferindo uma proteção física às bactérias. Portanto, é importante a simulação das condições gástricas para que ocorra a seleção de uma matriz alimentar adequada, que contribua para a sobrevivência de quantidades adequadas do probiótico ao trato intestinal humano, promovendo benefícios ao hospedeiro. Como as condições normais de pH e o tempo de residência em sucos gástricos não estão totalmente elucidados, são relevantes estudos sobre a resistência dos probióticos à soluções ácidas com valores de pH variando de 2,0 até 4,0, durante tempo de 20 a 180 minutos (BURITI, CASTRO; SAAD, 2010; ORTAKCI *et al.* 2012; XIE, ZHOU; LI, 2012).

3.4 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*

Muitos benefícios à saúde têm sido associados ao consumo do *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, incluindo atividade antimicrobiana, propriedades antimutagênicas, anticancerígenas e antioxidante, além da estimulação do sistema imunológico (PIMENTEL, CRUZ; PRUDENCIO, 2013).

Bertazzoni Minelli *et al.* (2004) demonstraram a alta resistência de cepas de *L. paracasei* ao estresse gastrointestinal e, adicionalmente, constataram a sua capacidade de aderência às células do epitélio intestinal. Estudos *in vivo* apontaram para as possíveis atividades de imunomodulação e modulação do colesterol atribuídas ao *L. paracasei*. Lin *et al.* (2004) e Chiu *et al.* (2006) relataram que o *L. paracasei* reduziu os níveis de colesterol em ratos hipercolesterolêmicos. Medici *et al.* (2004) estudou a capacidade imunomoduladora do *L. paracasei* incorporado em queijo fresco, demonstrando que este micro-organismo foi capaz de aumentar o número de células produtoras de imunoglobulina A em camundongos.

O gênero *Lactobacillus* também tem uma longa história de uso seguro, especialmente na indústria de laticínios, e desempenha um papel importante na produção de produtos lácteos fermentados, os quais, são a maior (~70%) fonte de cálcio na dieta, além de serem fonte de outros minerais e de água, elementos fundamentais para a proliferação e o crescimento das bactérias, o que facilita sua adaptação neste tipo de produto (ALJEWICZ *et al.* 2014).

Bactérias do grupo *Lactobacillus casei* são frequentemente aplicadas na fabricação de diversos produtos lácteos probióticos, destacando-se o *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, devido suas propriedades tecnológicas de bastante. Possui boa capacidade de multiplicação, sendo estável e viável durante todo o processamento e armazenamento, além de compatibilidade e adaptabilidade aos laticínios, originando um produto com características satisfatórias de textura, pH e sabor. A aplicação do *L. paracasei* em novos tipos de produtos de matriz láctea tem aumentado consideravelmente, também, pelo fato de ser um dos maiores representantes quando se trata da colonização da microflora intestinal humana, apresentando-se, portanto, associado a propriedades funcionais (DOLINSKY, 2009; BALLUS *et al.* 2010; GRANATO *et al.* 2010).

No estudo desenvolvido por Buriti *et al.* (2007), inulina e *L. paracasei* em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* foram utilizados na fabricação de queijo fresco cremoso. Nesse estudo os autores observaram que a viabilidade do *L. paracasei* permaneceu acima de 7 log UFC/g durante os 21 dias de armazenamento refrigerado. Aragon-Alegro *et al.* (2007) desenvolveram musse de chocolate adicionado de *L. paracasei* e inulina, apresentando

viabilidade acima de 7 log UFC/g durante 28 dias de armazenamento, sem interferir nas características sensoriais do produto. Corrêa, Castro; Saad (2008) analisaram a viabilidade do *L. paracasei* isolado e em co-cultura com o *Bifidobacterium longum* em manjar branco, cuja contagem permaneceu acima de 7 log UFC/g durante 28 dias de armazenamento refrigerado, com elevada aceitabilidade sensorial.

3.5 Prebióticos

Prebiótico foi definido pela primeira vez em 1995 por Gibson e Roberfroid como “ingrediente alimentar não digerível que afeta o hospedeiro benéficamente, estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade de um número limitado de bactérias no cólon, e assim, melhorando a saúde do hospedeiro”. Esta definição foi atualizada e prebiótico é definido como “um ingrediente fermentado seletivamente que permite alterações específicas, na composição e/ou na atividade microbiota gastrointestinal que confere benefícios sobre o bem-estar e saúde do hospedeiro” (SAAD *et al.* 2013).

O desenvolvimento de um produto funcional adicionado de ingredientes prebióticos é de grande interesse na nutrição humana. A adição desses ingredientes aos alimentos lácteos é uma realidade e tem sido explorada pela indústria alimentícia. Os benefícios para a saúde associados aos prebióticos incluem uma modificação benéfica na composição da microflora intestinal, o aumento da absorção mineral, melhora da resposta imune, prevenção e terapia do câncer colorretal, além da produção de alguns compostos finais da fermentação, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Seu papel na sensação de saciedade e controle de peso também está sendo investigado (MORRIS; MORRIS, 2012; MORAIS *et al.* 2014).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária reconhece os ingredientes inulina e fruto-oligossacarídeos (FOS) com propriedades prebióticas. A União Europeia inclui no conceito de prebiótico, além de inulina e FOS, os galacto-oligossacarídeos (GOS) e a lactulose (BRASIL, 2008; KOLIDA; GIBSON, 2011).

O FOS, frutano do tipo inulina, é um oligossacarídeo, no qual, uma ou mais ligações frutossil-frutose representam a maioria das ligações glicosídicas. Seu grau de polimerização (DP) representa o número de monossacarídeos que compõe a molécula ($DP < 10$) e pode influenciar nas propriedades destes ingredientes, como digestibilidade, atividade prebiótica, poder adoçante e capacidade de absorção de água. Pode ser adicionado aos alimentos com as finalidades de alegação das propriedades funcionais, suplemento (aumento do teor de fibras) e

como substituto de açúcares e gorduras (ROBERFROID, 2005; MARTINS, DELMASCHIO; CORDEIRO, 2011).

Pela ausência de enzimas que hidrolisem ligações do tipo β no trato gastrintestinal humano, o FOS não é metabolizado, sendo, portanto, considerado fibra alimentar. Ao chegar intacto no intestino grosso, serve de substrato a bactérias benéficas naturalmente existentes no cólon, sendo fermentado, com conseqüente formação de ácido láctico, ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) e gases. Estes produtos são responsáveis pela redução do pH intestinal e estimulação da proliferação de células epiteliais do cólon (PADILHA, ROLIM; SALGADO, 2010; QUIGLEY, 2010; HABIB *et al.* 2011).

Alguns efeitos benéficos atribuídos ao FOS são a modulação de funções fisiológicas, como aumento da absorção de cálcio com conseqüente redução da osteoporose, auxílio na síntese de vitaminas do complexo B, diminuição dos fatores de risco de diabetes e arteriosclerose, alívio da constipação intestinal, fortalecimento do sistema imunológico, proteção contra o câncer de cólon e síndrome metabólica, hipocolesterolemia e a modulação da composição da microbiota intestinal. Recentemente foi proposto que o FOS é capaz de exercer, diretamente, efeitos antimicrobianos (COSTA; ROSA, 2010; PESHEV; VAN DEN ENDE, 2014).

Com relação ao estímulo à proliferação das bactérias probióticas, diversos estudos mostram que as contagens dos micro-organismos permanecem estáveis enquanto houver a ingestão do FOS, porém, o número de bactérias decresce progressivamente quando cessada a administração do prebiótico, sugerindo que o efeito benéfico associado a esses compostos persiste apenas enquanto estiverem presentes na dieta. Para promover a proliferação do probiótico, deve haver o consumo de doses a partir de 4 a 5g até 20g de FOS, administradas diariamente durante pelo menos 15 dias. Pesquisas atentam para ingestões superiores a 30g/dia, visto que podem ocasionar efeitos adversos (ROBERFROID, 2007; BRASIL, 2008; SAAD *et al.* 2011).

Estudos *in vitro* e *in vivo* investigaram a toxicidade do FOS, com doses bastante superiores às recomendadas, não evidenciando qualquer potencial genotóxico, carcinogênico, nem toxicidade subcrônica. Portanto, assim como no consumo excessivo de produtos contendo outros tipos de fibras, o FOS apresenta risco de promover a diarreia, flatulência, cólicas e distensão abdominal, sendo estes sintomas reversíveis com a interrupção da ingestão (SILVA *et al.* 2007).

As propriedades tecnológicas do FOS permitem que ele seja aplicado em diferentes produtos, como fonte de fibras, melhorando o sabor, paladar, textura, além do tempo de

conservação dos alimentos. Se comparado à sacarose, apresenta elevada solubilidade e 30 a 50% de poder adoçante, sendo este baixo grau de doçura útil em produtos nos quais se deseja salientar outros sabores. Como resultado, o FOS pode ser utilizado como adoçante, em substituição total ou parcial do açúcar, reduzindo o teor de calorias (fornece de 1 a 1,5 Kcal/g) e aumentando a concentração de fibras (PIMENTEL *et al.* 2012; NOBRE, SUVAROV; De WEIRELD, 2014).

O FOS é um ingrediente alimentar versátil para a indústria de alimentos devido suas características químicas e físico-químicas. É altamente estável em alimentos com pH superiores a 4, temperatura superior a 140° C, umidades superiores a 70%, e armazenamento em temperaturas inferiores a 10° C. Atua também como ligante, devido a sua propriedade de retenção de água, formando soluções menos ou mais viscosas, não cristalizam, não precipitam nem deixam sabor residual, preservando as propriedades organolépticas do produto. Em laticínios, o FOS é responsável pelo aumento da estabilidade, redução da sinerese e aumento da viscosidade, resultando em produtos mais encorpados e de melhor sabor (SAAD, 2011; DELGADO *et al.* 2013).

Essas características comprovam a eficácia do FOS em novas formulações conferindo consistência a produtos lácteos, maciez a produtos de panificação, como, bolos de chocolate *light* e pães de forma sem adição de gordura, crocância em biscoitos com baixo teor de gordura, ligante em barras de cereais, sobremesas e alimentos infantis (PADILHA, ROLIM; SALGADO, 2010; PIMENTEL, GARCIA; PRUDENCIO, 2012).

Diante da diversidade de aplicações em alimentos e dos benefícios funcionais associados aos probióticos e prebióticos, torna-se relevante o desenvolvimento de sobremesa láctea cremosa de chocolate simbiótica, adicionada de FOS e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 tendo em vista a comprovação de suas propriedade funcionais e sensoriais.

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Ingredientes e cultura probiótica

Para a elaboração das sobremesas lácteas foram utilizados os seguintes ingredientes: leite integral UHT (Parmalat, Muriaé, MG, Brasil), açúcar refinado granulado (União, Coopersucar União, Limeira, SP, Brasil), chocolate em pó solúvel (Nestlé, Araras, SP, Brasil), chocolate meio amargo (Nestlé, SP, Brasil), amido de milho (Unilever, Garanhuns, PE, Brasil) e goma xantana (Rhodigel 80, Rhodia, Melle, França).

A cultura probiótica liofilizada foi o *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 (Danisco, Dangé, França), do tipo DVS (*Direct vat set* = para adição direta) e, como ingrediente prebiótico, utilizou-se o fruto-oligossacarídeo (P95, Orafti, Bélgica).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo da cultura láctea

Foi realizada a dissolução asséptica da cultura probiótica (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81), em um litro de leite desnatado UHT. A mistura foi homogeneizada, distribuída em recipientes de 20 mL e armazenada sob temperatura de -18°C, ao longo de todo o período das análises, sendo descongelada no momento de sua inoculação (0,5%). Após descongelamento sob refrigeração (5°C), era realizada uma pré-incubação da cultura em estufa, por 2 horas a 37°C.

4.2.2 Elaboração do produto

Três sobremesas foram desenvolvidas:

- **Sobremesa C:** Controle, sem adição de micro-organismo probiótico e/ou fruto-oligossacarídeo (FOS);
- **Sobremesa P:** Probiótica, com adição de micro-organismo probiótico (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81);

- **Sobremesa S:** Simbiótica, adicionada de micro-organismo probiótico (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81) e fruto-oligossacarídeo (P95, Orafti, Bélgica);

Para elaboração das formulações, ensaios preliminares foram realizados, com a finalidade de adequar as concentrações de cada ingrediente. As quantidades utilizadas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Quantidades dos ingredientes (g 100g⁻¹) utilizados na formulação das sobremesas lácteas cremosas.

Ingredientes	Sobremesas		
	C	P	S
Leite integral UHT	80,8	80,3	77,1
Açúcar	6	6	5,8
Chocolate em pó	5	5	4,8
Chocolate meio amargo	4	4	3,8
Amido de milho	4	4	3,8
Goma xantana	0,2	0,2	0,2
Fruto-oligossacarídeo	-	-	4
<i>Lactobacillus paracasei</i> LBC 81	-	0,5	0,5
Total	100	100	100

C = Controle, sem adição de micro-organismo probiótico ou ingrediente prebiótico.

P = Probiótica, adicionada de micro-organismo probiótico (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81, Danisco, Dangé, França).

S = Simbiótica, adicionada de micro-organismo probiótico (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81, Danisco) e ingrediente prebiótico fruto-oligossacarídeo (P95, Orafti, Bélgica).

Para a elaboração das sobremesas, o açúcar, chocolate em pó, chocolate meio amargo, amido de milho e a goma xantana foram adicionados ao leite integral UHT e mantidos sob aquecimento (75°C), com agitação constante, por cinco minutos, para dissolução completa dos ingredientes. Na sobremesa S, foi adicionado o fruto-oligossacarídeo (FOS) ao leite integral, juntamente com os demais ingredientes.

A Figura 1 apresenta o fluxograma com as etapas de elaboração das sobremesas lácteas cremosas.

Após aquecimento das sobremesas P e S, houve o resfriamento da mistura, em banho de gelo, até atingir temperatura de inoculação da cultura probiótica (37°C).

Após a pré-incubação em estufa (37°C por 2 horas), o micro-organismo foi inoculado, em condições assépticas, e a mistura foi homogeneizada. Em seguida, as sobremesas lácteas cremosas foram acondicionadas em recipientes plásticos tampados (material poliestireno), contendo cerca de 50g, e mantidas sob refrigeração a 5°C por 28 dias.

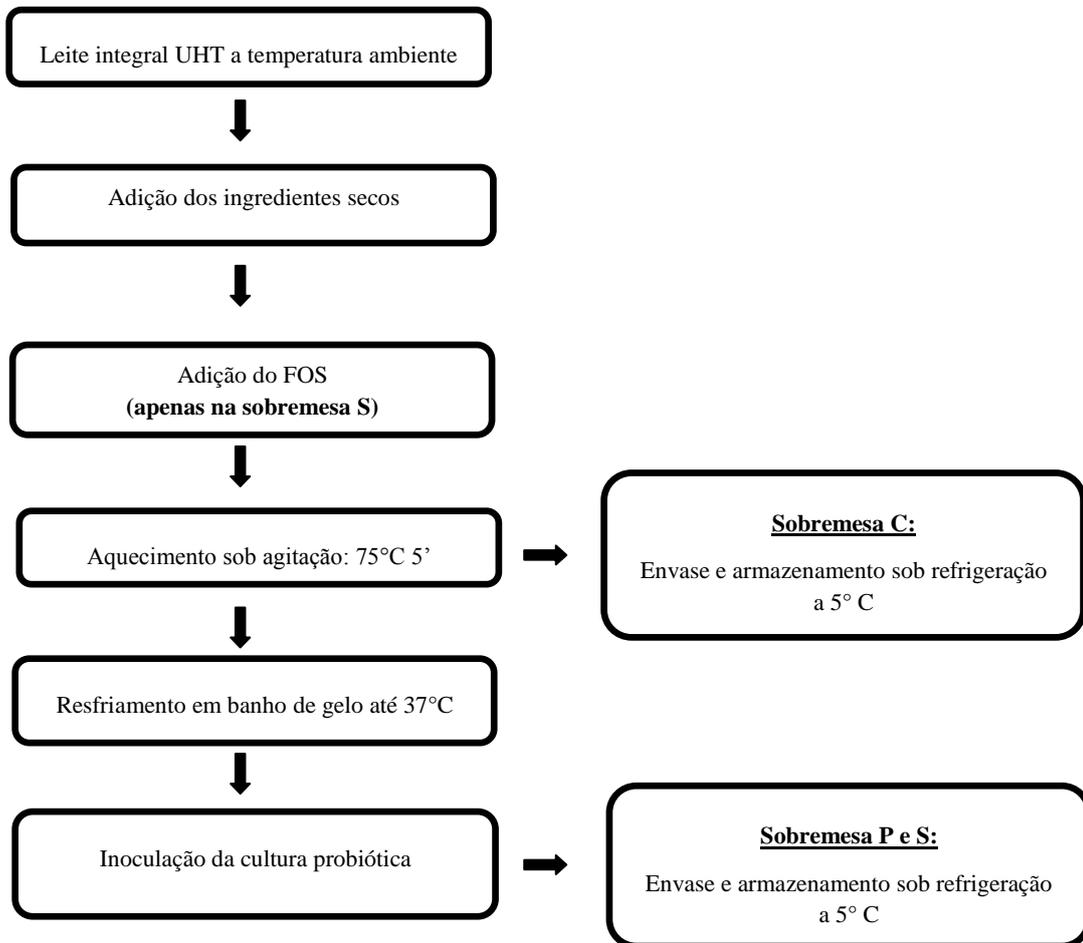


Figura 1. Fluxograma de elaboração das sobremesas lácteas cremosas.

4.2.3 Composição química das sobremesas lácteas cremosas

A composição centesimal das sobremesas foi determinada em triplicata, no 1º e no 28º dia de armazenamento, de acordo com os métodos da AOAC (2002). A umidade foi determinada por secagem em estufa a 105°C (método 935.29), o resíduo mineral fixo foi determinado por incineração em mufla a 550°C (método 930.22-32.3.08), o teor de proteínas foi calculado pela determinação de nitrogênio através do método Micro Kjeldahl, multiplicando-se por 6,38 para conversão em proteínas (método 991.20-33.2.11), a

determinação do teor de gordura foi feita pelo método de Soxhlet (método 963.15-31.4.02) e o teor de carboidratos foi calculado por diferença.

A fibra alimentar foi determinada pelo método enzimático-gravimétrico (método 985.29-45.4.08) e os frutanos totais pelo método enzimático-colorimétrico (método 999.03). A soma das duas frações representou o teor de fibra alimentar total presente nas amostras.

4.2.4 Estabilidade das sobremesas lácteas cremosas durante o armazenamento refrigerado

As sobremesas foram armazenadas sob refrigeração (5°C) e, após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de estocagem, avaliadas quanto à estabilidade microbiológica, análise sensorial (testes de aceitabilidade e intenção de compra), pH, acidez titulável expressa em ácido láctico, índice de sinerese, determinação de células viáveis do *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 e tolerância do micro-organismo a diferentes condições ácidas.

Análises microbiológicas

Antes dos testes sensoriais, as sobremesas lácteas cremosas foram submetidas a testes de qualidade sanitária, segundo a recomendação da legislação vigente, por análise de *Bacillus cereus*, coliformes termotolerantes/g (45°C), estafilococos coagulase positivo/g, *Salmonella* spp, bolores e leveduras (BRASIL, 2001).

Teste de aceitabilidade e intenção de compra

Participaram dos testes de aceitabilidade e intenção de compra, 70 julgadores não treinados, de ambos os sexos, maiores de 18 anos, recrutados de forma aleatória.

Foram oferecidas aos julgadores 40 mL de cada sobremesa (C, P e S), em recipientes brancos, codificados aleatoriamente com números de três dígitos. Junto às formulações, foram fornecidos aos julgadores água à temperatura ambiente e a ficha de análise de aceitabilidade e intenção de compra (Apêndice A).

A ficha de aceitabilidade foi composta por uma escala hedônica com 9 categorias, cujo ponto 1 correspondeu a “desgostei extremamente” e o ponto 9 a “gostei extremamente”, em relação aos atributos sensoriais sabor, consistência e impressão global. A intenção de compra

das amostras formuladas, utilizou uma escala hedônica de 5 pontos, cuja representação 1 correspondeu a “certamente não compraria” e 5 a “certamente compraria” (DUTCOSKY, 2013).

Determinação do pH e acidez expressa em ácido láctico

O pH das três sobremesas lácteas cremosas foi determinado com potenciômetro (Micronal B474), por meio de leitura direta no produto. A acidez foi determinada por titulação com solução de NaOH 0,1N, segundo AOAC (2002) e expressa em ácido láctico (método 970.124).

Determinação do índice de sinerese

O índice de sinerese foi determinado para as três sobremesas. As amostras foram pesadas ($15 \pm 0,1$ g) e centrifugadas a 5000 x g durante 20 minutos, em centrífuga refrigerada (Janetzki K23) a 4°C nos tempos 1, 7 e 14, 21 e 28, todas em duplicata. O índice de sinerese (S) foi calculado conforme Equação 1 (AICHINGER *et al.* 2003).

$$S = \frac{P_s}{P_a} \cdot 100 \% \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo:

Ps = Peso do sobrenadante (g)

Pa = Peso total da amostra centrifugada (g)

Determinação de células viáveis do Lactobacillus paracasei subsp. paracasei LBC 81

Amostras de 25 mL das sobremesas P e S foram retiradas em condições de assepsia e solubilizadas em 225 mL de água peptonada estéril 0,1% (diluição 10^{-1}), utilizando-se frascos de vidro estéril. Posteriormente, foi transferida uma alíquota de 1 mL para um tubo com rosca contendo 9 mL de solução de água peptonada 0,1%. Diluições decimais seriadas das sobremesas lácteas foram realizadas, até a diluição 10^{-7} .

A inoculação foi realizada no meio ágar MRS (Oxoid CM0361) acidificado a pH 5,4 com ácido acético glacial, semeado em profundidade, com incubação a 37°C por 72 horas, em condições de anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid). Após este tempo, a

contagem foi realizada e o resultado expresso em logaritmo de unidades formadoras de colônias por grama de produto (log UFC/g) (ARAGON-ALEGRO *et al.* 2007).

Tolerância do Lactobacillus paracasei subsp. paracasei LBC 81 a soluções ácidas com pepsina

A tolerância da cultura ao ácido foi determinada em soluções com pH 1,5, 2,5 e 3,5. As soluções ácidas foram preparadas, com cloreto de sódio (2,0 g/L) e pepsina (3g/L) (Pepsin from porcine stomach mucosa, Sigma-Aldrich CO. St. Louis, MO, EUA) e o pH foi ajustado com soluções de HCl e NaOH 1N. A sobremesa láctea (1mL) foi transferida para 9mL de cada solução de pH e, em seguida, submetidas à agitação de 150 rpm à 37°C em shaker (Fermentation Design inc; MOD G25).

Uma alíquota de 1mL de cada uma das soluções foi retirada, após 1 e 2 horas, e submetidas a diluições seriadas (até 10^{-7}), as quais foram inoculadas em profundidade, em meio ágar MRS (Oxoid CM0361) acidificado a pH 5,4 com ácido acético glacial, e incubadas anaerobicamente a 37°C por 72 horas, para a determinação das células viáveis. O resultado foi expresso em logaritmo de unidades formadoras de colônias por grama de produto (log UFC/g) (ARAGON-ALEGRO *et al.* 2007; LISERRE, RÉ; FRANCO, 2007; MISHRA; PRASAD, 2005).

4.2.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados através do teste estatístico ANOVA, seguida do teste de Duncan, utilizando o programa “Statistic for Windows 6.0” (STATSOFT, 2002).

4.2.6 Considerações Éticas

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco, CAAE: 23286813.2.0000.5208, segundo as normas e diretrizes regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos – Resolução N° 466/12 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde. A participação no estudo foi voluntária e os participantes foram informados do conteúdo da pesquisa e de detalhes metodológicos, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B), o qual foi assinado pelo pesquisador e participante.

Resultados e discussão

5 DESENVOLVIMENTO DE SOBREMESA LÁCTEA CREMOSA DE CHOCOLATE ADICIONADA DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEO E *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81

1. INTRODUÇÃO

Visando o desenvolvimento de novos produtos probióticos, as pesquisas focam na proteção e viabilidade das células probióticas durante a fabricação e armazenamento do produto. Há vários fatores ambientais que afetam a viabilidade dos probióticos, tais como a acidez, pH, oxigênio dissolvido, temperatura do armazenamento e presença de outras culturas. Além de permanecerem viáveis no produto, os probióticos devem sobreviver à digestão gástrica, com condições adversas de baixo pH e ação antimicrobiana da pepsina, chegando em quantidade suficientemente satisfatória ao intestino, atuando beneficemente no hospedeiro. No que diz respeito aos micro-organismos, o *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* vem sendo bastante utilizado, devido as suas comprovadas propriedades probióticas, atestada viabilidade tecnológica de suas cepas e, principalmente, por desenvolver características organolépticas satisfatórias de textura, sabor e pH, quando incorporados aos produtos lácteos (BURITI, CASTRO & SAAD, 2010; XIE, ZHOU & LI, 2012; SCHELL & BEERMANN, 2014; JIMÉNEZ, *et al.*, 2015)

O fruto-oligossacarídeo (FOS) pode exercer um efeito protetor, melhorando a sobrevivência e atividade dos micro-organismos durante o armazenamento de alimentos probióticos e durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Suas características tecnológicas também o tornam um ingrediente promissor para a indústria de alimentos, como fonte de fibras, melhorando o sabor, paladar e textura (PIMENTEL *et al.*, 2012; DELGADO *et al.*, 2013; NOBRE, SUVAROV & De WEIRELD, 2014).

Dentre os alimentos funcionais, os laticínios são considerados o principal veículo para o fornecimento das bactérias probióticas ao trato gastrintestinal humano, havendo predomínio dos alimentos fermentados. Estes produtos, ao longo do armazenamento, podem apresentar *off flavour*, originado a partir de culturas capazes de promover sabores muito ácidos, indesejáveis por muitos consumidores. Logo, é relevante o desenvolvimento de produtos não fermentados, mais atrativos, a exemplo das sobremesas lácteas cremosas de chocolate. As sobremesas lácteas são importantes veículos alimentares para culturas probióticas, já que possuem condições favoráveis ao desenvolvimento desses micro-organismos, uma vez que apresentam pH maior que 6,0, umidade superior a 70%, não apresentam culturas “starter” para competir

com os micro-organismos probióticos e ainda podem ser suplementados com ingredientes prebióticos (GRANATO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012; MORAIS *et al.*, 2014).

O desenvolvimento de um novo produto simbiótico proporciona uma oportunidade para contribuir com a melhoria da qualidade dos alimentos e a saúde dos consumidores. Diante dos benefícios associados aos probióticos e prebióticos, neste trabalho foi desenvolvida sobremesa láctea cremosa de chocolate, adicionada de FOS e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81, com o objetivo de avaliar as características físico-químicas e sensoriais das sobremesas e a viabilidade e tolerância da cultura probiótica às condições gástricas simuladas, durante a estocagem refrigerada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Ingredientes e cultura probiótica

Para produção das sobremesas lácteas cremosas, os seguintes ingredientes comerciais foram utilizados: leite integral UHT (Parmalat, Muriaé, MG, Brasil), açúcar refinado granulado (União, Coopersucar União, Limeira, SP, Brasil), chocolate em pó solúvel (Nestlé, Araras, SP, Brasil), chocolate meio amargo (Nestlé, SP, Brasil), amido de milho (Unilever, Garanhuns, PE, Brasil) e goma xantana (Rhodigel 80, Rhodia, Melle, França). A cultura probiótica liofilizada foi o *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 (Danisco, Dangé, França), do tipo DVS (*Direct vat set* = para adição direta) e, como ingrediente prebiótico, utilizou-se o fruto-oligossacarídeo (P95, Orafti, Bélgica).

2.2. Elaboração do produto

Três formulações de sobremesas lácteas cremosas foram desenvolvidas: controle (C), probiótica (P) e simbiótica (S). Na sobremesa P foi adicionado o micro-organismo probiótico *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 (Danisco, Dangé, França). Na sobremesa S, além do *L. paracasei* LBC 81, foi adicionado o fruto-oligossacarídeo (P95, Orafti, Bélgica) como ingrediente prebiótico e na sobremesa C não foi adicionado nem o probiótico nem o prebiótico.

A cultura probiótica foi dissolvida em um litro de leite desnatado UHT, homogeneizada e distribuída em recipientes de 20mL, mantidos a -18°C. Antes da adição do probiótico nas

sobremesas P e S, a cultura foi descongelada sob refrigeração (5°C) e pré-incubada em estufa, por 2 horas a 37°C.

Os ingredientes e suas respectivas quantidades utilizadas para produção das sobremesas lácteas cremosas estão na Tabela 1. Para elaboração das sobremesas os ingredientes secos foram pesados, adicionados ao leite integral UHT e mantidos sob aquecimento a 75°C, com agitação constante, por 5 minutos. Após a dissolução completa dos ingredientes, as sobremesas foram submetidas ao banho de gelo, com agitação contínua, para redução da temperatura (37°C). O micro-organismo pré-incubado foi inoculado, em condições assépticas, nas sobremesas P e S e a mistura foi homogeneizada. Em seguida, as sobremesas lácteas cremosas foram acondicionadas em recipientes plásticos tampados (material poliestireno), contendo cerca de 50g, e armazenados sob refrigeração a 5°C por 28 dias.

Tabela 1. Quantidades dos ingredientes (g 100g⁻¹) utilizados na formulação das sobremesas lácteas cremosas.

Ingredientes	Sobremesas		
	C	P	S
Leite integral UHT	80,8	80,3	77,1
Açúcar	6	6	5,8
Chocolate em pó	5	5	4,8
Chocolate meio amargo	4	4	3,8
Amido de milho	4	4	3,8
Goma xantana	0,2	0,2	0,2
Fruto-oligossacarídeo	-	-	4
<i>Lactobacillus paracasei</i> LBC81	-	0,5	0,5
Total	100	100	100

C = Controle, sem adição de micro-organismo probiótico ou ingrediente prebiótico.

P = Probiótica, adicionada de micro-organismo probiótico (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81, Danisco, Dangé, França).

S = Simbiótica = adicionada de micro-organismo probiótico (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81, Danisco) e ingrediente prebiótico fruto-oligossacarídeo (P95, Orafiti, Bélgica).

2.3. Análises físico-químicas

A composição centesimal das sobremesas foi determinada em triplicata, no 1º e no 28º dia de armazenamento, de acordo com os métodos da AOAC (2002). A umidade foi determinada por secagem em estufa a 105°C (método 935.29), o resíduo mineral fixo foi determinado por incineração em mufla a 550°C (método 930.22-32.3.08), o teor de proteínas foi calculado pela determinação de nitrogênio através do método Micro Kjeldahl, multiplicando-se por 6,38 para conversão em proteínas (método 991.20-33.2.11), a determinação do teor de gordura foi feita pelo método de Soxhlet (método 963.15-31.4.02) e o teor de carboidratos foi calculado por diferença.

A fibra alimentar foi determinada pelo método enzimático-gravimétrico (método 985.29-45.4.08) e os frutanos totais pelo método enzimático-colorimétrico (método 999.03). A soma das duas frações representou o teor de fibra alimentar total presente nas amostras.

Após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento, considerado o tempo de vida de prateleira de produtos lácteos (DESAI, POWELL & SHAH *et al.*, 2004), as sobremesas foram avaliadas quanto ao pH e a acidez expressa em ácido láctico. A medida do pH das sobremesas lácteas cremosas foi determinada com potenciômetro (Micronal B474). A acidez foi determinada por titulação com solução de NaOH 0,1N, segundo AOAC (2002) e expressa em ácido láctico (método 970.124).

O índice de sinerese foi determinado em duplicata nas três sobremesas, nos tempos 1, 7 e 14, 21 e 28. As amostras foram pesadas ($15 \pm 0,1$ g) e centrifugadas (Janetzki K23) a 5000 x g durante 20 minutos, sob refrigeração (4°C). O índice de sinerese (S) foi calculado através da equação $S = (Ps/Pa) \times 100\%$, sendo Ps, o peso do sobrenadante (g), e Pa, o peso total da amostra centrifugada (g) (AICHINGER *et al.*, 2003).

2.4. Análises microbiológicas

Antes da análise sensorial, as sobremesas lácteas cremosas foram submetidas a testes de qualidade sanitária, por análise de *Bacillus cereus*, coliformes termotolerantes/g (45°C), estafilococos coagulase positivo/g, *Salmonella* spp, bolores e leveduras (BRASIL, 2001).

2.5. Análise sensorial

A aceitabilidade e intenção de compra das sobremesas foram realizadas após 1, 7, 14, 21 e 28 dias, por 70 julgadores não treinados, de ambos os sexos, maiores de 18 anos, recrutados de forma aleatória. Foram oferecidas aos julgadores 40 mL de cada sobremesa láctea cremosa (C, P e S), em recipientes brancos, codificados aleatoriamente com números de três dígitos. Junto às sobremesas, foram fornecidos aos julgadores água à temperatura ambiente e a ficha de análise de aceitabilidade e intenção de compra.

A ficha de aceitabilidade foi composta por uma escala hedônica com 9 categorias, cujo ponto 1 correspondeu a “desgostei extremamente” e o ponto 9 a “gostei extremamente”, em relação aos atributos sensoriais sabor, consistência e impressão global. A intenção de compra das amostras formuladas, utilizou uma escala hedônica de 5 pontos, cuja representação 1 correspondeu a “certamente não compraria” e 5 a “certamente compraria” (DUTCOSKY, 2013).

2.6. Viabilidade do *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 durante a estocagem

A viabilidade do *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 foi analisada nos tempos 1, 7, 14, 21 e 28 nas sobremesas P e S. Amostras de 25 mL foram retiradas e solubilizadas em 225 mL de água peptonada estéril 0,1% (diluição 10^{-1}), utilizando-se um frasco de vidro estéril. Posteriormente foi transferida uma alíquota de 1 mL para um tubo com rosca contendo 9 mL de solução de água peptonada 0,1%. Diluições decimais seriadas das sobremesas lácteas foram realizadas, até a diluição 10^{-7} .

A inoculação foi realizada no meio ágar MRS (Oxoid CM0361) acidificado a pH 5,4 com ácido acético glacial, semeado em profundidade, com incubação a 37°C por 72 horas, em condições de anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid). Após este tempo, a contagem foi realizada e o resultado expresso em logaritmo de unidades formadoras de colônias por grama de produto (log UFC/g) (ARAGON-ALEGRO *et al.*, 2007).

2.7. Tolerância do *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 submetido a condições gástricas simuladas durante a estocagem

As sobremesas lácteas P e S foram submetidas às simulações das condições gástricas humanas, para verificação da sobrevivência do probiótico em diferentes condições de pH (1,5,

2,5 e 3,5). As soluções ácidas foram preparadas, com cloreto de sódio (2,0 g/L) e pepsina (Pepsin from porcine stomach mucosa, Sigma-Aldrich CO. St. Louis, MO, EUA) (3g/L), e o pH foi ajustado com soluções de HCl e NaOH 1N. A sobremesa láctea (1mL) foi transferida para 9mL de cada solução de pH e, em seguida, submetidas à agitação de 150 rpm à 37°C em shaker (Fermentation Design inc; MOD G25).

Uma alíquota de 1mL de cada uma das soluções foi retirada, após 1 e 2 horas, e submetidas a diluições seriadas (até 10^{-7}), as quais foram inoculadas em profundidade, em meio ágar MRS (Oxoid CM0361) acidificado a pH 5,4 com ácido acético glacial, e incubadas anaerobicamente a 37°C por 72 horas, para a determinação das células viáveis. O resultado foi expresso em logaritmo de unidades formadoras de colônias por grama de produto (log UFC/g) (ARAGON-ALEGRO *et al.* 2007; LISERRE, RÉ; FRANCO, 2007; MISHRA; PRASAD, 2005).

2.8. Análise Estatística

Os dados foram analisados através do teste estatístico ANOVA, seguido do teste de Duncan para comparação entre as médias obtidas, em nível de 5% de significância, utilizando o programa “Statistic for Windows 6.0” (STATSOFT, 2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises físico-químicas

Os valores médios de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e carboidratos obtidos para as sobremesas C, P e S, no 1º e 28º dia de armazenamento, estão dispostos na Tabela 2.

As variações observadas em alguns componentes na Tabela 2 ocorreram, provavelmente, devido a diferenças entre os diferentes lotes de matéria-prima utilizados. Destaca-se que todos os ingredientes utilizados para a produção das sobremesas sempre pertenceram ao mesmo fabricante. O maior percentual de carboidratos na sobremesa S deve-se a adição do FOS (4%).

O teor de frutanos totais na sobremesa S no 1º e no 28º dia foi de 6,5 e 6,4g/100g, respectivamente. Com base na diretriz e na regulamentação brasileira, para ser considerado prebiótico, o produto deve conter 1,5g de frutanos por porção diária, estando este produto, portanto, dentro desta classificação (BRASIL, 2008).

Tabela 2. Composição centesimal das sobremesas lácteas cremosas controle (C), probiótica (P) e simbiótica (S) no 1º e 28º dia de armazenamento sob refrigeração (5°C).

ANÁLISES	C		P		S	
	1º DIA	28º DIA	1º DIA	28º DIA	1º DIA	28º DIA
UMIDADE	68,95±0,18bA	70,10±0,42bA	72,24±0,17aA	71,64±0,34aA	67,24±0,24cA	68,23±0,31cA
CINZAS	3,24 ±0,06bA	3,02±0,05bA	3,50±0,03aA	3,26±0,04aB	2,78±0,03cA	2,78±0,08bA
PROTEÍNAS	3,82±0,01aA	3,52±0,04aB	3,83±0,03aA	3,51±0,03aB	3,52±0,04bA	3,29±0,08bB
LIPÍDEOS	4,90±0,03aA	3,88±0,44aA	3,86±0,05bA	3,61±0,43aA	4,86±0,05aA	3,46±0,44aB
CARBOIDRATOS	19,18±0,41bA	19,37±0,15bA	16,52±0,35cB	18,00±0,21cA	21,60±0,36aA	22,29±0,10aA

^{abc} letras iguais na horizontal no mesmo dia não diferem significativamente ($p>0,05$) pelo teste de Duncan;

^{ABC} letras iguais na horizontal em dias diferentes no mesmo produto não diferem significativamente ($p>0,05$) pelo teste “t” de student.

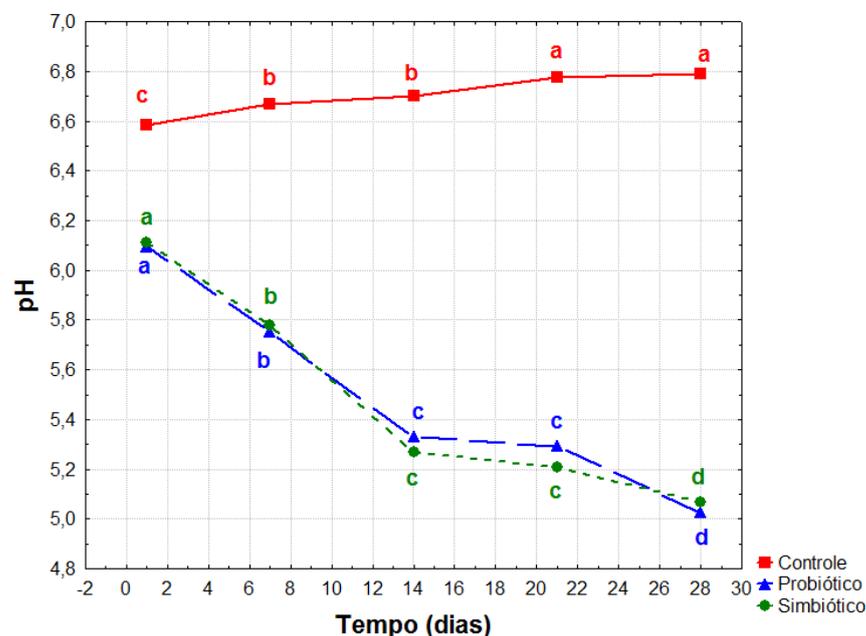
Com relação ao teor de fibras totais, as sobremesas C, P e S apresentaram valores de 3,24, 3,41 e 10,70g/100g, respectivamente. Segundo legislação (BRASIL, 2008), a alegação de propriedade funcional das fibras alimentares é permitida desde que a porção do produto pronto para consumo forneça no mínimo 3g de fibras. De acordo com a RDC N° 359/2003, a porção para sobremesa láctea cremosa é de 120g (BRASIL, 2003), logo, as três sobremesas podem ser consideradas produtos que contêm fibras alimentares, sendo capazes de auxiliar no funcionamento do intestino.

A sinerese não foi observada durante os 28 dias de armazenamento, nas três sobremesas, mostrando o efeito positivo da adição de 0,2% da goma xantana (Tabela 1). Segundo Silveira *et al.* (2014) este hidrocolóide aniônico é capaz de interagir com as cargas positivas na superfície da micela de caseína, reforçando a rede formada, e, conseqüentemente, reduzindo a sinerese.

Os valores de pH das sobremesas P e S (Figura 1) reduziram significativamente ($p<0,05$) durante o período de armazenamento, com valores médios entre 6,1 e 5,0, para ambas, no 1º e 28º dia, respectivamente, enquanto a sobremesa C (Figura 1) apresentou média de 6,6 e 6,8.

Buriti, Castro & Saad (2010) também obtiveram reduzidas médias de pH em mousse de goiaba, adicionado de *Lactobacillus acidophilus* (0,05%) e FOS (6%), durante os 28 dias

de armazenamento a 4°C. Corrêa, Castro & Saad (2008), ao desenvolver manjar de coco probiótico adicionado de *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC 82, verificaram valores de pH mais baixos que o controle, ao longo dos 28 dias. Aragon-Alegro *et al.*, (2007) avaliaram o pH em mousse de chocolate potencialmente probiótico (0,01% *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC 82) e simbiótico (5% inulina e *L. paracasei*), verificando que os valores de pH dos ensaios controle (6,22 – 6,01), probiótico (6,26–5,67) e, em especial, o simbiótico (6,21 – 5,37), diminuíram ao longo do armazenamento. Este último cita que o pH ótimo para o crescimento da maioria das bactérias é próximo a neutralidade, sendo este crescimento suprimido em pH abaixo de 5,0.



Figural. pH das sobremesas controle (C), probiótica (P) e simbiótica (S), durante 28 dias de armazenamento, à 5°C. Letras diferentes na mesma sobremesa láctea ao longo do armazenamento diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Duncan.

Os valores de acidez titulável, expressos em porcentagem de ácido láctico, das sobremesas P e S (Figura 2) aumentaram significativamente ($p < 0,05$) durante todo o período de armazenamento, apresentando valores superiores ao da sobremesa C (Figura 2).

A redução do pH e aumento da acidez observada ao longo do armazenamento para as sobremesas P e S é esperada durante a estocagem, visto que, o *L. paracasei*, bactéria ácido-lática, fermenta a lactose, resultando na produção de ácido láctico e outros ácidos orgânicos, que podem contribuir no sabor e palatabilidade do alimento (GOMES *et al.*, 2013; STALIANO, MARTINEZ & SAAD, 2014; PIMENTEL *et al.*, 2015).

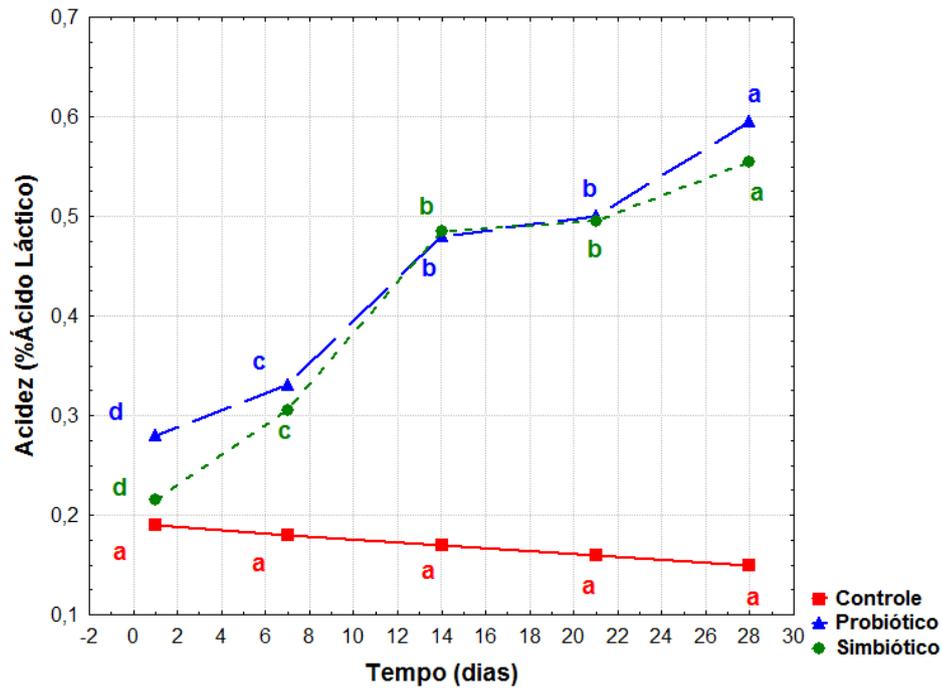


Figura 2. Valores de acidez titulável obtidos para as sobremesas controle (C), probiótica (P) e simbiótica (S), durante 28 dias de armazenamento, a 5°C. Letras diferentes na mesma sobremesa láctea ao longo do armazenamento diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Duncan.

3.2 Análises microbiológicas

A análise microbiológica das sobremesas lácteas C, P e S, avaliadas ao longo do armazenamento, mostrou ausência de *Bacillus cereus*, coliformes termotolerantes/g (45°C), estafilococos coagulase positivo/g, *Salmonella* spp, bolores e leveduras, estando em conformidade com a Resolução RDC Nº 12/2001 da Legislação Brasileira (BRASIL, 2001). Logo, os produtos formulados estavam em condições adequadas para o consumo humano.

3.3 Análise sensorial

Todas as sobremesas mantiveram-se com boa aceitabilidade durante os 28 dias de estocagem refrigerada, com grau de aceitação, entre 7 e 8 da escala hedônica de 9 pontos, indicando que os provadores gostaram de “moderadamente” a “muito” dos produtos (Tabela 3).

Tabela 3. Médias dos valores da aceitabilidade das sobremesas lácteas cremosas.

Tempo de armazenamento (dias)	Sobremesa Controle				Sobremesa Probiótica				Sobremesa Simbiótica						
	Sabor	Consistência	Impressão	Sabor	Consistência	Impressão	Sabor	Consistência	Impressão	Sabor	Consistência	Impressão	Sabor	Consistência	Impressão
1	7,90±1,13Aa	7,94±0,96Aa	7,93±1,21Aa	7,00±1,58Ba	7,48±1,09ABa	7,31±1,30Ba	7,63±1,05Aa	7,13±1,35Ba	7,47±1,19Ba						
7	8,06±0,93Aa	8,20±0,60Aa	8,01±0,92Aa	7,20±1,23Ba	7,53±1,21Ba	7,34±1,18Ba	7,76±1,01Aa	7,31±1,12Ba	7,61±1,02Ba						
14	7,88±0,99Aa	8,21±0,97Aa	8,00±0,83Aa	6,86±1,52Ba	7,23±1,24Ba	7,31±0,84Ba	7,96±1,18Aa	7,56±1,20Ba	7,48±1,06Ba						
21	7,97±0,95Aa	8,14±0,89Aa	8,20±0,77Aa	7,20±1,48Ba	7,33±1,38Ba	7,54±1,10Ba	7,87±1,11Aa	7,23±1,35Ba	7,83±1,09Ba						
28	7,54±0,99Ab	7,93±0,89Aa	7,63±1,26Ab	7,37±1,50Aa	7,41±1,27Ba	7,66±1,15Aa	7,63±1,24Aa	7,48±1,34Ba	7,53±1,25Aa						

^{abc} Médias seguidas de letras iguais na vertical não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Duncan ao longo do tempo.

^{ABC} Médias seguidas de letras iguais na horizontal no mesmo atributo não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Duncan entre as formulações.

Durante o armazenamento do produto, é desejada a manutenção das características organolépticas para garantir a qualidade aos consumidores. Ao longo dos 28 dias de armazenamento, as sobremesas C, P e S mantiveram constantes suas respectivas médias de aceitabilidade, em todos os atributos, garantindo a estabilidade do produto durante toda sua vida de prateleira.

Os resultados quanto ao atributo sabor não indicaram qualquer diferença significativa entre as sobremesas C e S. Segundo Cruz *et al.* (2009), culturas probióticas não tendem a modificar fortemente as propriedades sensoriais dos produtos. O efeito da adição do FOS, na sobremesa S, pode ter favorecido o sabor, quando comparado à sobremesa P, visto que, oligofruktoses apresentam baixo grau de polimerização e maior quantidade de açúcares livres, como a glicose e a frutose, possuindo 30 a 50% do poder adoçante da sacarose (BURITI *et al.*, 2005; NOBRE, SUVAROV & De WEIRELD, 2014).

Todas as notas dos atributos consistência e impressão global, para as três sobremesas, foram superiores a 7, destacando-se a sobremesa C, com maiores notas, se comparada a P e S. Os julgadores não observaram diferença significativa entre a consistência das sobremesas P e S. O FOS não interferiu na consistência da sobremesa, corroborando Phillips e Williams (2000), ao relatarem que somente as moléculas com grau de polimerização maior que 10 interferem na estrutura do gel do produto, enquanto as moléculas menores, como as do FOS, permanecem dissolvidas.

Com relação à intenção de compra das sobremesas lácteas cremosas verificou-se que, durante todo o período de estocagem, as amostras obtiveram boas notas pelos provadores, uma vez que os resultados se encontraram próximos de 4 e 5, em uma escala de 5 pontos, correspondendo a “provavelmente compraria” e “certamente compraria”, corroborando com a boa aceitabilidade relatada (Tabela 3).

3.4 Viabilidade do *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 durante a estocagem das sobremesas lácteas cremosas

Na Figura 3 observa-se que a população de *L. paracasei* nas sobremesas P e S manteve-se acima de 8 log UFC/g durante todo o armazenamento refrigerado (5°C). Segundo Tripathi & Giri (2014), para que haja os benefícios à saúde, os probióticos devem ser ingeridos em alimentos contendo o mínimo recomendado de 6 log UFC/g. A atual Legislação Brasileira (BRASIL, 2008) afirma que a quantidade mínima viável da cultura probiótica, deve

situar-se entre 8 e 9 log UFC por porção diária do produto. Valores menores podem ser aceitos, desde que se comprove sua eficácia. Deste modo, a matriz alimentar desenvolvida é capaz de veicular células probióticas viáveis, em número suficiente para proporcionar efeitos terapêuticos ao consumidor, durante toda sua vida de prateleira (28 dias).

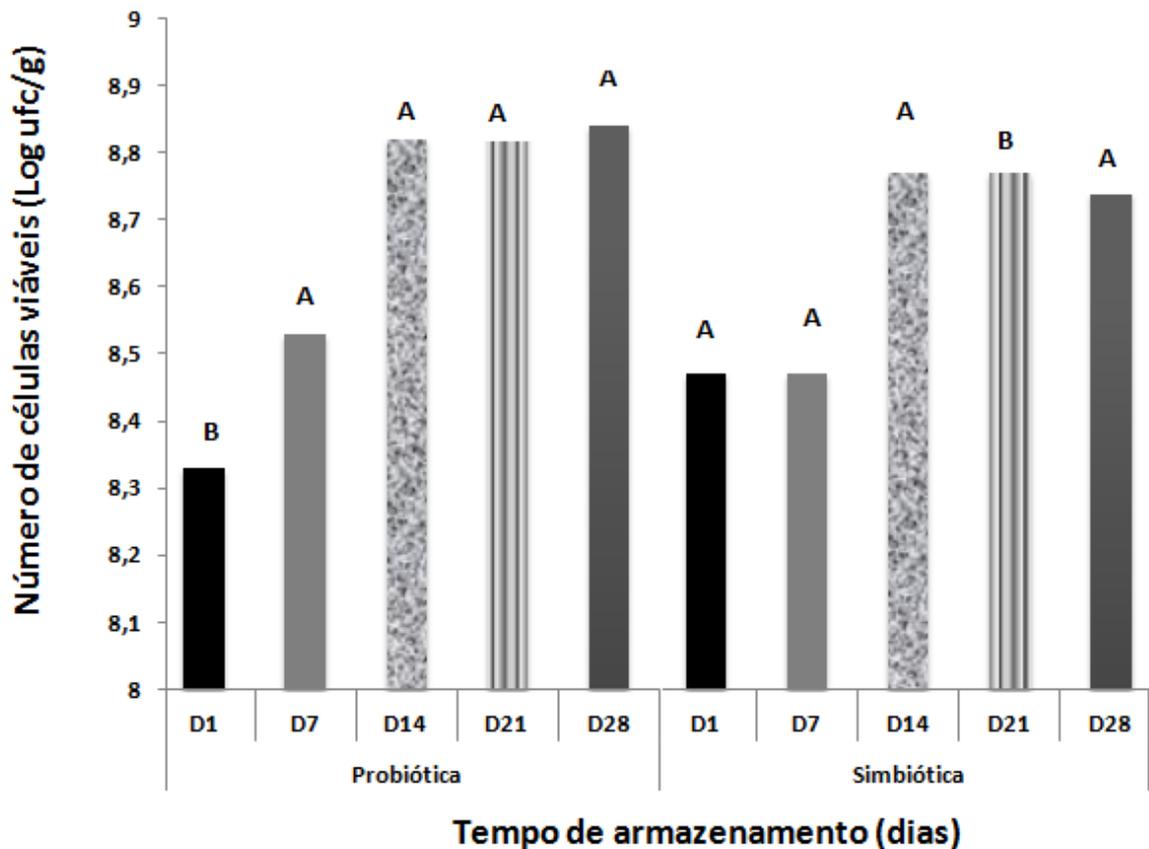


Figura 3. Sobrevivência do *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 adicionado em sobremesas lácteas cremosas P e S durante 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado a 5°C. Letras iguais no mesmo tempo de armazenamento em formulações distintas não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo Teste “t” de Student.

Pimentel, Garcia & Prudencio (2012) relataram que a sobrevivência de culturas probióticas depende da concentração de ácido lático, importante agente antimicrobiano. Nesta pesquisa não foi observado, ao longo do armazenamento, redução da viabilidade, apesar da diminuição do pH (Figura 1) e aumento da acidez (Figura 2), corroborando com diversos estudos que relataram a manutenção da quantidade mínima viável da cultura probiótica durante o armazenamento (BURITI *et al.*, 2005; ARAGON-ALEGRO *et al.*, 2007; CORRÊA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2012; COMAN *et al.*, 2013; CASAROTTI & PENNA, 2015).

Na Figura 3 observa-se que a contagem de *L. paracasei* cresceu após o 7º dia, sem diferença significativa ($p < 0,05$) e em ambas as sobremesas (P e S), demonstrando que o FOS não exerceu influência no crescimento desta bactéria probiótica. Buriti *et al.* (2007) verificaram em cream cheese adicionado de *Lactobacillus paracasei*, que o micro-organismo probiótico não foi capaz de degradar os frutanos, e concluíram que o armazenamento a baixas temperaturas, exigido para a preservação de produtos lácteos, desfavorece o consumo dos frutanos pelo probiótico, cuja temperatura ótima de crescimento geralmente é de 37°C. Por outro lado, estudos de Rodrigues *et al.* (2011) e Mishra & Mishra (2013) verificaram em coalhada adicionada de *L. acidophilus* e leite de soja fermentado adicionado de *L. acidophilus*, *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, respectivamente, que o FOS contribuiu favoravelmente com o aumento contínuo das células viáveis de bactéria probiótica durante a estocagem refrigerada.

Foi detectado na sobremesa S, discreta redução do teor de FOS (6,5g/100g no 1º dia e 6,4g/100g no 28º dia), indicando que o *L. paracasei* não consumiu o FOS. Segundo Buriti *et al.* (2010) o consumo do frutano, pelo micro-organismo, durante seu armazenamento, seria indesejável, visto que, reduziria seu potencial prebiótico além de, provavelmente, causar alterações sensoriais no produto devido à fermentação dos frutanos.

3.5 Tolerância do *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 às condições gástricas simuladas

A viabilidade do micro-organismo probiótico pode ser afetada pelas condições ácidas do trato gastrointestinal. As sobremesas submetidas a condições muito ácidas (pH 1,5), na 1ª e 2ª hora de condições gástricas simuladas, sofreram uma redução do número de células viáveis, mantendo-se abaixo de 8 log UFC/g, ao longo do armazenamento (Tabela 4 e 5). Com relação aos valores de pH 2,5 e 3,5, também na 1ª e 2ª hora de simulação, o *L. paracasei* apresentou número de células viáveis superiores a 8 log UFC/g, ao longo do armazenamento (Tabela 4 e 5).

Buriti, Castro & Saad (2010) e Casarotti *et al.* (2014) também verificaram que em mousse de goiaba e leite fermentado, respectivamente, houve redução no número de células viáveis de *L. acidophilus*, após estresse temporário do probiótico a condições muito ácidas de pH (1,4-1,9), durante a estocagem. Ranadheera *et al.* (2012) observaram que, ao realizar a simulação das condições gástricas *in vitro*, em iogurtes e sorvetes probióticos adicionados de *L. acidophilus*, *B. animalis* subsp. *lactis* e *Propionibacterium jensenii*, houve redução

progressiva na viabilidade do micro-organismo a pH 2,0, em comparação com o pH 3,0 e pH 4,0, concluindo que, os probióticos possuem resistência intrínseca para valores de pH mais elevados. Além disso, o fato da atividade ótima da enzima gástrica pepsina estar mais próximo do pH 1,5-2,0, contribui com a redução da viabilidade do probiótico.

Tabela 4. Contagem de *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 em sobremesa láctea cremosa após 1 hora, em pH 1,5, 2,5 e 3,5, durante a estocagem (log UFC/g).

DIAS	FORMULAÇÃO P			FORMULAÇÃO S		
	pH 1,5	pH 2,5	pH 3,5	pH 1,5	pH 2,5	pH 3,5
1	6,0A	7,7A	7,9A	6,0A	7,5A	7,9A
7	5,0A	8,4A	8,4A	5,0A	8,3A	8,2B
14	5,5A	8,5A	8,4A	5,3A	7,9B	7,9B
21	5,5A	8,3A	8,5A	5,3A	8,4A	7,7B
28	7,7A	8,6A	9,1A	6,4B	8,1B	8,2B

Letras iguais no mesmo tempo de armazenamento em formulações distintas não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo Teste “t” de student.

Tabela 5. Contagem de *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 em sobremesa láctea cremosa após 2 horas, em pH 1,5, 2,5 e 3,5, durante a estocagem (log UFC/g).

DIAS	FORMULAÇÃO P			FORMULAÇÃO S		
	pH 1,5	pH 2,5	pH 3,5	pH 1,5	pH 2,5	pH 3,5
1	6,2A	7,7A	8,0A	6,3A	7,3B	7,7B
7	6,4A	8,6A	8,5A	5,0B	8,3B	8,5A
14	6,5A	8,5A	8,5A	5,0B	8,2B	8,3B
21	5,6A	8,0A	8,1A	5,9A	8,0A	7,9B
28	6,0A	8,7A	8,7A	5,8B	8,3B	8,3B

Letras iguais no mesmo tempo de armazenamento em formulações distintas não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo Teste “t” de student.

O chocolate adicionado às sobremesas também pode ter fornecido alguma proteção aos micro-organismos, agindo como uma capa protetora contra o suco gástrico simulado. O cacau, principal ingrediente do chocolate, tem sido relatado por aumentar a sobrevivência gastrointestinal *in vitro* do *Lactobacillus helveticus* e *Bifidobacterium longum* (91 e 80% respectivamente) em comparação com o leite (20 e 30%) (POSSEMIERS *et al.*, 2010). A

fração de lipídios da manteiga de cacau foi relatada por proporcionar proteção para *B. longum* em ambientes de estresse circundante, possivelmente, protegendo as células ao serem expostas a tais ambientes hostis (LAHTINEN *et al.*, 2007).

A sobrevivência dos probióticos durante a simulação das condições gástricas depende da matriz alimentar. Um importante fator que afeta a variação do pH gástrico é a capacidade tamponante do alimento. O leite ajuda a proteger os probióticos contra a ação do ambiente gastrintestinal, sendo um eficiente veículo de micro-organismos probióticos em alimentos funcionais (ORTAKCI *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012; COMAN *et al.*, 2013).

4. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que o desenvolvimento das sobremesas lácteas resultou em produtos de boa qualidade higiênico sanitária e bons atributos sensoriais durante toda a estocagem.

Durante os 28 dias de armazenamento das sobremesas probiótica e simbiótica houve redução de pH e aumento da acidez sem interferir na viabilidade do *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81, que manteve-se acima do nível recomendado.

A simulação *in vitro* das condições gástricas demonstrou tolerância do *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 ao pH 2,5 e 3,5 durante duas horas, ao longo do armazenamento refrigerado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa de estudo, a Fermentech Comércio de Insumos para Alimentos por fornecer o *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 e a Beneo Latinoamerica Ltda pela doação do FOS (P95, Orafti).

REFERÊNCIAS

AICHINGER, P. A.; MICHEL, M.; SERVAIS, C.; DILLMANN, M. L.; ROUVET, M.; D'AMICO, N.; ZINK, R.; HENNING, K.; HORNE, D. S. Fermentations of a milk concentrate with *Streptococcus thermophilus* and chymosin: structure, viscoelasticity and syneresis of gels. **Colloids and Surfaces**, v. 31, p. 243-255, 2003.

ARAGON-ALEGRO, L. C.; ALEGRO, J. H. A.; CARDARELLI, H. R.; CHIU, M. C.; SAAD, S. M. I. Potentially probiotic and symbiotic chocolate mousse. **LWT – Food Science and Technology**, v. 40, p. 699 – 675, 2007.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (AOAC). **Official Methods of Analysis**, 13 ed., Washington, AOAC, 2002.

BRASIL, ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária, **Resolução RDC nº 359, 23 de dezembro de 2003**. Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional, Disponível em:
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d12c9e804745947f9bf0df3fbc4c6735/RDC_359.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 19 de setembro 2013.

BRASIL, ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária, **Resolução RDC nº 2, 7 de janeiro de 2008**. Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional ou de Saúde, Disponível em:
http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 19 de setembro 2013.

BRASIL, ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária, **Resolução RDC nº 12, 02 de janeiro de 2001**. Regulamento Técnico sobre padres microbiológicos para alimentos. Disponível em:
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 19 de setembro 2013.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S. ASSIS, E.G.; SAAD, S. M. I. Probiotic potential of Minals fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **LWT – Food Science and Technology**, v. 38, n. 2, p. 173 – 180, 2005.

BURITI, F. C. A.; CARDARELLI, H. R.; FILISSETTI, T. M. C. C.; SAAD, S. M. I. Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1605 – 1610, 2007.

BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in symbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2-3, p. 121 – 129, 2010.

CASAROTTI, S. N.; MONTEIRO, D. A.; MORETTI, M. M. S.; PENNA, A. L. B. Influence of the combination of probiotic cultures during fermentation and storage of fermented milk. **Food Research International**, v. 59, p. 67 – 75, 2014.

CASAROTTI, S. N.; PENNA, A. L. B. Acidification profile, probiotic in vitro gastrointestinal tolerance and viability in fermented milk with fruits flours. **International Dairy Journal**, v. 41, p. 1 – 6, 2015.

CHIAVARO, E.; VITTADINI, E.; CORRADINI, C. Physicochemical characterization and stability of inulin gels. **European Food Research Technology**, v. 225, p. 85-94, 2007.

COMAN, M. M.; VERDENELLI, M. C.; CECCHINI, C.; SILVI, S.; VASILE, A.; BAHRIM, G. E.; ORPIANESI, C.; CRESCI, A. Effect of buckwheat flour and oat bran on growth and cell viability of the probiotic strains *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 ®, *Lactobacillus paracasei* IMC 502 ® and their combination SYN BIO ®, in symbiotic fermented milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, n. 2, p. 261-268, 2013.

CORRÊA, S. B. M.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Probiotic potential and sensory properties of coconut flan supplemented with *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. **International Journal of Food and Technology**, v. 43, p. 1560 – 1568, 2008.

CRUZ, A. G.; BURITI, F. C. A.; SOUZA, C. H. B.; FARIA, J. A. F.; SAAD, S. M. I. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 344 – 354, 2009.

DELGADO, G. T. C.; TAMASHIRO, W. M. S. C.; JUNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): A functional food. **Plants Foods for Human Nutrition**, May, 2013.

DESAI, A. R.; POWELL, L. B.; SHAH, N. P. Survival and activity of probiotic *Lactobacilli* in skim milk containing prebióticos. **Food Microbiology**, Saf, 69, p. 57-60, 2004

DUTCOSKY, S. D. **Análise Sensorial de Alimentos**. 4ª ed. Curitiba: Champagnat: 2013. 531p.

GOMES, J. J. L.; DUARTE, A. M.; BATISTA, A. S. M.; FIGUEIREDO, R. M. F.; SOUSA, E. P.; SOUZA, E. L.; QUEIROGA, R. C. R. E. Physicochemical and sensory properties of fermented dairy beverages made with goat's Milk, cow's Milk and mixtuew of the two milks. **LWT – Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 18 – 24, 2013.

GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; NAZARRO, F.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts and products. **Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 3, p. 292 – 302, 2010.

LAHTINEN, S. J.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. J. FORSSELL, P.; MYLLARIEN, P. Effect of starch and lipid based encapsulation on the culturability of two *Bifidobacterium longum* strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 500-505, 2007.

LISERRE, A.M., RÉ, M.I., FRANCO, B.D.G.M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* in modified alginate–chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Biotechnology**, v. 21, n. 7, p. 1–16, 2007.

MISHRA, V.; PRASAD, D. N. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* in strains as potential probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 109 – 115, 2005.

MISHRA, S.; MISHRA, H. N. Effect of synbiotic interaction of fructooligosaccharide and probiotics on the acidification profile, textural and rheological characteristics of fermented soy milk. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 3166 – 3176, 2013.

MORAIS, E. C.; MORAIS, A. R.; CRUZ, A. G.; BOLINI, H. M. A. Development of chocolate dairy dessert with addition of prebiotics and replacement of sucrose with different high-intensity sweeteners. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 5, p. 2600 – 2609, 2014.

NOBRE, C.; SUVAROV, P.; De WEIRELD, G. Evaluation of commercial resins for fructooligosaccharide separation. **New Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 55 – 63, 2014.

ORTAKCI, F.; BROADBENT, J. R.; McMANUS, W. R.; McMAHON, D. J. Survival of microencapsulated probiotic *Lactobacillus paracasei* LBC-1e during manufacture of Mozzarella cheese and simulated gastric digestion. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 11, p. 6274 – 6281, 2012.

PIMENTEL, T. C.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H. Effect of long-chain inulin on the texture profile and survival of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* in set yoghurts during refrigerated storage. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 1, p. 104-110, 2012.

PIMENTEL, T. C.; MADRONA, G. S.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. **LWT – Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 415 – 422, 2015.

PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Handbook of Hydrocolloids**, 1 ed. Woodhead publishing limited, Abington, p. 397-403, 2000.

POSSEMIERS, S. MARZORATI, M.; VERSTRAETE, W.; VAN DE WIELE, T. Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n.1-2, p. 97-103, 2010.

RANADHEERA, C. S.; EVANS, C. A.; ADAMS, M. C.; BAINES, S. K. In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Research International**, v. 49, n. 2, p. 619-625, 2012.

RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; PEREIRA, C. I.; GOMES, A. M.; MALCATA, F. X.; FREITAS, A. C. The potential effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled Milk matrices. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 100 – 108, 2011.

SCHELL, D.; BEERMANN, C. Fluidized bed microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* with sweet whey and shellac for improved acid resistance and in-vitro gastro-intestinal survival. **Food Research International**, v. 62, p. 308 – 314, 2014.

SILVA, A. S.; HONJOYA, E. R.; INAY, O. M.; COSTA, M. R.; SOUZA, C. H. B.; SANTANA, E. H. W.; SUGUIMOTO, H. H.; ARAGON-ALEGRO, L. C. Viability of *Lactobacillus casei* in chocolate flan and its survival to simulated gastrointestinal conditions. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, suppl. 2, p. 3163 – 3170, 2012.

SILVEIRA, E. O.; NETO, J. H. L.; SILVA, L. A.; RAPOSO, A. E. S.; MAGNANI, M.; CARDARELLI, H. R. The effects of inulin combined with oligofructose and goat cheese whey on the physicochemical properties and sensory acceptance of a probiotic chocolate goat dairy beverage. **LWT – Food Science and Technology**, 2014.

STALIANO, C. D.; MARTINEZ, R. C. R.; SAAD, S. M. I. Beneficial microorganisms viability and sensory acceptance of a potentially synbiotic dairy-based tomato spread. **LWT – Food Science and Technology**, 2014.

Considerações finais

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que o desenvolvimento das sobremesas lácteas resultou em produtos de boa qualidade higiênico sanitária e bons atributos sensoriais durante toda a estocagem.

Durante os 28 dias de armazenamento das sobremesas probiótica e simbiótica houve redução de pH e aumento da acidez sem interferir na viabilidade do *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81, que manteve-se acima do nível recomendado.

A simulação *in vitro* das condições gástricas demonstrou tolerância do *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 ao pH 2,5 e 3,5 durante duas horas, ao longo do armazenamento refrigerado.

Referências

REFERÊNCIAS

AICHINGER, P. A.; MICHEL, M.; SERVAIS, C.; DILLMANN, M. L.; ROUVET, M.; D'AMICO, N.; ZINK, R.; HENNING, K.; HORNE, D. S. Fermentations of a milk concentrate with *Streptococcus thermophilus* and chymosin: structure, viscoelasticity and syneresis of gels. **Colloids and Surfaces**, v. 31, p. 243-255, 2003.

AL-SHERAJI, S. H.; ISMAIL, A.; MANAP, M. Y.; MUSTAFA, S.; YUSOF, R. M.; HASSAN, F. A. Prebiotics as functional foods: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1542 – 1553, 2013.

ALJEWICZ, M.; SIEMIANOWSKA, E.; CICHOSZ, G.; TONSKA, E. The effect of probióticos (*Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus paracasei* LPC-37, and *Lactobacillus acidophilus* NCFM) on the availability of minerals fro Dutch-type cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 4824 – 4831, 2014.

ARAGON-ALEGRO, L. C.; ALEGRO, J. H. A.; CARDARELLI, H. R.; CHIU, M. C.; SAAD, S. M. I. Potentially probiotic and symbiotic chocolate mousse. **LWT – Food Science and Technology**, v. 40, p. 699 – 675, 2007.

ARES, F.; ARRARTE, E.; LEÓN, T.; ARES, G.; GÁMBARO, A. Development of functional milk desserts enriched with resistant starch based on consumers perception. **Food Science and Technology International**, v. 18, n. 5, p. 465-475, 2013.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (AOAC). **Official Methods of Analysis**, 13 ed., Washington, AOAC, 2002.

BALLUS, C. A.; KLAJN, V. M.; CUNHA, M. F.; OLIVEIRA, M. L. de; FIORENTINI, A. M. Aspectos científicos e tecnológicos do emprego de culturas probióticas na elaboração de produtos lácteos fermentados: Revisão. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 28, n. 1, p. 85-96, 2010.

BERTAZZONI MINELLI, E.; BENINI, A.; MARZOTTO, M.; SBARBATI, A.; RUZZENENTE, O.; FERRARIO, R.; HENDRIKS, H.; DELLAGLIO, F. Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 8, p. 723-736, 2004.

BRASIL, ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária, **Resolução RDC nº 12, 02 de janeiro de 2001**. Regulamento Técnico sobre padres microbiológicos para alimentos.

Disponível em:

http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 19 de setembro 2013.

BRASIL, ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária, **Resolução RDC nº 2, 7 de janeiro de 2008**. Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional ou de Saúde, Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 19 de setembro 2013.

BURITI, F. C. A.; CARDARELLI, H. R.; FILISETTI, T. M. C. C.; SAAD, S. M. I. Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1605 – 1610, 2007.

BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in symbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2-3, p. 121 – 129, 2010.

CHAMPAGNE, C. P.; ROSS, P. R.; SAARELA, M. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 3, p.185–193, 2011.

CHIU, C. H.; LU, T. Y.; TSENG, Y. Y.; PAN, T. M. The effects of *Lactobacillus* – fermented milk on lipid metabolism in hamsters fed on high-cholesterol diet. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 238-245, 2006.

CORRÊA, S. B. M.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Probiotic potential and sensory properties of coconut flan supplemented with *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. **International Journal of Food and Technology**, v. 43, p. 1560 – 1568, 2008.

COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. **Alimentos Funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010. 536p.

DELGADO, G. T. C.; TAMASHIRO, W. M. S. C.; JUNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): A functional food. **Plants Foods for Human Nutrition**, May, 2013.

Di BARTOLOMEO, F.; STARTEK, J. B.; VAN DEN ENDE, W. Prebiotics to fight diseases: Reality or fiction? **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 1457 – 1473, 2013.

DOLINSKY, M. **Nutrição Funcional**. São Paulo: Roca, 2009. 204p.

DUTCOSKY, S. D. **Análise Sensorial de Alimentos**. 4ª ed. Curitiba: Champagnat: 2013. 531p.

GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; NAZARRO, F.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts and products. **Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 3, p. 292 – 302, 2010.

HABIB, N. C.; HONORÉ, S. M.; GENTA, S. B.; SÁNCHEZ, S. S. Hypolipidemic effect of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots on diabetic rats: Biochemical approach. **Chemico-Biological Interactions**, v. 194, n. 1, p. 31-39, 2011.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, p. 329-347, 2008.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; da SILVA, R. C.; LOBO, A. R.; COLLI, C.; GIOIELLI, L. A.; SAAD, S. M. I. Nutrition claims for functional guava mousses produced with Milk fat substitution by inulin and/or whey protein concentrate based on heterogeneous food legislations. **LWT – Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 755 – 765, 2013.

LIN, F. M.; CHIU, C. H.; PAN, T. M. Fermentation of milk-soymilk and Lycium chinense Miller mixture using a new isolate of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and *Bifidobacterium longum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 559-564, 2004.

LISERRE, A.M., RÉ, M.I., FRANCO, B.D.G.M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate–chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Biotechnology**, v. 21, n. 7, p. 1–16, 2007.

KOLIDA, S.; GIBSON, G. R. Synbiotics in health and disease. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 2, p. 373 – 393, 2011.

MARTINS, M. L. R.; DELMASCHIO, K. L.; CORDEIRO, A. A. Efeitos da utilização de *Smallanthus sonchifolius* (yacon) no tratamento de indivíduos com *Diabetes Mellitus*. **Revista CERES**, v. 6, n. 1, p. 35 – 43, 2011.

MEDICI, M.; VINDEROLA, C. G.; PERDIGÓN, G. Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresco cheese. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 611-618, 2004.

MISHRA, V.; PRASAD, D. N. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus*

casei in strains as potential probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 109 – 115, 2005.

MORAIS, E. C.; MORAIS, A. R.; CRUZ, A. G.; BOLINI, H. M. A. Development of chocolate dairy dessert with addition of prebiotics and replacement of sucrose with different high-intensity sweeteners. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 5, p. 2600 – 2609, 2014.

MORRIS, C.; MORRIS, G. A. The effect of inulin and fructo-oligosaccharide supplementation on the textural, rheological and sensory properties of bread and their role in weight management: A review. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 237 – 248, 2012.

NIKAEDO, P. H. L.; AMARAL, F. F.; PENNA, A. L. B. Caracterização tecnológica de sobremesas lácteas achocolatadas cremosas elaboradas com concentrado protéico de soro e misturas de gomas carragena e guar. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 397 – 404, 2004.

NOBRE, C.; SUVAROV, P.; De WEIRELD, G. Evaluation of commercial resins for fructo-oligosaccharide separation. **New Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 55 – 63, 2014.

ORTAKCI, F.; BROADBENT, J. R.; McMANUS, W. R.; McMAHON, D. J. Survival of microencapsulated probiotic *Lactobacillus paracasei* LBC-1e during manufacture of Mozzarella cheese and simulated gastric digestion. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 11, p. 6274 – 6281, 2012.

PADILHA, V. M.; ROLIM, P.M.; SALGADO, S. M. Perfil sensorial de bolos de chocolate formulados com farinha de yacon. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 735-740, 2010.

PESHEV, D.; VAN DEN ENDE, WM. Fructans: Prebiotics and immunomodulators. **Journal of Functional Foods**, v. 8, p. 348 – 357, 2014.

PIMENTEL, T. C.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H. Effect of long-chain inulin on the texture profile and survival of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* in set yoghurts during refrigerated storage. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 1, p. 104-110, 2012.

PIMENTEL, T. C.; CRUZ, A. G.; PRUDENCIO, S. H. Short communication: Influence of long-chain inulin and *Lactobacillus paracasei* subspecies *paracasei* on the sensory profile and acceptance of a traditional yogurt. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 10, p. 6233 – 6241, 2013.

QUIGLEY, M.M. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota **Pharmacological Research**, v. 61, n. 3, p. 213-218, 2010.

RANADHEERA, R. D. C. S.; BRAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2010.

ROBERFROID, M.B. Introducing inulin-type fructans. **British Journal of Nutrition**, v. 93, n. 1, p. 13-25, 2005.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics: The Concept Revisited. **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3, p. 830-837, 2007.

SAAD, S. M. I. **Probióticos e prebióticos em alimentos: Fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Varela, 2011. 669p.

SAAD, S. M. I.; BEDANI, R. Alimentos funcionais probióticos e prebióticos. In. Tirapegui, J., ed, **Nutrição e Aspectos Atuais**, 3. Ed. São Paulo: Atheneu. 2013. Cap. 21, p. 241 – 356.

SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J. M.; BRESSOLLIER, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic. **LWT – Food Science and Technology**, v. 50, p. 1-16, 2013.

SCHELL, D.; BEERMANN, C. Fluidized bed microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* with sweet whey and shellac for improved acid resistance and in-vitro gastro-intestinal survival. **Food Research International**, v. 62, p. 308 – 314, 2014.

SILVA, A. S. S.; HAAS, P.; SARTORI, N. T.; ANTON, A. A.; FRANCISCO, A. Frutoligosacarídeos: fibras alimentares ativas. **B. CEPPA**, v. 25, n.2, p. 295-304, 2007.

SILVA, A. S.; HONJOYA, E. R.; INAY, O. M.; COSTA, M. R.; SOUZA, C. H. B.; SANTANA, E. H. W.; SUGUIMOTO, H. H.; ARAGON-ALEGRO, L. C. Viability of *Lactobacillus casei* in chocolate flan and its survival to simulated gastrointestinal conditions. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, suppl. 2, p. 3163 – 3170, 2012.

SIMPSON, P. J.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F. Genomic diversity and relatedness of bifidobacteria isolated from a porcine cecum. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 8, p. 2571 – 2581, 2003.

SINGH, K.; KALLALI, B.; KUMAR, A.; THAKER, V. Probiotics: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. S287 – S290, 2011.

STATSOFT, Inc, **STATISTICA for Windows 6.0** [Computer program manual], Tulsa- UK: StatSoft, 2002.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 225 – 241, 2014.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics: from Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 714 – 728, 2008.

VIDIGAL, M. C. T. R.; MINIM, V. P. R.; BERGER, E. C.; RAMOS, A. M.; MINIM, L. A. Concentrado proteico do soro melhora a qualidade sensorial de sobremesa láctea *diet*. **Ciência Rural**, v. 42, n. 12, p. 2272-2279, 2012.

XIE, N.; ZHOU, T.; LI, BO. Kefir yeasts enhance probiotic potentials of *Lactobacillus paracasei* H9: The positive effects of coaggregation between the two strains. **Food Research International**, v. 45, n.1, p. 395 – 401, 2012.

Apêndice

APÊNDICE

APÊNDICE A - Ficha de Aceitabilidade e Intenção de compra

FICHA DE ACEITABILIDADE			
Nome: _____			
Data: ____/____/____			
Por favor, avalie as amostras servidas e indique o quanto você gostou ou desgostou do produto. Marque a resposta utilizando a escala abaixo:			
(9) Gostei extremamente	Amostra: _____	Amostra: _____	Amostra: _____
(8) Gostei muito	Sabor: ()	Sabor: ()	Sabor: ()
(7) Gostei moderadamente	Consistência: ()	Consistência: ()	Consistência: ()
(6) Gostei ligeiramente	Impressão Global: ()	Impressão Global: ()	Impressão Global: ()
(5) Indiferente			
(4) Desgostei ligeiramente			
(3) Desgostei moderadamente			
(2) Desgostei muito			
(1) Desgostei extremamente			
Comentários: _____			

FICHA DE INTENÇÃO DE COMPRA	
Você está recebendo três amostras codificadas. Avalie cada uma segundo a sua intenção de compra, utilizando a escala abaixo:	
(5) Certamente compraria	Amostra: _____ ()
(4) Provavelmente compraria	Amostra: _____ ()
(3) Tenho dúvida se compraria	Amostra: _____ ()
(2) Provavelmente não compraria	Amostra: _____ ()
(1) Certamente não compraria	Amostra: _____ ()
Comentários: _____	

APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr.(a) para participar, como voluntário (a), da pesquisa **Desenvolvimento de sobremesa láctea cremosa de chocolate adicionada de fruto-oligossacarídeo e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei***, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Marcela Sarmiento Valencia, E-mail: msarmentov@hotmail.com, e está sob a orientação da: Prof^a. Dra. Tânia Lúcia Montenegro Stamford (E-mail: tlmstamford@yahoo.com.br).

Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar a fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr.(a) não será penalizado (a) de forma alguma. O (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

A pesquisa tem como **objetivo** o desenvolvimento de sobremesas lácteas, sensorialmente aceitas, adicionadas de fruto-oligossacarídeo (FOS) e micro-organismos probióticos viáveis durante toda a vida de prateleira, resultando em benefícios a saúde dos consumidores. Nosso trabalho se **justifica** por contribuir com a área de biotecnologia na formulação de novos produtos funcionais, visando à saúde dos consumidores.

A **metodologia** inclui várias etapas, desde a formulação das sobremesas lácteas, verificação das características tecnológicas, incluindo dentre outras análises, a avaliação sensorial das sobremesas em diferentes períodos de armazenamento, estudo da viabilidade das bactérias lácticas probióticas e verificação da sobrevivência do *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* às condições gastrointestinais *in vitro*.

Antes de aceitar participar da pesquisa, leia atentamente as explicações sobre o procedimento da pesquisa.

- a) Cada participante receberá 3 amostras diferenciadas de sobremesas lácteas. O procedimento terá o tempo de duração de aproximadamente 10 minutos para a degustação das amostras.
- b) As amostras serão provadas individualmente, e entre as amostras, o participante receberá água filtrada para lavagem da cavidade oral e neutralização do paladar.
- c) O participante receberá uma ficha de avaliação para cada amostra.

A sua participação poderá envolver riscos ou desconfortos provocados por intolerância à lactose e pelo consumo de fibras presentes nas formulações tais como, diarreia, flatulência, cólicas e distensão abdominal. Todos esses sintomas cessarão com a interrupção do consumo do produto. Entretanto lhe serão garantidos todos os cuidados necessários a sua participação de acordo com seus direitos individuais e respeito ao seu bem estar físico e psicológico.

Prevêem-se como benefícios da realização da pesquisa: conhecer a aceitabilidade das sobremesas lácteas adicionadas de FOS e micro-organismos probióticos; Facilitar a inserção de um produto novo com propriedades funcionais, no mercado; Analisar qual das formulações do produto será mais bem aceita; Identificar qual atributo deve ser melhorado nas formulações; Verificar se o consumidor teria interesse em adquirir o produto através dos resultados obtidos na ficha de intenção de compra, e através de entrevista de aceitabilidade. Dentre os benefícios diretos aos participantes, ter-se-á o equilíbrio da microbiota intestinal atuando de maneira preventiva no desenvolvimento de doenças provocadas por bactérias patogênicas, redução dos níveis de colesterol e imunoestimulação. Este benefício será potencializado caso no futuro o produto venha a ser consumido diariamente.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa na forma de questionário, ficarão armazenados em pastas de arquivo e em computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora, no endereço acima informado, pelo período de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidos pelos pesquisadores (ressarcimento de despesas). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (**Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br**).

Marcela Sarmiento Valencia
(Pesquisadora responsável/Orientanda)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **Desenvolvimento de sobremesa láctea cremosa de chocolate adicionada de fruto-oligossacarídeo e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei***, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Recife, _____ de _____ de _____

Assinatura do participante (ou responsável legal)

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do voluntário em participar (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____