



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ISABELLA RABASSI DE LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO VEGETAL
DESIDRATADO A BASE DE RAÍZES TUBEROSAS
FERMENTADAS COM BACTÉRIAS PROBIÓTICAS
PROTEGIDAS PELA PRESENÇA DE BETAÍNA**

Londrina
2010

ISABELLA RABASSI DE LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO VEGETAL
DESIDRATADO A BASE DE RAÍZES TUBEROSAS
FERMENTADAS COM BACTÉRIAS PROBIÓTICAS
PROTEGIDAS PELA PRESENÇA DE BETAÍNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Garcia

Londrina
2010

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação -na-Publicação (CIP)

L732d Lima, Isabella Rabassi de.

Desenvolvimento de produto vegetal desidratado a base de raízes tuberosas fermentadas com bactérias probióticas protegidas pela presença de betaína / Isabella Rabassi de Lima. – Londrina, 2010.
91 f. : il.

Orientador: Sandra Garcia.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Alimentos desidratados – Teses. 2. Inulina – Teses. 3. Lactobacilo – Teses. 4. Beterraba – Desidratação – Teses. 5. Alimentos – Conservação – Teses. I. Garcia, Sandra. II. Universidade Estadual e Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 664.8.047

ISABELLA RABASSI DE LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO VEGETAL DESIDRATADO A
BASE DE RAÍZES TUBEROSAS FERMENTADAS COM BACTÉRIAS
PROBIÓTICAS PROTEGIDAS PELA PRESENÇA DE BETAÍNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Sandra Garcia
UEL – Londrina - PR

Dra. Kátia Sivieri
UNESP – Araraquara – SP

Dra. Izildinha Moreno
ITAL – Campinas – SP

Londrina, 20 de agosto de 2010.

À Deus, por abençoar, guiar e iluminar o meu caminho durante toda a minha vida.

À minha família, meus pais Neide e Sidney e minhas irmãs Marcella e Daniella, pelo amor absoluto, dedicação, carinho, estímulo, confiança e apoio.

Ao meu noivo Eduardo, por todo o amor, carinho, estímulo, compreensão e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que se faz presente a cada segundo, sempre abençoando, iluminando e guiando meu caminho, meus passos, meus atos, minhas palavras, minhas decisões, enfim, a minha vida.

À minha mãe por sempre estar ao meu lado, nos momentos fáceis, mas principalmente nos difíceis, orando por mim, me amparando, permitindo que eu sempre tivesse força e ânimo para continuar.

À minha família, por nunca permitir que eu desistisse dos meus sonhos, sempre me dando força e apoio para seguir em frente.

Ao meu noivo e companheiro de trabalho, Eduardo, por todas as vezes em que estive ao meu lado; pela paciência, compreensão, apoio, carinho e amor incondicional.

À Prof. Dra. Sandra Garcia, pela orientação, ensinamentos e por toda a atenção dedicada a este trabalho.

À SACCO, pela cultura probiótica de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus*, que foi fundamental para a realização da pesquisa.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina por todos os ensinamentos, em especial ao Prof. Raul, Rubens, Célia, Maria Alice, Alessandra, Patrícia, Nelson, Neusa e Berenice.

À Karla Bigetti Guergoletto, por todo o apoio, por sempre se dispor a me ajudar e por toda a contribuição neste trabalho, partilhando suas experiências e conhecimento.

Às minhas amigas Giselle, Fernanda e Agnes, por todos os momentos de alegria e descontração, e também pela grande ajuda nos momentos de dúvidas e incertezas.

Aos companheiros de mestrado e laboratório de Microbiologia, pelos momentos alegres e descontraídos.

À Fundação Araucária e CNPQ, pela concessão das bolsas de estudos.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

"É melhor atirar-se à luta em busca de dias melhores, mesmo correndo o risco de perder tudo, do que permanecer estático, como os pobres de espírito, que não lutam, mas também não vencem; que não conhecem a dor da derrota, nem a glória de ressurgir dos escombros. Esses pobres de espírito, ao final de sua jornada na Terra, não agradecem a Deus por terem vivido, mas desculpam-se perante Ele, por terem apenas passado pela vida..."

(Robert Nesta Marley)

LIMA, Isabella Rabassi de. **Desenvolvimento de produto vegetal desidratado a base de raízes tuberosas fermentadas com bactérias probióticas protegidas pela presença de betaína**. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

A atual preocupação com a saúde e com a qualidade de vida tem levado as pessoas a desenvolverem hábitos cada vez mais saudáveis, dentre os quais tem se destacado o consumo de alimentos contendo prebióticos e probióticos. Este trabalho objetivou desenvolver um produto vegetal desidratado a base de raízes tuberosas fermentadas com uma cultura mista de bactérias probióticas (LPR A), constituída por *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus*. A biomassa da cultura LPR A obtida após centrifugação foi lavada com solução salina 0,85% (p/v) estéril, ressuspensa em 80 ml de água destilada estéril e adicionada aos substratos previamente preparados de acordo com o Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice”. Os componentes utilizados foram beterraba, batata-doce e mandioquinha-salsa, e a resposta a porcentagem de células viáveis recuperadas após a secagem. Cada ensaio gerado pelo planejamento experimental foi inoculado com 10⁶-10⁷ UFC.g⁻¹, incubado em sacos plásticos hermeticamente fechados por 48 horas a 30°C, desidratado em estufa de circulação forçada a 43-45°C e moído. Foram realizadas análises de viabilidade celular, pH, atividade de água (Aw), umidade, betaína e inulina. Na beterraba pura, ensaio com maior sobrevivência celular, o efeito da betaína industrial como protetor celular foi avaliado, sendo utilizadas concentrações de 0,5 e 2 mM de betaína. As amostras foram armazenadas em sachês de Polipropileno Biorientado (BOPP) metalizado e estocadas a 25°C. A estabilidade foi avaliada por 60 dias, com análises de viabilidade celular, pH, Aw, umidade, betaína e inulina realizadas a cada 15 dias. O componente puro utilizado no ensaio 1 (beterraba) apresentou o maior percentual de células recuperadas após a secagem, 92,62%, e os maiores percentuais de betaína (1,78%) e inulina (23,33%) antes dos processos de fermentação e secagem. Por outro lado, o ensaio 10 (mistura ternária) rendeu o menor percentual de células recuperadas, 34,9%. A maior e menor redução dos percentuais de betaína e inulina durante os processos de fermentação e secagem foi encontrada nos ensaios 1 e 10, respectivamente. O ensaio no qual a betaína industrial foi adicionada à beterraba na concentração de 2 mM apresentou o maior percentual de células recuperadas após a secagem da cultura LPRA (87,75%), do *L. rhamnosus* (90,34%) e do *L. plantarum* (87,75%). A maior redução dos percentuais de betaína foi verificada no ensaio onde a betaína industrial foi adicionada à beterraba na concentração de 2 mM. A maior redução dos percentuais de inulina, entretanto foi encontrada no ensaio onde a betaína industrial não foi adicionada. Durante o armazenamento, a maior viabilidade celular foi obtida com a adição de 2 mM de betaína industrial. A contagem da cultura LPR A no produto vegetal atingiu ao final do período de armazenamento 7,94 log UFC.g⁻¹, enquanto os *L. rhamnosus* e *L. plantarum* alcançaram 4,75 log UFC.g⁻¹ e 7,94 log UFC.g⁻¹, respectivamente. Durante o armazenamento, não foi observada variação nos valores de pH, Aw, umidade, betaína e inulina.

Palavras-chave: *Lactobacillus plantarum*. *Lactobacillus rhamnosus*. Viabilidade. Osmólito. Beterraba.

LIMA, Isabella Rabassi de. **Development of a dehydrated vegetable product based on tuberous roots fermented with probiotic bacteria protected by the presence of betaine.** 2010. 107p. Dissertation (Master's degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

The current concern with health and quality of life has led people to develop more healthy habits, among which stands out the consumption of foods containing prebiotics and probiotics. This study aimed to develop a dehydrated vegetable product based on tuberous roots fermented with a mixed culture of probiotic bacteria (LPR A), consisting *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus*. The culture LPR A biomass obtained after centrifugation was washed with sterile saline solution 0,85% (w/v), resuspended in 80 ml of sterile distilled water and added to the substrates previously prepared according to the Experimental Designs for mixtures of type "Simplex Lattice". The components used were beet, sweet potato and Peruvian carrot, and the response the percentage of viable cells recovered after drying. Each assay generated by the experimental design was inoculated with 10⁶-10⁷ CFU.g⁻¹, incubated in airtight closed plastic bags for 48 hours at 30°C, dehydrated in an oven of forced circulation at 43-45°C and milled. Analysis of cell viability, pH, water activity, moisture, betaine and inulin were performed. In pure beet, assay with the highest cell survival, the effect of industrial betaine as cell protectant was studied, using concentrations of 0,5 and 2 mM of betaine. The assays were packaged in sachets of biaxially orientated polypropylene (BOPP) and stored at 25°C. The stability was evaluated during 60 days, with analysis of cell viability, pH, water activity, moisture, betaine and inulin performed every 15 days. The pure component used in assay 1 (beet) had the highest percentage of cells recovered after drying, 92,62%, and the highest percentages of betaine (1,78%) and inulin (23,33%) before the fermentation and drying. On the other hand, assay 10 (ternary mixture) yielded the lowest percentage of cells recovered, 34,9%. The largest and smallest reduction in the percentage of betaine and inulin during the fermentation and drying was found in assays 1 and 10, respectively. The assay in which industrial betaine was added to the beet in the concentration of 2 mM presented the highest percentage of cells recovered after drying the culture LPR A (87,75%), *L. rhamnosus* (90,34%) and *L. plantarum* (87,75%). The largest reduction in the percentage of betaine was found in the assay where industrial betaine was added to the beet in the concentration of 2 mM. However, the largest reduction in the percentage of inulin was found in the assay where the industrial betaine was not added. During the storage, the highest cell viability was achieved with the addition of 2 mM of industrial betaine. Counts of culture LPR A reached 7,94 log CFU.g⁻¹ at the end of the storage period, while the *L. rhamnosus* and *L. plantarum* reached 4,75 log CFU.g⁻¹ and 7,94 log CFU.g⁻¹, respectively. During storage, there was no change in pH, water activity, moisture, betaine and inulin.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*. *Lactobacillus rhamnosus*. Viability. Osmolyte. Beet.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura química da inulina.....	27
Figura 2 –	Molécula de glicina betaína.....	44
Figura 3 –	Curva de correlação entre concentração de biomassa da cultura LPR A (constituída por <i>L. plantarum</i> e <i>L. rhamnosus</i>) e absorvância a 660nm.....	59
Figura 4 –	Curva de crescimento da cultura LPR A, composta por <i>L. plantarum</i> e <i>L. rhamnosus</i> , cultivada por 24 horas em Caldo MRS a 35-37°C.....	60
Figura 5 –	Representação das superfícies de resposta e dos pontos experimentais para os respectivos modelos matemáticos (linear, quadrático e especial cúbico.	64
Figura 6 –	Projeção da superfície de resposta em 2D destacando-se as estimativas dos valores da resposta (% de células viáveis recuperadas após a secagem) em função dos componentes da mistura (beterraba, batata-doce e mandioquinha-salsa.	67
Figura 7 –	Diagrama de Pareto para o Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice”.	68
Figura 8 –	Redução dos percentuais de betaína durante os processos de fermentação e secagem em cada um dos ensaios* referentes ao Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice”.	71
Figura 9 –	Redução dos percentuais de inulina durante os processos de fermentação e secagem em cada um dos ensaios* referentes ao Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice”.	73

- Figura 10** – Redução total dos percentuais de betaína durante os processos de fermentação e secagem e porcentagem de células recuperadas após o processo de secagem em cada um dos ensaios* referentes ao Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice”.74
- Figura 11** – Médias percentuais de determinações realizadas em duplicata de células da cultura LPR A (composta por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*) recuperadas em Agar MRS adicionado de cetoconazol (10 mg/ml) sob incubação de 35-37°C por 48 horas, após a secagem em estufa de circulação de ar a 43-45°C nos ensaios 1, 2 e 3. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.76
- Figura 12** – Médias percentuais de determinações realizadas em duplicata de células de *L. rhamnosus* recuperadas em Agar MRS adicionado de gentamicina (10 µg/ml) e de cetoconazol (10 mg/ml) sob incubação de 35-37°C por 48-72 horas, após a secagem em estufa de circulação de ar a 43-45°C nos ensaios 1, 2 e 3. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.78
- Figura 13** – Médias percentuais de determinações realizadas em duplicata de células de *L. plantarum* recuperadas após a secagem em estufa de circulação de ar a 43-45°C, por subtração das contagens de *L. rhamnosus* das contagens totais de bactérias lácticas, nos ensaios 1, 2 e 3. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.79

- Figura 14** – Redução dos percentuais de betaína e inulina durante os processos de fermentação e secagem da beterraba contendo a cultura LPR A, constituída por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, nos ensaios 1, 2 e 3. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.82
- Figura 15** – Redução total dos percentuais de betaína durante os processos de fermentação e secagem e porcentagem de células recuperadas da cultura LPR A, constituída por *L. plantarum* e *L. rhamnosus* após a secagem, nos ensaios 1, 2 e 3. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.83
- Figura 16** – Ensaio 1, composto pela beterraba pura, após a fermentação com a cultura LPR A (constituída por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*) (A) e após a secagem em estufa de circulação de ar a 43-45°C e moagem (B).84
- Figura 17** – Ensaio 2, composto pela beterraba pura e 0,5 mM de betaína industrial, após a fermentação com a cultura LPR A (constituída por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*) (A) e após a secagem em estufa de circulação de ar a 43-45°C e moagem (B).85
- Figura 18** – Ensaio 3, composto pela beterraba pura e 2 mM de betaína industrial, após a fermentação com a cultura LPR A (constituída por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*) (A) e após a secagem em estufa de circulação de ar a 43-45°C e moagem (B).85
- Figura 19** – Comportamento da cultura LPR A (composta por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*) nos ensaios 1, 2 e 3 durante o armazenamento por 60 dias, sob temperatura de 25°C. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.86

Figura 20 – Comportamento do *L. rhamnosus* (A) e *L. plantarum* (B) nos ensaios 1, 2 e 3 durante o armazenamento por 60 dias, sob temperatura de 25°C. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.87

Figura 21 – Média de análises realizadas em duplicata dos resultados obtidos para os percentuais de betaína (g de betaína/100 g de beterraba seca) (A) e inulina (g de inulina/100 g de beterraba seca) (B) nos ensaios 1, 2 e 3, durante o armazenamento por 60 dias na temperatura de 25°C. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Seqüência e tipos de microrganismos encontrados durante a fermentação vegetal.	30
Tabela 2 –	Composição nutricional por 100 gramas de parte comestível de mandioquinha-salsa (<i>Arracacia xanthorrhiza</i> Bancroft) crua.	34
Tabela 3 –	Composição de alimentos por 100 gramas de parte comestível (Centesimal, minerais, vitaminas) de batata-doce (<i>Ipomoea batatas</i> Lam.) crua.	36
Tabela 4 –	Composição de alimentos por 100 gramas de parte comestível (Centesimal, minerais, vitaminas) de beterraba crua (<i>Beta vulgaris</i> L.).	38
Tabela 5 –	Pontos do Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice” e os respectivos pesos das raízes utilizadas em cada experimento.	50
Tabela 6 –	Dados referentes à concentração de betaína industrial adicionada nos ensaios 1, 2 e 3.	55
Tabela 7 –	Médias percentuais de determinações realizadas em duplicata de células viáveis da cultura LPR A, composta por <i>L. plantarum</i> e <i>L. rhamnosus</i> , recuperadas após a secagem em estufa de circulação de ar a 43-45°C, em cada um dos ensaios referentes ao Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice”	63
Tabela 8 –	Análise de variância para o ajuste do modelo especial cúbico aplicado às respostas do Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice”.	65
Tabela 9 –	Coeficientes do modelo especial cúbico estimado para o Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice”.	65

Tabela 10 – Média de determinações realizadas em duplicata dos resultados obtidos para porcentagens de betaína (g de betaína/100 g de amostra seca) em cada um dos ensaios referentes ao Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice”, antes e depois dos processos de fermentação e secagem.	69
Tabela 11 – Média de determinações realizadas em duplicata dos resultados obtidos para porcentagens de inulina (g de inulina/100 g de amostra seca) em cada um dos ensaios referentes ao Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice”, antes e depois dos processos de fermentação e secagem.	70
Tabela 12 – Dados referentes à concentração de betaína industrial adicionada à solução de suspensão da biomassa (80 ml).	76
Tabela 13 – Média de análises realizadas em duplicata dos resultados obtidos para porcentagens de betaína (g de betaína/100 g de beterraba seca) em cada ensaio antes e depois dos processos de fermentação e secagem. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.	80
Tabela 14 – Média de análises realizadas em duplicata dos resultados obtidos para porcentagens de inulina (g de inulina/100 g de beterraba seca) em cada ensaio antes e depois dos processos de fermentação e secagem. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.	81
Tabela 15 – Média de análises realizadas em duplicata dos resultados obtidos para o pH nos ensaios 1, 2 e 3, durante o armazenamento por 60 dias na temperatura de 25°C. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.	88

Tabela 16 – Média de análises realizadas em duplicata dos resultados obtidos para a A_w nos ensaios 1, 2 e 3, durante o armazenamento por 60 dias na temperatura de 25°C. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.	89
Tabela 17 – Média de análises realizadas em duplicata dos resultados obtidos para a umidade nos ensaios 1, 2 e 3, durante o armazenamento por 60 dias na temperatura de 25°C. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.	89
Tabela 18 – Média de análises realizadas em duplicata dos resultados obtidos para os percentuais de betaína (g de betaína/100 g de beterraba seca) nos ensaios 1, 2 e 3, durante o armazenamento por 60 dias na temperatura de 25°C. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.	90
Tabela 19 – Média de análises realizadas em duplicata dos resultados obtidos para os percentuais de inulina (g de inulina/100 g de beterraba seca) nos ensaios 1, 2 e 3, durante o armazenamento por 60 dias na temperatura de 25°C. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.	90
Tabela 20 – Resultado obtido na análise de microrganismos patogênicos e indicadores e respectivos padrões microbiológicos exigidos pela legislação vigente para “raízes, tubérculos e similares, secas, desidratadas ou liofilizadas” encontrada na Resolução – RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001 da ANVISA.	92

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	PROBIÓTICOS	21
2.1.1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	23
2.1.2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	24
2.2	PREBIÓTICOS	25
2.2.1	Inulina	27
2.3	FERMENTAÇÃO	29
2.4	RAÍZES TUBEROSAS	31
2.4.1	Mandioquinha-salsa	32
2.4.2	Batata-doce	34
2.4.3	Beterraba	36
2.5	DESIDRATAÇÃO	39
2.6	PROTETORES CELULARES	40
2.6.1	Betaína	43
3	OBJETIVOS	46
3.1	OBJETIVO GERAL	46
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
4	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1	CULTURA PROBIÓTICA	47
4.2	RAÍZES TUBEROSAS	47
4.3	DETERMINAÇÃO DA FASE DE CRESCIMENTO	47
4.4	OBTENÇÃO DA BIOMASSA	48
4.5	OBTENÇÃO DOS SUBSTRATOS COMPOSTOS PELAS RAÍZES TUBEROSAS	49
4.6	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	50
4.7	FERMENTAÇÃO E SECAGEM DAS MISTURAS	51

4.8	SELEÇÃO DAS MISTURAS	51
4.8.1	Determinação da Viabilidade Celular	51
4.8.2	Análises Físico-Químicas	52
4.8.3	Determinação de Betaína	53
4.8.4	Determinação de Inulina	54
4.9	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA BETAÍNA INDUSTRIAL COMO PROTETOR CELULAR NA VIABILIDADE DOS MICRORGANISMOS ADERIDOS AS MISTURAS	54
4.10	AVALIAÇÃO DURANTE O ARMAZENAMENTO	56
4.11	CONTAGEM DE BACTÉRIAS LÁCTICAS	56
4.12	CONTAGEM DIFERENCIAL DE <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	57
4.13	CONTAGEM DIFERENCIAL DE <i>Lactobacillus plantarum</i>	57
4.14	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	57
5	RESULTADOS E DISCUSÃO	59
5.1	DETERMINAÇÃO DA FASE DE CRESCIMENTO	59
5.2	SELEÇÃO DAS MISTURAS	62
5.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA BETAÍNA INDUSTRIAL COMO PROTETOR CELULAR NA VIABILIDADE DOS MICRORGANISMOS ADERIDOS AS MISTURAS	75
5.4	AVALIAÇÃO DURANTE O ARMAZENAMENTO	86
5.5	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	92
6	CONCLUSÕES	93
	REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a preocupação crescente com a saúde e com a qualidade de vida tem levado as pessoas a desenvolverem hábitos cada vez mais saudáveis, dentre os quais tem se destacado o consumo de alimentos com alguma propriedade funcional. As mudanças nos hábitos alimentares e no estilo de vida são consequência da busca por uma saúde melhor.

São considerados alimentos funcionais aqueles que, além de fornecerem a nutrição básica, promovem a saúde através de mecanismos não previstos pela nutrição convencional (SANDERS, 1998). Nos últimos anos, o conceito de alimentos funcionais passou a se concentrar de maneira intensiva nos componentes alimentares que podem exercer efeitos benéficos sobre a composição da microbiota intestinal (ZIEMER; GIBSON, 1998), tais como os prebióticos e probióticos.

Os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis pelas enzimas digestivas, não absorvíveis pela mucosa intestinal e com a capacidade de afetar benéficamente o hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e atividade de uma ou mais bactérias benéficas do cólon (PEREIRA, 2007). Entre os prebióticos reconhecidos atualmente, estão a lactulose, a inulina e diversos oligossacarídeos, os quais fornecem carboidratos que as bactérias bífidas do cólon são capazes de fermentar. A inulina é um carboidrato largamente encontrado na natureza, funcionando como substância de reserva em muitas plantas (HAULY; MOSCATTO, 2002).

Os probióticos são considerados microrganismos vivos que conferem benefícios a saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades apropriadas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002; SANDERS, 2003; SAAD, 2006). As bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* têm sido mais freqüentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos. Dentre as espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, destacam-se o *L.*

plantarum e o *L. rhamnosus*, espécies importantes na fermentação de vários produtos vegetais (VISSER, 1986).

O sucesso de produtos contendo culturas probióticas depende muito da viabilidade da bactéria durante o período de vida útil do produto. Entre os fatores que influenciam a viabilidade dos microrganismos probióticos nos alimentos podem ser destacados o estado fisiológico dos organismos probióticos adicionados, as condições físicas de armazenamento, a composição química do produto no qual os microrganismos serão adicionados e possíveis interações dos probióticos com outras culturas “starter” (HELLER, 2001).

A utilização de compostos orgânicos de baixo peso molecular, coletivamente chamados de osmólitos, aparece como uma alternativa para manutenção da viabilidade dos microrganismos probióticos a longo prazo. Os osmólitos são solutos orgânicos que podem ser acumulados intracelularmente por diversos organismos submetidos a situações de estresse (YANCEY *et al.*, 1982; BASKAKOV, WANG; BOLEN, 1998; YANCEY, 2005). Este acúmulo tem a finalidade de balancear o aumento da osmolaridade extracelular. Alguns açúcares alcoóis, como o glicerol e o sorbitol; alguns açúcares, como a sacarose e a trealose; e alguns aminoácidos e seus derivados, como a glicina e a betaína, estão dentro do grupo de osmólitos (FERREIRA; VISSOCI; PENHA-SILVA, 2004). A betaína é amplamente encontrada na natureza e tem sido relatada como um osmólito eficaz em bactérias lácticas, principalmente nas espécies *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus plantarum* (ROBERT *et al.*, 2000).

Os microrganismos probióticos são geralmente encontrados em leites fermentados, queijos, fórmulas infantis, suco de frutas e bebidas a base de soro de leite (SAARELA *et al.*, 2000; SOUZA, 2006). Contudo, uma grande variedade de vegetais também pode ser utilizada como veículo de microrganismos probióticos, principalmente através do processo de fermentação.

Considerando a importância dos alimentos funcionais, o crescente interesse dos consumidores por uma melhor qualidade de vida e a necessidade das indústrias em diversificar seus produtos comercializados, este trabalho teve como objetivo desenvolver um produto vegetal desidratado baseado na fermentação de raízes

tuberosas com possíveis propriedades prebióticas e osmoprotetoras, utilizando uma cultura probiótica mista, composta por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*. Este produto poderia ser adicionado a alimentos comercializados prontos, tais como geléias, granolas, vitaminas, etc.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROBIÓTICOS

O termo “probiótico”, de origem grega, significa “pró-vida”, e tem sido utilizado das maneiras mais diversas ao longo dos últimos anos. A definição atualmente aceita internacionalmente é a de que eles são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios a saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002; SANDERS, 2003). No Brasil, a Anvisa (2002) define os probióticos como sendo microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo.

Segundo Saarela *et al.* (2000), os critérios para a seleção de microrganismos probióticos devem estar baseados em aspectos funcionais, tecnológicos e de segurança. Segundo os aspectos funcionais, o microorganismo deve ser resistente aos sais biliares e à acidez estomacal, possuir propriedades anti-mutagênicas e anti-carcinogênicas, produzir compostos antimicrobianos, e ter capacidade de modular a resposta imune e aderir aos tecidos intestinais. Já os aspectos tecnológicos a serem considerados incluem boas propriedades sensoriais, bem como capacidade de resistência às condições de produção industrial e sobrevivência na formulação final do produto. Para os aspectos de segurança, é importante que as linhagens destinadas ao consumo humano sejam de origem humana, sendo isoladas do trato gastrointestinal de humanos saudáveis, não apresentando histórico de patogenicidade e de associação com doenças, e não possuindo genes transmissíveis de resistência a antibióticos.

A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra patógenos. A utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento

à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (PUUPPONEN-PIMIÄ *et al.*, 2002).

Os potenciais benefícios nutricionais dos alimentos contendo agentes probióticos incluem: melhor digestibilidade das proteínas, gorduras e carboidratos; redução do conteúdo de lactose no produto e maior disponibilidade de lactase; aumento dos níveis das vitaminas do complexo B e de alguns aminoácidos como metionina, lisina e triptofano; e absorção acrescida de cálcio e ferro (GOMES; MALCATA, 1999; SAAD, 2006).

Os potenciais benefícios terapêuticos dos alimentos contendo microrganismos probióticos compreendem: ação antagônica contra agentes patogênicos entéricos através da acidificação, produção de inibidores microbianos e inibição da adesão de microrganismos patogênicos, o que leva a redução do desenvolvimento de distúrbios como diarreia, colites, diverticulite e colites provocadas por antibióticos; colonização do intestino por meio da sobrevivência ao ácido gástrico, resistência à lisozima e à baixa tensão superficial do intestino, adesão ao epitélio intestinal, multiplicação no trato gastrointestinal, e modulação imunitária; ação anticarcinogênica pela degradação de pré-carcinogênicos em compostos menos lesivos, redução de enzimas promotoras de carcinogênicos e estimulação do sistema imune; ação hipocolesterolêmica por produção de inibidores da síntese de colesterol ou utilização do colesterol por assimilação e precipitação com desconjugação dos sais biliares; e modulação imunitária pela interação na produção de macrófagos, e estímulo da produção de células supressoras de γ -interferon (GOMES; MALCATA, 1999; FOOKS; GLENN; GIBSON, 1999; SAARELA *et al.*, 2000; SAAD, 2006).

O sucesso de produtos contendo culturas probióticas depende não apenas das suas propriedades como promotores de saúde, mas também da viabilidade da bactéria durante o período de vida útil do produto, assim como da resistência da bactéria às condições do trato gastrointestinal superior. Entre os fatores que influenciam a viabilidade dos microrganismos probióticos nos alimentos podem ser destacados o estado fisiológico dos organismos probióticos adicionados, as condições físicas de armazenamento (tempo, temperatura), a composição química do produto no qual os microrganismos serão adicionados (acidez, conteúdo de carboidratos utilizáveis, fontes

de nitrogênio, conteúdo mineral, atividade de água, conteúdo de oxigênio) e possíveis interações entre os probióticos (bacteriocinas, antagonismo, sinergismo) com outras culturas “starter” (HELLER, 2001).

Para assegurarem um efeito benéfico, os produtos probióticos devem conter um mínimo de 10^6 - 10^7 UFC por mL ou g, o que confirma o pressuposto de que a dose diária recomendada é de 10^8 - 10^9 células viáveis, realizável pela ingestão de 100 ml ou g de produto fermentado contendo 10^6 - 10^7 células viáveis por mL ou g (GOMES; MALCATA, 1999; ANVISA, 2007).

Dentre os probióticos mais estudados, as bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as que apresentam dados mais consistentes. Dentre as bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, destacam-se *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. animalis*, *B. longum* e *B. thermophilum*. Dentre as bactérias lácticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, destacam-se *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. casei* - subsp. *paracasei* e subsp. *tolerans*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius* (SAAD, 2006).

2.1.1 *Lactobacillus plantarum*

Os *L. plantarum* são bactérias lácticas heterofermentativas facultativas (MOLIN, 2006). Apesar de serem considerados mesófilos, os *L. plantarum* também podem se multiplicar lentamente em temperaturas de 2°C a 8°C (CARR; CHILL; MAIDA, 2002). Suas células são pequenas, encorpadas, na forma de bacilos, regulares na aparência e freqüentemente arranjadas em filamentos longos (BOTTAZZI, 1988). Os *L. plantarum* crescem a 15°C (59°F), mas não a 45°C (113°F), produzem ambos os isômeros do ácido láctico (D e L), e são caracterizados por fermentar N-acetilglicosamina, amidalina, celobiose, esculina, frutose, galactose, glicose, gluconato, lactose, maltose, manitol, melibiose, rafinose, ramnose, ribose, salicina, sacarose, trealose e arabinose (exceto em algumas linhagens). Não possuem a capacidade de hidrolisar arginina, amido e xilose (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

Segundo De Vries et al. (2005) e Wels (2008), os *L. plantarum* são comumente encontrados no trato gastrointestinal humano, sendo muito utilizados como probióticos.

Os *L. plantarum* são importantes na fermentação de vários produtos vegetais (CEBECI; GÜRAKAN, 2003). Segundo Wels (2008), estes processos fermentativos podem envolver matérias-primas cruas derivadas de plantas, tais como azeitonas, chucrutes, pickles e mandioca. Em adição à fermentação destes vegetais, os *L. plantarum* também podem ser encontrados em uma variedade de processos fermentativos envolvendo produtos lácteos e cárneos (DE VRIES et al., 2005).

2.1.2 *Lactobacillus rhamnosus*

Os *L. rhamnosus* são microrganismos heterofermentativos facultativos, ou seja, capazes de produzir ácido láctico, após a fermentação de hexoses, e ácido láctico e acético, após a fermentação de pentoses (SACCARO, 2008). Suas células se apresentam em forma de bastão (0,8 – 1,0 por 2,0 – 4,0 μm), freqüentemente com as extremidades quadradas, ocorrendo isoladas ou em forma de correntes. São imóveis e crescem a 15 e 45°C; porém a maioria das linhagens cresce a 10°C, e algumas podem crescer a 48°C (COLLINS; PHILLIPS; ZANONI, 1989). Caracterizam-se por produzir L (+) ácido láctico e fermentar amidalina, arbutina, celobiose, frutose, galactose, β -gentiobiose, gluconato, glicose, lactose, manitol, manose, maltose, melezitose, N-acetilglicosamina, ramnose, ribose, salicina, sacarose, sorbitol, turanose e trealose. Não possuem a capacidade de hidrolisar arabinose, arginina, uréia, esculina, melibiose, rafinose, amido e xilose (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

Os *L. rhamnosus* têm sido amplamente estudados com relação a suas propriedades promotoras à saúde, sendo freqüentemente empregados como probióticos em alimentos industrializados (FELIS et al., 2001; STILES; HOLZAPFEL, 1997; ITSARANUWAT, AL-HADDAD; ROBINSON, 2003, apud BURITI; SAAD, 2007).

Produtos lácteos, como leite, iogurte, queijo e sorvetes, podem ser veículos em potencial para o consumo dos *L. rhamnosus* (SACCARO, 2008).

Segundo Gorbach (2002), citado por Cichoski et al. (2008), os *L. rhamnosus* fazem parte da microbiota intestinal saudável do homem e seus benefícios em relação à prevenção de distúrbios intestinais têm sido amplamente estudados.

2.2 PREBIÓTICOS

O termo prebiótico foi empregado por Gibson e Roberfroid (1995) para designar "ingredientes nutricionais não-digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e atividade de uma ou mais bactérias benéficas do cólon, melhorando sua saúde". Esses componentes atuam mais freqüentemente no intestino grosso, embora possam ter também algum impacto sobre os microrganismos do intestino delgado (GIBSON; ROBERFROID, 1995; ROBERFROID, 2001; SAAD, 2006).

Comparado com um probiótico, que introduz bactérias exógenas na microbiota intestinal, um prebiótico visa estimular o crescimento de um ou um número limitado de microrganismos potencialmente benéficos a saúde, modulando assim a composição do ecossistema natural (ROBERFROID, 2001).

Para serem consideradas prebióticas, as substâncias não devem ser hidrolisadas ou absorvidas durante a sua passagem pelo trato digestório superior; devem servir como substrato para uma ou mais bactérias intestinais benéficas, estas serão estimuladas a crescer e/ou tornarem-se metabolicamente ativas; devem possuir a capacidade de alterar a microbiota intestinal para uma composição mais saudável e devem induzir efeitos benéficos sistêmicos ou na luz intestinal do hospedeiro (FOOKS; FULLER; GIBSON, 1999).

Estão dentro do conceito de prebióticos alguns polissacarídeos como a inulina, o amido resistente, e diversos oligossacarídeos que fornecem carboidratos que as bactérias benéficas do cólon são capazes de fermentar, tais como a lactulose,

lactitol, lactosacarose, rafinose, fruto-oligossacarídeos, transgalacto-oligossacarídeos, isomalto-oligossacarídeos, xilo-oligossacarídeos, glico-oligossacarídeos (FOOKS, GLENN; GIBSON, 1999; CONWAY, 2001; SAAD, 2006; KOLIDA; GIBSON, 2007).

Os prebióticos podem ser obtidos na forma natural em sementes e raízes de alguns vegetais como a chicória, cebola, alho, alcachofra, aspargo, cevada, centeio, grãos de soja, grão-de-bico e tremoço. Também, podem ser extraídos por cozimento ou através de ação enzimática ou alcoólica. Há, também, os oligossacarídeos sintéticos obtidos através da polimerização direta de alguns dissacarídeos da parede celular de leveduras ou fermentação de polissacarídeos (CHIQUIERI, 2003).

As substâncias prebióticas agem alimentando e estimulando o crescimento de diversas bactérias intestinais benéficas, cujos metabólitos atuam também reduzindo o pH através do aumento da quantidade de ácidos orgânicos presentes no ceco. Ao mesmo tempo, elas atuam bloqueando os sítios de aderência, imobilizando e reduzindo a capacidade de fixação de algumas bactérias patogênicas na mucosa intestinal. Especula-se, também, que atuem estimulando o sistema imune, através da redução indireta da translocação intestinal por patógenos, que determinariam infecções após atingir a corrente sangüínea (CHIQUIERI, 2003).

Os prebióticos avaliados em humanos constituem-se dos frutanos e dos galactanos (CUMMINGS; MACFARLANE, 2002). Frutano é um termo genérico empregado para descrever todos os oligo ou polissacarídeos de origem vegetal e refere-se a qualquer carboidrato em que uma ou mais ligações frutossil-frutose predominam dentre as ligações glicosídicas. Os frutanos são polímeros de frutose linear ou ramificada ligados por ligações β (2-1) ou β (2-6), encontradas, respectivamente, na inulina e nos frutanos do tipo levanos. Os frutanos do tipo inulina dividem-se em dois grupos gerais: a inulina e os compostos a ela relacionados – a oligofrutose e os fruto-oligossacarídeos (FOS). A inulina, a oligofrutose e os FOS são compostos quimicamente similares, com as mesmas propriedades nutricionais. Essas semelhanças, química e nutricional, são conseqüentes à estrutura básica, bem como à sua via metabólica em comum. A única diferença entre a inulina, a oligofrutose e os FOS é o grau de polimerização, ou seja, o número de unidades individuais de

monossacarídeos que compõem a molécula. Os frutanos são os polissacarídeos não-estruturais mais abundantes na natureza, após o amido. Eles estão presentes em grande variedade de vegetais e, também, em algumas bactérias e fungos (CARABIN; FLAMM, 1999).

2.2.1 Inulina

A inulina foi descoberta por Rose em 1804. Em meados do século XIX sua rota bioquímica foi elucidada, entretanto suas propriedades de resistência à digestão só foram descobertas no início do século XX. Mais recentemente é que foram descritas as propriedades benéficas à saúde deste tipo de carboidrato, aumentando, conseqüentemente, o interesse para sua produção industrial (SILVA, 2007).

A inulina é um polímero linear de alto peso molecular, contendo unidades de frutose com ligações do tipo β (2-1), com uma molécula de glicose na extremidade terminal (ALMEIDA *et al.*, 1988) (Figura 1).

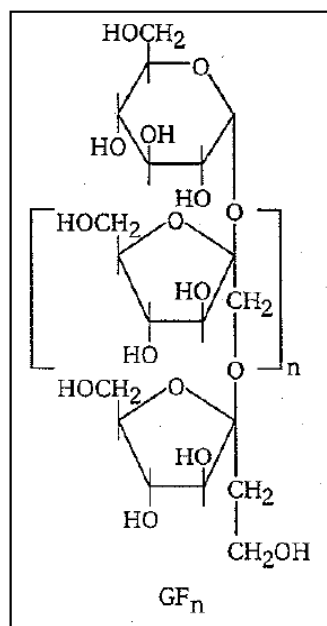


Figura 1 – Estrutura química da inulina.
Fonte: Roberfroid, 1993.

A inulina possui grau de polimerização que varia de 3 até mais de 60, sendo a média igual a 12 (GIBSON; ROBERFROID, 1995; NINESS, 1999; SILVA, 2007). Ela pode ser descrita pela fórmula GF_n , onde G representa a molécula de glicose, F a molécula de frutose e n o número de unidades de frutose (ROBERFROID, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 2004).

A composição em polímeros da inulina é estimada após a hidrólise dos açúcares totais através da relação dos conteúdos de glicose e frutose. Por definição, a relação frutose e glicose (F/G) é igual ao grau médio de polimerização da inulina/minuto (SCHORR-GALINDO; GUIRAUD, 1997, apud LEONEL *et al.*, 2006).

A inulina funciona como fibra alimentar solúvel e fermentável. Após a ingestão, ela não é hidrolisada no sistema digestivo humano devido à resistência à hidrólise oferecida pelas ligações β (2-1) entre as moléculas de frutose (ROBERFROID, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 2004). A degradação de inulina por fermentação de bactérias ocorre apenas a nível do cólon, gerando, uma baixa contribuição calórica indireta em níveis de 1,0 a 1,5 kcal/g de inulina (SILVA, 2007).

A inulina é um carboidrato largamente encontrado na natureza, funcionando como substância de reserva em muitas plantas. Alguns vegetais que contêm inulina fazem parte da dieta humana básica há muito tempo, dentre estes se destacam a cebola, o alho-porró, o alho, a cebolinha, os aspargos, o dente de leão, a barba de bode, a banana, os tubérculos de alcachofra de Jerusalém, e as raízes de dália, chicória e yacon. A concentração de inulina em cada planta depende muito da variedade, do tempo decorrido desde a colheita até a utilização e das condições de estocagem. Além dos vegetais, muitos cereais também contêm inulina; entre eles estão o trigo, a cevada e o centeio (HAULY; MOSCATTO, 2002).

Após sua extração e secagem, a inulina apresenta-se como um pó branco, amorfo, higroscópico, com odor e sabor neutros. Tem densidade de aproximadamente 1,35 e peso molecular de 1600 (HAULY; MOSCATTO, 2002).

Atualmente, as indústrias farmacêuticas e alimentícias têm encontrado aplicações para a inulina na produção de alimentos funcionais, compostos nutricionais e medicamentos (FIGUEIRA *et al.*, 2004).

2.3 FERMENTAÇÃO

A fermentação pode ser definida como um processo de modificação bioquímica do produto alimentar primário, causado por diferentes microrganismos e suas respectivas enzimas. O processo fermentativo pode apresentar várias finalidades, entre elas destacam-se o melhoramento das características sensoriais do material fermentado tais como gosto, aroma e textura; a agregação de valor nutricional ao produto; e o aumento do tempo de conservação dos alimentos (KAROVICOVÁ; KOHAJDOVÁ, 2005).

As bactérias mais importantes utilizadas na fermentação dos alimentos são as bactérias lácticas. Estas devem ser selecionadas de acordo com vários fatores, dentre os quais podemos citar o processo tecnológico aplicado, as propriedades da matéria-prima utilizada e as qualidades desejadas no produto final (RAKIN *et al.*, 2004).

As bactérias lácticas são responsáveis pela fermentação de diversos vegetais, dentre os quais podemos citar o repolho, o pepino, a azeitona, a cenoura, a beterraba, entre outros (ANDERSSON; DAESCHEL; ERIKSSON, 1988; GARDNER, 2001). Os alimentos vegetais fermentados podem ser obtidos por fermentação microbiana a partir de materiais crus ou cozidos (KAROVICOVÁ; KOHAJDOVÁ, 2005). Quando a fermentação ocorre no vegetal cru, ela pode ser realizada pelas bactérias naturalmente presentes no material (fermentação espontânea), ou pode ser realizada por uma cultura “starter” adicionada (fermentação induzida). De maneira geral, a fermentação de vegetais pode ser dividida em quatro estágios: início da fermentação, fermentação primária, fermentação secundária e pós-fermentação. Estas quatro fases refletem os diferentes tipos de microrganismos presentes e o complexo curso ecológico microbiano que a fermentação vegetal pode seguir (Tabela 1) (ANDERSSON, DAESCHEL; ERIKSSON, 1988; FLEMING, 1982).

Tabela 1 – Seqüência e tipos de microrganismos encontrados durante a fermentação vegetal.

Estágio de fermentação	Microrganismos
Iniciação	Várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas
Fermentação primária	Bactérias lácticas e leveduras
Fermentação secundária	Leveduras
Pós-fermentação	Aeróbicos: crescimento de leveduras, fungos e bactérias oxidativas;

Fontes: Andersson, Daeschel e Eriksson, 1988; Fleming, 1982.

As bactérias lácticas associadas com as fermentações vegetais geralmente pertencem às seguintes espécies: *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus brevis* e *L. plantarum* (ANDERSSON; DAESCHEL; ERIKSSON, 1988). Segundo Visser (1986), outras espécies também podem encontradas em materiais crus de origem vegetal, dentre elas encontram-se: *Lactobacillus bavaricus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus hilgardii*, *L. rhamnosus*, *Lactobacillus viridescens*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus vaccinoferus* e *Lactobacillus fermentum*.

Comparado com outros microrganismos, o número inicial de bactérias lácticas nos vegetais é relativamente pequeno. Assim, o andamento da fermentação vegetal espontânea é imprevisível, uma vez que ela é dependente de vários fatores, entre os quais se destacam o número inicial de microrganismos presentes e as condições físico-químicas da matéria-prima fermentada (ANDERSSON; DAESCHEL; ERIKSSON, 1988). Segundo Andersson, Daeschel e Eriksson (1988), o uso das chamadas culturas “starter” ajuda a padronizar a fermentação vegetal controlando a microbiota existente, particularmente os aeróbios (POTTS; FLEMING, 1982), e impedindo a deterioração do produto (AUKRUST *et al.*, 1994). A seleção da cultura “starter” utilizada deve ser baseada principalmente na concorrência entre o “starter” e a microbiota natural, assim como nas propriedades sensoriais do produto resultante (GARDNER, 2001).

As razões mais importantes para a utilização de vegetais na nutrição humana incluem a prevenção de doenças e o fornecimento de uma nutrição equilibrada, uma vez os alimentos de origem vegetal são fontes de minerais, vitaminas, carboidratos, fibras e substâncias antioxidantes (RAKIN *et al.*, 2004; YOON, WOODAMS; HANG, 2005). Entre os vegetais comumente fermentados, encontram-se raízes tuberosas como a cenoura, a beterraba, o nabo e a batata-doce (GARDNER, 2001; RAKIN *et al.*, 2004; JAGERSTAD; JASTREBOVA; SVENSSON, 2004; WONGKHALAUNG, 1995).

2.4 RAÍZES TUBEROSAS

A raiz é o órgão da planta que tipicamente se encontra abaixo da superfície do solo. Tem duas funções principais: servir como meio de fixação e como órgão absorvente de água, nutrientes, azoto ou nitrogênio e outras substâncias minerais como potássio e fósforo (VIDAL; VIDAL, 1990). Algumas raízes, podem acumular material nutritivo de reserva, estas são denominadas raízes tuberosas (CEREDA, 2002).

As raízes tuberosas abrangem um grande número de plantas com bulbos, raízes e tubérculos, que se encontram distribuídas nas regiões tropicais do globo (CEREDA, 2002). Entre as culturas mais comuns cita-se a mandioca, mandioquinha-salsa, inhame, taro, batata-doce, beterraba, yacon, etc. (CEREDA, 2002).

A importância destes cultivos pode ser verificada em três aspectos: cultivos de subsistência, cultivos de importância étnica ou cultural e cultivos de importância econômica. Uma mesma cultura pode apresentar diferentes formas de valorização, em diferentes países ou regiões do mundo. Um exemplo é a mandioca, que é cultivo de subsistência na África, de valorização cultural no Brasil e alguns países da América do Sul, e de importância econômica na Tailândia e China, onde pouco é utilizada para alimentação humana (CEREDA, 2002).

Eminentemente calóricas e rústicas, razão pela qual são consideradas alimentos de subsistência, são capazes de proporcionar energia para populações carentes, desempenhando um papel significativo no sistema global de alimentação (SCOTT; ROSEGRANT; RINGLER, 2000).

As tuberosas não são igualmente cultivadas ao redor do mundo, e sua composição nutritiva varia de um lugar para outro dependendo do clima, do solo, da variedade de colheita e de diversos outros fatores (FAO,1990). O nutriente principal fornecido pelas raízes tuberosas é energia dos carboidratos. Além do amido, as raízes podem conter igualmente alguns outros polissacarídeos, incluindo celulose, pectina e hemicelulose (FAO,1990). O índice de proteína é baixo, na maioria das vezes variando entre 1 e 2%, e em alguns casos ultrapassando 5%. Os aminoácidos encontrados são limitados aos sulfurados (FAO,1990). Todas as raízes tuberosas exibem um índice muito baixo de lipídios. Estes são principalmente os lipídios estruturais da membrana celular, e são de importância nutritiva limitada. A maioria consiste em quantidades iguais de ácidos graxos insaturados (linoléico e linolênico), e ácidos graxos saturados (esteárico e palmítico). Com relação às vitaminas, pode-se considerar que a maioria das tuberosas se constitui em boa fonte de vitaminas do grupo B, além do ácido ascórbico (vitamina C) e também do retinol (vitamina A) (FAO,1990). Os teores de minerais são mais estáveis, dentre estes se destacam o cálcio, o fósforo, o ferro, o sódio e o potássio (FAO,1990).

2.4.1 Mandioquinha-Salsa

A mandioquinha-salsa é uma planta eudicotiledônea, da ordem Umbellales, família Apiaceae (Umbelliferae), gênero *Arracacia*, espécie *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft (HERMANN, 1997).

É originária da região andina da América do Sul compreendida pela Venezuela, Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e Chile. Atualmente, ela é cultivada

principalmente no Brasil, Colômbia, Equador e Venezuela, sendo sua área cultivada de aproximadamente 30.000 ha; (HERMANN, 1997; MADEIRA; SOUZA, 2004).

No Brasil, ela é cultivada na região Centro-Sul, principalmente em áreas de elevada altitude e clima ameno, em Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Espírito Santo e São Paulo, onde ocorrem condições climáticas similares às de seu local de origem (CÂMARA, 1993; SANTOS, 1993, apud LEONEL; CEREDA, 2002). Conforme a região do país, a mandioquinha-salsa pode receber várias denominações: baroa ou batata baroa (Rio de Janeiro, Espírito Santo e Zona da Mata mineira), mandioquinha ou mandioquinha-salsa (São Paulo), fiúza ou batata-fiúza (Lavras e região), batata-salsa ou salsa (Paraná e Santa Catarina), cenoura-amarela ou cenoura (Barbacena e região), entre outras.

De acordo com Burgos *et al.* (2006), a mandioquinha-salsa caracteriza-se como um alimento essencialmente energético, pois se destacam os teores de carboidratos em relação aos demais nutrientes. Dos carboidratos totais, cerca de 80% correspondem ao amido e 6%, aos açúcares totais. O amido de mandioquinha-salsa contém amilose em torno de 23% (LEONEL; CEREDA, 2002), baixos teores de amilopectina e ausência total de fatores antinutricionais, o que lhe confere alta digestibilidade. As proteínas são incompletas, como ocorre em outras raízes e tubérculos, devido à deficiência na maioria dos aminoácidos essenciais. É notadamente fonte de vitaminas e minerais. Entre as vitaminas, ressaltam-se as do complexo B (tiamina, riboflavina e niacina) e as vitaminas A e C. Entre os minerais, destacam-se o cálcio, o manganês, o fósforo, o cobre, o zinco, o potássio, o sódio e o ferro.

A Tabela 2 apresenta a composição nutricional da mandioquinha-salsa crua.

Tabela 2 – Composição nutricional por 100 gramas de parte comestível de mandiquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) crua.

Componente	Unidade	Mandioquinha-salsa
Fibras	(%)	0,6
Calorias	cal	125,5
Água	(%)	76,7
Vit.A retinol	(µg)	20
Vit.B (tiamina)	(µg)	60
Vit.B2 (riboflavina)	(µg)	40
Vit.B3 (niacina)	(µg)	3,40
Vit.C (ácido ascórbico)	(mg)	28,0
Cobre	(mg)	0,59
Manganês	(mg)	2,800
Zinco	(mg)	1,80
Potássio	(mg)	586,6
Sódio	(mg)	61,5
Cálcio	(mg)	45
Ferro	(mg)	0,67
Fósforo	(mg)	101

Fonte: Luengo *et al.*, 2000.

2.4.2 Batata-Doce

A batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam.) é uma espécie dicotiledônea pertencente à família Convolvulaceae, gênero *Ipomoea*, espécie *Ipomoea batatas* Lam. É originária das Américas Central e do Sul, sendo encontrada desde a Península de Yucatán, no México, até a Colômbia (SILVA; LOPES; MAGALHÃES, 2002).

É a terceira tuberosa mais cultivada no mundo (LEONEL; CEREDA, 2002). No Brasil, a batata-doce aparece como a segunda hortaliça em área cultivada e a quarta mais consumida pela população, sendo produzida principalmente nos Estados

do Rio Grande do Sul, Paraíba, Pernambuco, Santa Catarina, Bahia, Rio Grande do Norte e Paraná (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

A maior parte das batatas-doces comercializadas apresenta casca (periderme) branca, rosa ou roxa e polpa branca ou creme, embora também sejam comercializadas batatas com casca amarela ou roxa e polpa amarela, salmão ou roxa (como beterrabas) (SOARES; MELO; MATIAS, 2002). Entre as variedades mais cultivadas no Brasil destacam-se os seguintes cultivares: Brazlândia Branca, com periderme branca, polpa seca, macia e de cor creme claro, e formato alongado; Brazlândia Rosada, com periderme rosa, polpa seca e de cor creme, e formato alongado; Brazlândia Roxa, com periderme roxa, polpa bem seca, doce e de cor creme, e formato alongado muito uniforme; e Coquinho, com periderme amarela pálida, polpa bem seca, doce e branca, e formato alongado ou arredondado (MIRANDA *et al.*, 1995).

A batata-doce é um alimento energético devido aos elevados teores de carboidratos presentes (CARDOSO *et al.*, 2007). Ao ser colhida, ela apresenta cerca de 30% de matéria seca que contém em média 85% de carboidratos, cujo componente principal é o amido. Comparada com outras estruturas vegetais amiláceas, possui maior teor de matéria seca, carboidratos, lipídios, cálcio e fibras que a batata, mais carboidratos e lipídios que o inhame e mais proteína que a mandioca (SILVA; LOPES; MAGALHÃES, 2002). Durante o armazenamento, parte do amido se converte em açúcares solúveis, atingindo de 13,4 a 29,2% de amido e de 4,8 a 7,8% de açúcares totais redutores (MIRANDA *et al.*, 1995), fornecendo em cada 100 gramas, 110 a 125 calorias (BARBOSA, 2005). Ela também apresenta baixos teores de proteínas e de gorduras. Como fonte de minerais, a batata-doce fornece cálcio, magnésio, manganês, fósforo, ferro, sódio, potássio, cobre e zinco. Entre as vitaminas, ressaltam-se as do complexo B (tiamina, riboflavina e piridoxina).

A Tabela 3 apresenta a composição nutricional da batata doce crua.

Tabela 3 – Composição de alimentos por 100 gramas de parte comestível (Centesimal, minerais, vitaminas) de batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam.) crua.

Umidade	%	69,5
Energia	Kcal	118
Proteína	g	1,3
Lipídios	g	0,1
Carboidrato	g	28,2
Fibra alimentar	g	2,6
Cinzas	g	0,9
Cálcio	mg	21
Magnésio	mg	17
Manganês	mg	0,18
Fósforo	mg	36
Ferro	mg	0,4
Sódio	mg	9
Potássio	mg	340
Cobre	mg	0,11
Zinco	mg	0,2
Vitamina B1 – Tiamina	mg	0,06
Vitamina B2 - Riboflavina	mg	Traço
Vitamina B6 - Piridoxina	mg	0,10

Fonte: Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação NEPA - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – UNICAMP (2006).

2.4.3 Beterraba

A beterraba é uma planta da família Chenopodiaceae, pertencente à espécie *Beta vulgaris* L., que segundo Lange, Brandenburg e De Bock (1999) divide-se em três subespécies: *Beta vulgaris* ssp. *adanesis*, grupo distinto de plantas semi- anuais, com características morfológicas específicas, que apresentam um grande declínio na autofertilização; *Beta vulgaris* ssp. *maritima*, formada por um grande

complexo de tipos morfológicos que ocorrem em uma vasta área geográfica, e cujas diferenças são insuficientes para estabelecer outras subdivisões; e *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*, que agrupa todas as cultivares já domesticadas.

Todas as cultivares da subespécie *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* (conhecidas até então) podem ser subdivididas em quatro grupos: beterrabas folhosas (*Leaf Beet Group*), cultivares nas quais as partes comestíveis são as folhas e os pecíolos, pois suas raízes não exibem diâmetro significativamente aumentado; beterrabas açucareiras (*Sugar Beet Group*), em sua maioria de coloração branca e que são cultivadas nos Estados Unidos da América e no continente europeu para produção de açúcar; beterrabas forrageiras (*Fodder Beet Group*), cultivares destinadas à alimentação de rebanhos; e beterrabas hortícolas (*Garden Beet Group*), único grupo cultivado comercialmente no Brasil formado por cultivares que apresentam uma parte tuberosa comestível (LANGE; BRANDENBURG; DE BOCK, 1999).

A beterraba (*Beta vulgaris* L.) é uma raiz tuberosa, originária da Europa e Norte da África, sendo o Oriente Médio considerado como centro de origem secundário (HERNANDES, 2006). Atualmente, ela é cultivada em vários países da Europa, da América do Norte e da Ásia, onde seu cultivo destina-se à produção de açúcar e forragem (MAY DE MIO *et al.*, 2008). No Brasil, a beterraba vermelha (hortícola) é uma das principais hortaliças cultivadas, ocupando a 13ª posição quanto ao volume de produção (MAY DE MIO *et al.*, 2008).

A beterraba vermelha (hortícola) apresenta elevado valor nutritivo devido ao seu conteúdo em vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina e piridoxina), vitamina C, além de minerais como cálcio, magnésio, manganês, fósforo, ferro, sódio, potássio, cobre e zinco. Além de apresentar elevado valor nutritivo (Tabela 4) e ser utilizada para o consumo humano, a beterraba possui forte apelo sensorial devido à sua cor vermelho-intensa. Sua coloração é decorrente da presença das betacianinas, pigmentos vermelhos que, juntamente com as betaxantinas, de coloração amarela, pertencem ao grupo das betalainas. Esses pigmentos são hidrossolúveis e possuem grande atividade antioxidante (PAVLOV, 2002).

A beterraba é rica em substâncias prebióticas como os frutoligossacarídeos (FOS). Os FOS podem ser originados por hidrólise enzimática da

inulina, processo que ocorre amplamente na natureza em uma grande variedade de plantas (mais de 36 mil) (ROBERFROID, 1993), mas principalmente na cebola, beterraba, alho e yacon (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

A Tabela 4 apresenta a composição nutricional da beterraba crua.

Tabela 4 – Composição de alimentos por 100 gramas de parte comestível (Centesimal, minerais, vitaminas) de beterraba crua (*Beta vulgaris* L.).

Componente	Unidade	Beterraba
Umidade	%	86
Energia	Kcal	49
Proteína	g	1,9
Lipídios	g	0,1
Carboidrato	g	11,1
Fibra alimentar	g	3,4
Cinzas	g	0,9
Cálcio	mg	18
Magnésio	mg	24
Manganês	mg	1,23
Fósforo	mg	19
Ferro	mg	0,3
Sódio	mg	10
Potássio	mg	375
Cobre	mg	0,08
Zinco	mg	0,5
Vitamina B1 - Tiamina	mg	0,04
Vitamina B2 - Riboflavina	mg	Traço
Vitamina B6 - Piridoxina	mg	0,04
Vitamina C	mg	3,1

Fonte: Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação NEPA - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – UNICAMP (2006).

2.5 DESIDRATAÇÃO

As bactérias lácticas têm sido extensamente estudadas devido a sua grande aplicação em muitos processos de fermentação sob a forma de culturas “starter” (CARVALHO et al., 2002). Para serem utilizadas como culturas “starter” em alimentos, as bactérias lácticas devem ser cultivadas sob circunstâncias controladas e preservadas por técnicas que garantam sua viabilidade e atividade funcional (KETS, TEUNISSEN; DE BONT, 1996; CARVALHO et al., 2002; PRASAD; MCJARROW; GOPAL, 2003; CARVALHO et al., 2004). A preservação industrial pode envolver diferentes processos, que incluem o congelamento, a liofilização e a secagem (PRASAD; MCJARROW; GOPAL, 2003), uma vez que os organismos e moléculas biológicas se encontram em seu estado mais estável quando congelados ou mantidos em uma matriz seca, isto é, em pó ou liofilizados (CONRAD et al., 2000).

A maior parte dos microrganismos probióticos congelados necessitam de refrigeração para seu armazenamento e distribuição, o que torna os custos deste procedimento elevados, dificultando a difusão de sua utilização. Neste contexto, a necessidade da refrigeração pode ser reduzida através do uso de culturas desidratadas, as quais são potencialmente superiores aos produtos no estado congelado, quanto à esterilidade e estabilidade (MENG et al., 2007)

A liofilização e a secagem em spray são as técnicas mais conhecidas para a desidratação de bactérias lácticas. A liofilização é a técnica mais difundida e utilizada por apresentar condições de processo mais brandas do que na secagem por spray (MENG et al., 2007). Alguns autores também têm citado o uso de estufas para a desidratação de produtos impregnados com células bacterianas (BETORET et al., 2003). Comparada à liofilização, a secagem convectiva é uma alternativa mais econômica para a preservação das culturas “starter” (LINDERS et al., 1997). Adicionalmente, a secagem convectiva não necessita do congelamento prévio do produto como ocorre na liofilização, tornando sua utilização interessante para a produção de alimentos desidratados.

Apesar de ser freqüentemente utilizada como um meio para estabilizar microrganismos probióticos, a desidratação pode causar efeitos secundários indesejáveis, tais como mudanças no estado físico dos lipídios da membrana celular e desnaturação de proteínas sensíveis, tendo como resultado a perda substancial de viabilidade (CARVALHO et al., 2002; CARVALHO et al., 2004; LESLIE et al. 1995). A perda de viabilidade é uma conseqüência dos danos sofridos pela célula bacteriana em diversos locais, como a parede celular, a membrana celular e o DNA (TEIXEIRA; CASTRO; KIRBY, 1995), bem como em conseqüência da oxidação dos lipídios da membrana (TEIXEIRA; CASTRO; KIRBY, 1996; CASTRO, TEIXEIRA; KIRBY, 1997).

Uma das vantagens da secagem convectiva é que ela pode ser realizada em temperaturas mais amenas. Em baixas temperaturas de secagem a inativação térmica é menor, porém quando o processo é realizado em temperaturas elevadas, a inativação causada pela desidratação pode impor graves problemas às células bacterianas, afetando principalmente as membranas celulares (LINDERS et al., 1997).

O máximo de sobrevivência das culturas de bactérias lácticas durante a desidratação e, subseqüente, longos períodos de armazenamento é de grande importância tecnológica e econômica (SELMER-OLSEN, BIRKELAND e SORHAUG, 1999). Na tentativa de reduzir as mudanças adversas ocorridas nas propriedades funcionais das células bacterianas, aumentando a viabilidade celular após o processo de secagem e durante longos períodos de armazenamento, diversos compostos têm sido analisados e utilizados como agentes protetores (FONT DE VÁLDEZ et al. 1983, LESLIE et al. 1995, CARVALHO et al., 2004).

2.6 PROTETORES CELULARES

Diversos microrganismos submetidos a situações de estresse tais como processos de congelamento, liofilização e secagem, são capazes de preservar suas atividades biológicas, através do acúmulo de compostos orgânicos de baixo peso

molecular, coletivamente chamados de osmólitos (FERREIRA; VISSOCI; PENHA-SILVA, 2004). Tal acúmulo tem a finalidade de balancear o equilíbrio osmótico entre os ambientes intra e extracelular (KETS; GALINSKI; DE BONT, 1994). Estes osmólitos são também conhecidos como solutos orgânicos, solutos compatíveis, osmoprotetores ou osmorreguladores.

Apesar de pertencerem a classes de compostos orgânicos com estruturas químicas diferentes, os osmólitos possuem características específicas em comum, geralmente são compostos de baixo peso molecular, não tóxicos, incapazes de interferir no metabolismo celular normal, e altamente solúveis em água (KETS et al., 1997; NYSSÖLÄ, 2001).

Os microrganismos que usam a estratégia dos osmólitos são geralmente capazes de acumular simultaneamente diversos compostos diferentes em resposta ao estresse osmótico. Em geral, a composição do osmólito intracelular pode variar consideravelmente dependendo das condições de crescimento e da disponibilidade dos osmólitos extracelulares (NYSSÖLÄ, 2001).

Os osmólitos são quimicamente classificados em três grandes grupos. Os açúcares alcoóis, como o glicerol e o sorbitol constituem o primeiro grupo. O segundo grupo é constituído pelos aminoácidos e seus derivados, compreendendo a glicina, a metil-glicina (ou sarcosina), a dimetil-glicina e a trimetil-glicina (ou betaína). O terceiro grupo de osmólitos compreende os açúcares, como a sacarose e a trealose (FERREIRA; VISSOCI; PENHA-SILVA, 2004).

Os osmólitos podem atuar na proteção celular de diferentes maneiras de acordo com sua natureza. Seus mecanismos de ação incluem a estabilização dos constituintes da membrana celular, formação de uma cobertura de proteção na proteína da parede celular, aumento da temperatura de transição vítrea e formação de interações fortes entre o protetor celular e a biomolécula, além disso, eles preparam as células para o estresse hiperosmótico que ocorre durante o processo de secagem (MENG et al. 2007; KETS, GALINSKI, DE BONT, 1994).

Alguns modelos têm sido estudados e utilizados para explicar os efeitos protetores ou estabilizadores dos osmólitos sobre as macromoléculas e membranas celulares.

O principal destes modelos é denominado “Modelo de Exclusão Preferencial”, segundo o qual os osmólitos são preferencialmente excluídos da camada de hidratação das proteínas e das superfícies das membranas celulares (NYSSÖLÄ, 2001; SANTIVARANGKNA; HIGL; FOERST, 2008). Este modelo de proteção se baseia no fato de que no interior da célula estão presentes moléculas de água com diferenças estruturais, resultantes dos diferentes graus de ligações de pontes de hidrogênio entre as mesmas. Dessa forma, a água que permanece ao redor das proteínas e das superfícies das membranas celulares é a água mais densa (constituída por moléculas altamente organizadas, que possuem menor motilidade), enquanto que a água que constitui o solvente aquoso ou citosol é a água menos densa (constituída por moléculas menos organizadas, com maior motilidade). Como os osmólitos possuem um escudo de hidratação fortemente ligado, eles se encaixam melhor na água menos densa do solvente aquoso. Como consequência da preferência dos osmólitos pela água menos densa, uma camada de osmólitos livre é formada na superfície das proteínas e das superfícies das membranas celulares, permitindo que estas permaneçam hidratadas e mantenham sua conformação nativa (NYSSÖLÄ, 2001; SANTIVARANGKNA; HIGL; FOERST, 2008).

Além disso, o acúmulo dos osmólitos permite que a célula mantenha seu tamanho original, devido ao incremento do volume de água citoplasmática livre, resultante da exclusão preferencial dos osmólitos da superfície das macromoléculas e membranas celulares. A presença dos osmólitos do interior da célula, e consequente restauração do volume celular, evita que ocorra o chamado fenômeno da “Aglomeração Macromolecular”, decorrente do encolhimento da célula que resulta do estresse osmótico, conduzindo a um aumento nas concentrações de DNA e de proteínas. A “Aglomeração Macromolecular” tem efeitos adversos em processos celulares, retardando o movimento difusível do substrato e reduzindo as taxas de reações enzimáticas (NYSSÖLÄ, 2001).

Outro mecanismo relacionado à proteção dos osmólitos refere-se ao aumento da temperatura de transição vítrea. Este é o principal mecanismo de proteção dos açúcares sobre as membranas celulares. A estabilidade das bicamadas de lipídios da membrana celular é mantida pelo equilíbrio entre duas forças contrárias, as forças

atrativas de Van der Waal's e as forças repulsivas de hidratação. Dessa forma, a bicamada lipídica é termodinamicamente instável e facilmente perturbada. O aumento da temperatura e a diminuição na quantidade de água, devido processo de secagem, levam a um aumento na Temperatura de Transição Vítreo (T_m), que é a responsável pela transição dos fosfolipídios da membrana da fase líquida cristalina para a fase de gel. Quando os fosfolipídios se encontram na fase de gel, pode ocorrer a ruptura da membrana celular devido a dois fatores: separação entre os domínios líquido e sólido (gel) que coexistem durante a fase de transição, e heterogeneidade dentro da mesma espécie de fosfolipídio (SANTIVARANGKNA; HIGL; FOERST, 2008).

Os açúcares atuam diminuindo a Temperatura de Transição Vítreo (T_m) da membrana de dois modos. O primeiro deles é através da substituição da água, na qual os açúcares se ligam à membrana fosfolipídica por meio de interações que ocorrem via pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxila dos açúcares e os grupos fosfatos da superfície das bicamadas de fosfolipídios. O segundo é a explicação das forças de hidratação, no qual o aumento da pressão osmótica da solução devido à presença dos osmólitos limita a remoção de água da superfície da membrana. Se a quantidade de água não diminui, não há aumento das forças atrativas de Van der Waal's, que se mantêm em equilíbrio com as forças repulsivas de hidratação, mantendo a membrana celular estável (SANTIVARANGKNA; HIGL; FOERST, 2008).

Segundo Nyssölä (2001), os mecanismos de atuação dos osmólitos como protetores devem ser estudados mais detalhadamente, uma vez que ainda não estão totalmente compreendidos.

2.6.1 Betaína

A betaína é um composto amônico quaternário, naturalmente encontrado na beterraba (*Beta vulgaris*), que possui papel osmolítico protetor. Este osmólito foi inicialmente isolado da beterraba em 1866 (NYSSÖLÄ, 2001). Atualmente, ela é produzida pela separação cromatográfica do melão da beterraba

Quimicamente, a betaína é um N-trimetil derivado da glicina, anfótero, bipolar, com a propriedade de interagir com macromoléculas hidrofílicas e hidrofóbicas, enzimas e complexos protéicos, além de ser extremamente solúvel em água (SAKAMOTO; MURATA, 2002; DESTRO, 2006). A betaína possui a fórmula $[(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-]$, peso molecular igual a 117,2 (WITHERS *et al.*, 1994) e é caracterizada como metilamina devido aos 3 grupos metil (YANCEY *et al.*, 1982) (Figura 2).

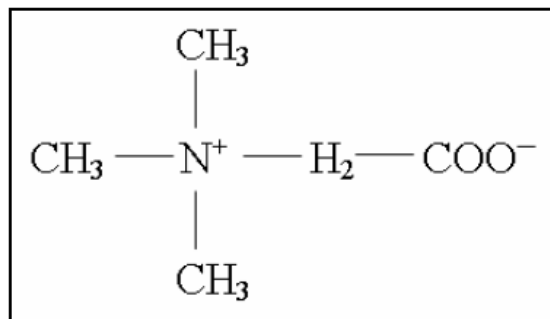


Figura 2 – Molécula de glicina betaína.
Fonte: Destro, 2006.

Também denominado glicina betaína, licina, trimetilglicina, ou ainda, oxineurina (CRAIG, 2004), sua ação se dá como um agente protetor da função metabólica celular e das membranas celulares quando estas são sujeitadas a diferentes estresses, tais como alta salinidade, secagem, calor e frio (EKLUND *et al.*, 2005; NYSSÖLÄ, 2001; HOLMSTRÖM *et al.*, 2000). De acordo com Nyssölä (2001), o principal mecanismo de proteção da betaína é o “Modelo da Exclusão Preferencial”.

A maioria das bactérias não sintetiza a betaína (MOLENAAR *et al.*, 1993). Segundo Kets, Galinski e De Bont (1994) e Kets, Teunissen e De Bont (1996), alguns microrganismos, incluindo organismos Gram-negativos e Gram-positivos, podem sintetizar a betaína através da conversão de seu precursor colina, o que pode ser visto em bactérias como *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. Outros microrganismos, entretanto, são dependentes do transporte deste composto diretamente de uma fonte

exógena, sendo a regulação do transporte induzida ou ativada pela osmolaridade elevada do meio; é o que ocorre em diversas espécies de bactérias lácticas, como, por exemplo, o *L. plantarum* (MOLENAAR *et al.*, 1993; GLAASKER; KONINGS; POOLMAN, 1996).

Dois sistemas de absorção têm sido descritos como sendo responsáveis pela acumulação de betaína. O primeiro é baseado em um transportador secundário, denominado ProP, de especificidade relativamente ampla, que transporta não somente a betaína mas também a prolina. Já o segundo é baseado em um sistema de captação de alta afinidade pela betaína, denominado ProU. A atividade desses dois transportadores é modulada pela pressão osmótica externa, sendo a expressão do transportador ProU ativada somente quando a osmolaridade do meio é muito elevada (NYSSÖLÄ, 2001).

Vários são os exemplos que demonstram a função da betaína como osmólito. Segundo Nyssölä (2001), alguns exemplos reportados de linhagens de bactérias que têm se beneficiado do acúmulo de betaína em ambientes expostos a alta osmolaridade incluem *Agrobacterium tumefaciens*; *Azospirillum brasilense*; *Bacillus subtilis*; *Corynebacterium glutamicum*; *Erwinia chrysanthemi*; *Listeria monocytogenes*; *Rhodobacter sphaeroides*; *Staphylococcus aureus*; *Thiobacillus ferrooxidans*; *Yersinia enterocolitica*; linhagens de *Brevibacterium*, de *Pseudomonas*, de *Rhizobiaceae* e de *Vibrio*; além de muitas bactérias entéricas e muitas bactérias lácticas. Nas bactérias lácticas, todos os sistemas de transporte envolvidos no acúmulo de betaína parecem ser ativados pela exposição à pressão osmótica elevada. Segundo Kets, Teunissen e De Bont (1996) e Kets e De Bont (1994), as espécies do gênero *Lactobacillus* reagem ao estresse osmótico durante o processo de secagem pelo acúmulo de osmólitos como a betaína ou a carnitina. Nestas bactérias, a glicina betaína é relatada como um osmólito eficaz principalmente nas espécies *L. rhamnosus*, *Lactococcus lactis* e *L. plantarum* (ROBERT *et al.*, 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um produto vegetal desidratado a base de raízes tuberosas fermentadas com bactérias probióticas, que atenda a quantidade mínima exigida pela legislação vigente para produtos contendo microrganismos probióticos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar o comportamento da cultura probiótica LPR A, composta por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, após sua adição e fermentação em diferentes misturas compostas por raízes tuberosas de beterraba, batata-doce e mandioquinha-salsa.

Investigar após a secagem, a viabilidade e sobrevivência dos microrganismos presentes nas diferentes misturas fermentadas, selecionando a mistura que permita maior viabilidade celular da cultura probiótica LPR A.

Verificar se a inulina naturalmente encontrada nas raízes estudadas exerce alguma influência sobre crescimento e viabilidade dos microrganismos presentes na cultura LPR A após os processos de fermentação e secagem.

Avaliar o efeito da betaína naturalmente encontrada nas raízes estudadas como protetor celular dos microrganismos presentes na cultura LPR A.

Avaliar o efeito como protetor celular da betaína industrial adicionada à mistura na qual foi encontrada maior sobrevivência dos microrganismos probióticos presentes na cultura LPR A.

Acompanhar a estabilidade da cultura LPR A presente na mistura na qual foi encontrada maior sobrevivência, com e sem adição da betaína industrial, por 60 dias à temperatura de 25°C.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTURA PROBIÓTICA

A cultura probiótica utilizada no presente trabalho foi uma cultura láctica mista termofílica liofilizada composta por *L. rhamnosus* e *L. plantarum* (cultura LPR A) fornecida gentilmente pela SACCO localizada em Campinas, São Paulo, Brasil.

4.2 RAÍZES TUBEROSAS

As raízes tuberosas utilizadas foram beterraba (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*); batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam.), variedade *Brazilândia roxa*; e madioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). Todas foram compradas no Supermercado Super Muffato, localizado em Londrina, Paraná, Brasil.

4.3 DETERMINAÇÃO DA FASE DE CRESCIMENTO

A determinação da fase de crescimento foi realizada através de leituras de absorbância a 660 nm em espectrofotômetro UV-Visível (marca Cintra 20, modelo GBC) (KETS; DE BONT, 1994).

Inicialmente, determinou-se a curva de correlação entre biomassa e absorbância (curva padrão). Para tanto, uma alçada da cultura LPR A liofilizada foi inoculada em 20 ml de Caldo MRS (HIMEDIA), previamente esterilizado, e incubada a 35-37°C por 24 horas. Após esse período, o cultivo com a biomassa foi centrifugado (centrífuga Eppendorf, modelo 5804 R) a 10°C, 10.000 rpm (14.000 g) durante 5

minutos e lavado duas vezes com 5 ml de solução salina 0,85% (p/v) estéril. A fim de correlacionar absorbância e biomassa, a biomassa seca foi determinada pela técnica gravimétrica. Nesta, 1,0 ml da biomassa lavada e ressuspendida em solução salina 0,85% (solução mãe) foi colocado em placas de Petri previamente secas e taradas. Estas foram pesadas e imediatamente levadas para secar em estufa a 105°C até peso constante (aproximadamente 2-3 horas). Após este período, as placas foram novamente pesadas e por diferença de peso (antes e após a secagem) determinou-se a biomassa seca presente (mg de biomassa/ml). Da solução de biomassa que permaneceu no tubo (solução mãe), foram feitas diluições e leituras correspondentes de absorbância a 660 nm em espectrofotômetro, obtendo-se 5 valores de absorbância diferentes. A partir dos dados encontrados, construiu-se e ajustou-se a curva padrão de absorbância (Abs) VS concentração (biomassa/ml).

Para obtenção da cinética de crescimento, uma alçada da cultura LPR A liofilizada foi inoculada em Caldo MRS, previamente esterilizado, e incubada a 35-37°C por 24 horas. Após este período, 1% (v/v) do pré-inoculo foi transferido para 100 ml de Caldo MRS estéril e o crescimento acompanhado por 24 horas. Primeiramente 5 minutos após a inoculação e posteriormente a cada 30 minutos, 5 ml do cultivo foi centrifugado a 10°C, 10.000 rpm (14.000 g) durante 5 minutos e lavado duas vezes com 5 ml de solução salina 0,85% (p/v) estéril. Imediatamente após cada centrifugação e posteriores lavagens, foi realizada a leitura de absorbância a 660 nm em espectrofotômetro (KETS; DE BONT, 1994).

Com os dados de absorbância obtidos, e utilizando a curva padrão determinada inicialmente, calculou-se a biomassa em cada tempo, obtendo-se através destes dados a cinética de crescimento.

4.4 OBTENÇÃO

Para ativação da cultura láctica LPR A, uma alçada da cultura liofilizada foi inoculada em 10 ml de Caldo MRS (previamente esterilizado a 121°C/15 minutos e

resfriado à temperatura de 30°C) e incubada a 35-37°C por 18 horas. Após este período, tubos de ensaio contendo 9,9 ml de Caldo MRS foram inoculados com 1% (v/v) da cultura previamente crescida, e incubados nas mesmas condições. Esta etapa foi repetida por três vezes.

Após a terceira repetição, para obtenção da biomassa, 1% (v/v) do inóculo de 18 horas foi transferido para um Erlenmeyer contendo 100 ml de Caldo MRS fresco e incubado a 35-37°C. Quando o inóculo atingiu 18 horas de crescimento, período correspondente à fase estacionária, a biomassa foi separada utilizando-se uma centrífuga refrigerada a 4°C, 10.000 rpm (14.000 g) por 10 minutos, e lavada duas vezes com solução salina 0,85% (p/v) estéril. Após as duas lavagens, as células foram ressuspensas em 80 ml de água destilada, sendo em seguida, adicionadas aos substratos (raízes tuberosas) previamente preparados (itens 4.5 e 4.6).

4.5 OBTENÇÃO DOS SUBSTRATOS COMPOSTOS PELAS RAÍZES TUBEROSAS

Para a obtenção dos substratos, as raízes tuberosas cruas foram inicialmente pré-lavadas por imersão em água potável, descascadas, novamente lavadas em água potável e cortadas em cubos. Em seguida, foi realizada a desinfecção das mesmas com hipoclorito de sódio (concentração de 100 ppm de cloro) por um período de 10 a 15 minutos (CENCI *et al.*, 2006). Depois de desinfectadas, as raízes foram enxaguadas com água potável, para que o excesso de cloro fosse retirado, e trituradas em multiprocessador.

Para que a microbiota naturalmente presente nas tuberosas fosse eliminada, as raízes sofreram um processo de branqueamento a vapor (100°C) durante 5-10 segundos, por 3 vezes (JÄGERSTAD; JASTREBOVA; SVENSSON, 2004).

4.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

No presente trabalho foi realizado um Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice”. Neste, os componentes do planejamento foram as três raízes utilizadas (beterraba, batata-doce e mandioquinha-salsa) e a resposta a porcentagem de células viáveis recuperadas dos microrganismos probióticos (*L. rhamnosus* e *L. plantarum* - cultura LPR A) após o processo de secagem em estufa de circulação de ar a 43-45°C.

Os pontos do planejamento experimental e os respectivos pesos das raízes utilizadas em cada experimento estão representados na Tabela 5.

Tabela 5 – Pontos do Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice” e os respectivos pesos das raízes utilizadas em cada experimento.

Ensaio	X ₁ * (%)	X ₂ * (%)	X ₃ * (%)	Peso (g) de beterraba	Peso (g) de Batata doce	Peso (g) de Mandioquinha salsa
1	100	0	0	500	0	0
2	0	100	0	0	500	0
3	0	0	100	0	0	500
4	33,333	66,667	0	166,665	333,335	0
5	33,333	0	66,667	166,665	0	333,335
6	0	33,333	66,667	0	166,665	333,335
7	66,667	33,333	0	333,335	166,665	0
8	66,667	0	33,333	333,335	0	166,665
9	0	66,667	33,333	0	333,335	166,665
10	33,333	33,333	33,333	166,665	166,665	166,665

* X₁ = Beterraba; X₂ = Batata doce; X₃ = Mandioquinha-salsa

Os dados obtidos foram processados e analisados no Programa Statistic 6.0.

4.7 FERMENTAÇÃO E SECAGEM DAS MISTURAS

As misturas de raízes tuberosas, elaboradas de acordo com o Planejamento Experimental (item 4.6), foram inoculadas com 10^6 - 10^7 UFC.g⁻¹ da cultura LPR A (células obtidas por centrifugação e lavagem – item 4.4) e incubadas por 48 horas a 30°C em sacos plásticos, hermeticamente fechados, de modo a não permitir a entrada de ar (JÄGERSTAD, JASTREBOVA e SVENSSON, 2004).

Após a fermentação, as misturas foram desidratadas em estufa de circulação forçada a 43-45°C até peso constante (Tecnal, modelo TE 394-3), moídas (Moinho IKA Works A11 Basic) e acondicionadas em sachês de Polipropileno Biorientado (BOPP), metalizados e hermeticamente selados.

4.8 SELEÇÃO DAS MISTURAS

4.8.1 Determinação da Viabilidade Celular

Uma amostra de 1 g de cada mistura contendo a cultura probiótica LPR A foi colocada em 9 ml de água peptonada 0,1% (p/v) estéril e mantida por 15 minutos a 37°C com agitação ocasional. Decorrido este período, foram realizadas diluições decimais sucessivas em água peptonada 0,1% (p/v) e inoculadas em Agar MRS adicionado de cetoconazol (10 mg/ml), para inibição de fungos, seguidas de incubação a 35-37°C por 48 horas (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001; SANTOS, 2009). O

número de células viáveis foi determinado por contagem em placas antes e depois da secagem.

Para verificar a sobrevivência celular após a secagem em cada mistura, calculou-se o percentual de células viáveis recuperadas segundo a equação 1 (CORCORAN *et al.*, 2004):

$$\% \text{ Células viáveis recuperadas} = \frac{\log \text{ UFC/g final}}{\log \text{ UFC/g inicial}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde: Log UFC/g final = contagem do número de células viáveis da cultura LPR A após a secagem;

Log UFC/g inicial = contagem do número de células viáveis da cultura LPR A antes da secagem;

O experimento foi realizado com duas repetições e os resultados submetidos ao Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice” (item 4.6). Os dados obtidos foram processados e analisados no Programa Statistic 6.0.

4.8.2 Análises Físico-Químicas

Análises de pH, Aw e umidade foram realizadas em cada mistura antes e depois dos processos de fermentação e secagem. O pH e a umidade foram determinados de acordo com as normas oficiais do Instituto Adolfo Lutz (2005) e a Aw mensurada em aparelho AQUALAB (modelo CX-2), previamente calibrado com água destilada.

Os experimentos foram conduzidos com duas repetições, sendo submetidos à análise de variância a ANOVA e processados no Programa Statistic 6.0.

4.8.3 Determinação de Betaína

A quantificação dos teores de betaína em cada mistura foi realizada em duplicata, antes e depois dos processos de fermentação e secagem, de acordo com a metodologia de Grieve e Grattan (1983), com algumas modificações.

Para tanto, os produtos oriundos das misturas foram acondicionados em sacos de papel, previamente identificados, e levados para secar em estufa de circulação forçada de ar a 80°C durante quatro dias. Após esse período, quando foi verificada a presença de material em estado sólido, este foi devidamente moído.

Os extratos foram preparados com adição de 20 mL de água deionizada para 0,5 g de material moído. Subseqüentemente, os extratos permaneceram durante 24 horas sob agitação em temperatura de 25°C, sendo em seguida filtrados e armazenados em freezer até a realização das análises.

Após serem descongelados, os extratos foram misturados na proporção de 1:1 com H₂SO₄ 2N, sendo posteriormente mantidos em água gelada durante 1 hora. Decorrido este tempo, 0,5 mL do extrato foi adicionado a 0,2 mL do reagente KI-I₂, previamente preparado pela diluição de 15,7 g de iodo e 20 g de KI em 100 mL de água destilada. Tubos contendo os extratos e o reagente KI-I₂, foram mantidos à temperatura de 4°C durante 16 horas. Transcorrido este período, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos à 0°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado com uma micropipeta, de modo que apenas os cristais de periodato permanecessem no fundo dos tubos. Os cristais de periodato foram, então, dissolvidos em 9,0 mL de 1,2-dicloroetano. Após 2 horas e 30 minutos, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 365 nm. Uma curva padrão de betaína (5-11 mg/mL) foi preparada em H₂SO₄ 1N.

Os gráficos foram plotados pelo Programa Microsoft Excel 2007.

4.8.4 Determinação de Inulina

A quantificação do teor de inulina em cada mistura foi realizada em duplicata, antes e depois dos processos de fermentação e secagem, de acordo com a metodologia proposta pela AOAC (2000), método nº 999.03, utilizando o kit Fructan Assay Procedure, da Megazyme International Ireland Ltd, Irlanda, para a determinação de frutoligosacarídeos (FOS) e polissacarídeos frutanas. Neste método, a sacarose foi hidrolisada a D-frutose e D-glicose por uma enzima sacarase específica, assim como o amido e os maltossacarídeos foram hidrolisados a D-glicose pela ação combinada da β -amilase altamente purificada, da pullulanase e da maltase. Estes açúcares foram, então, reduzidos a açúcares alcoóis pelo tratamento com borohidreto alcalino. Os frutanos remanescentes foram hidrolisados à D-frutose e D-glicose com frutanase purificada (exo-inulinase) e os açúcares redutores produzidos (D-frutose e D-glicose) foram medidos em espectrofotômetro a 410 nm após o tratamento com o método de açúcar-reductor de PAHBAH.

Os gráficos foram plotados pelo Programa Microsoft Excel 2007.

4.9 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA BETAÍNA INDUSTRIAL COMO PROTETOR CELULAR NA VIABILIDADE DOS MICRORGANISMOS ADERIDOS AS MISTURAS

Na mistura onde foi verificado um percentual maior de células viáveis recuperadas da cultura probiótica LPR A (constituída por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*) após a secagem, o efeito da betaína industrial como protetor celular foi avaliado.

Para tanto, a betaína anidra (Marca Fluka Analytical - 14290) foi adicionada à mistura correspondente, antes do processo de fermentação, em dois níveis de concentração diferentes, 0,5 mM e 2 mM, valores encontrados na literatura e considerados suficientes para dar proteção as células probióticas (NYYSSÖLÄ, 2001).

Na Tabela 6 podem ser verificadas as concentrações de betaína industrial utilizada em cada ensaio.

Tabela 6 – Dados referentes à concentração de betaína industrial adicionada nos ensaios 1, 2 e 3.

Ensaio	Concentração de betaína industrial adicionada	g de betaína industrial adicionada em 500 g de beterraba crua	% de betaína industrial adicionada (g/100 g de beterraba crua)
1	-	-	-
2	0,5 mM	4,686 g de betaína	0,94%
3	2 mM	18,744 g de betaína	3,75%

Ambas concentrações de betaína (0,5 mM e 2 mM) foram primeiramente dissolvidas em 80 ml água destilada, a qual foi utilizada para ressuspender a biomassa posteriormente adicionada aos substratos correspondentes (item 4.4). Antes de serem utilizadas para ressuspender a biomassa, as soluções com diferentes concentrações de betaína foram esterilizadas em filtro de porosidade de 0,2 µm e diâmetro de 47 mm (Marca Schleicher & Schuell).

Os processos de fermentação e secagem em cada ensaio foram realizados de acordo com o item 4.7, assim como as análises físico-químicas (pH, umidade e A_w) e as determinações de betaína e inulina foram realizadas conforme os itens 4.8.2, 4.8.3 e 4.8.4, respectivamente. As análises de viabilidade celular foram determinadas de acordo com o item 4.8.1, porém seus resultados não foram submetidos ao Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice”, eles foram feitos com duas repetições, sendo submetidos à análise de variância a ANOVA e processados no Programa Statistic 6.0. Os gráficos foram plotados pelo Programa Microsoft Excel 2007.

4.10 AVALIAÇÃO DURANTE O ARMAZENAMENTO

A estabilidade à temperatura de 25°C foi acompanhada durante 60 dias de armazenamento na mistura onde foi determinada uma maior recuperação celular sem adição de betaína e com adição de betaína nas duas concentrações estudadas (0,5 mM e 2 mM). Porções de 10 g das amostras foram embaladas em saches de BOPP, metalizados e hermeticamente selados. Análises de viabilidade celular, pH, Aw, umidade, betaína e inulina foram realizadas a cada 15 dias em duplicata para cálculo da média de duas repetições dos tratamentos. Os resultados foram submetidos à análise de variância a ANOVA e processados no Programa Statistic 6.0. Os gráficos foram plotados pelo Programa Microsoft Excel 2007.

4.11 CONTAGEM DE BACTÉRIAS LÁCTICAS

As contagens de bactérias lácticas foram realizadas após os processos de fermentação e secagem, e, quando realizado, durante o período de armazenamento em intervalos regulares de 15 dias por dois meses. A semeadura em placas para contagem das unidades formadoras de colônia por g (UFC. g.) foi realizada pela técnica de plaqueamento em profundidade (“*Pour Plate*”), utilizando o meio de cultivo Agar MRS (HIMEDIA) para *Lactobacillus*, adicionado de cetoconazol (SANTOS, 2009). Ensaio preliminares foram realizados a fim de testar a concentração adequada do antifúngico a ser adotada de modo que o crescimento da cultura LPR A (composta por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*) não fosse inibido, encontrando-se como concentração ideal 10 mg.ml⁻¹. As placas foram incubadas a 35-37°C por 48 horas para crescimento e posterior contagem das colônias (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001).

4.12 CONTAGEM DIFERENCIAL DE *Lactobacillus Rhamnosus*

As contagens de *L. rhamnosus* foram realizadas após os processos de fermentação e secagem, e durante o período de armazenamento em intervalos regulares de 15 dias por dois meses. A semeadura em placas para contagem das unidades formadoras de colônia por g (UFC. g.) foi realizada pela técnica de plaqueamento em profundidade (“*Pour Plate*”), utilizando o meio de cultivo Agar MRS para *Lactobacillus*, suplementado com gentamicina (10 µg.ml⁻¹) e cetoconazol (10 mg.ml⁻¹) (COPPOLA *et al.*, 2005; SANTOS, 2009). As placas foram incubadas a 35-37°C por 48-72 horas para crescimento e posterior contagem das colônias (COPPOLA *et al.*, 2005).

4.13 CONTAGEM DIFERENCIAL DE *Lactobacillus Plantarum*

As contagens de *L. plantarum* foram determinadas após os processos de fermentação e secagem, e durante o período de armazenamento em intervalos regulares de 15 dias por dois meses. Para tanto, foi realizada a subtração das contagens de *L. rhamnosus* das contagens totais de bactérias lácticas (KARAGÜL-YÜCEER; WILSON; WHITE, 2001).

4.14 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Para garantir condições microbiológicas adequadas e seguras, foram feitas análises de coliformes totais, coliformes a 45°C, *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, *Bacillus cereus*, bolores e leveduras e *Salmonella* spp, segundo a

resolução – RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001 (ANVISA). As análises foram realizadas segundo Silva, Junqueira e Silveira (2001).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DA FASE DE CRESCIMENTO

A fim de se conhecer o comportamento da cultura probiótica LPR A, constituída por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, quando cultivada em Caldo MRS a 35-37°C, a cinética de crescimento foi determinada através de leituras de absorbância a 660 nm em espectrofotômetro.

Primeiramente, determinou-se a curva padrão, correlacionando a biomassa existente com a absorbância encontrada, e, posteriormente, a cinética de crescimento.

A Figura 3 apresenta os resultados da correlação entre a biomassa da cultura LPR A, composta por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, e a absorbância encontrada em cada diluição (curva padrão).

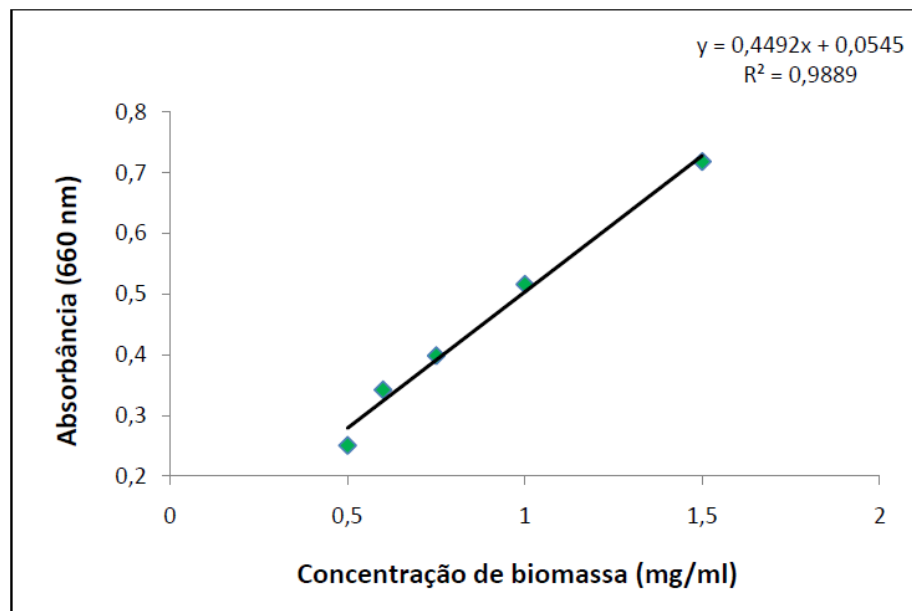


Figura 3 – Curva de correlação entre concentração de biomassa da cultura LPR A (constituída por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*) e absorbância a 660nm.

A partir desses dados, determinou-se a equação da reta, sendo possível converter a absorbância em concentração e, assim, determinar a cinética de crescimento.

Os resultados referentes à curva de crescimento da cultura LPR A (*L. plantarum* e *L. rhamnosus*) em Caldo MRS a 35-37°C durante 24 horas de cultivo encontram-se na Figura 4.

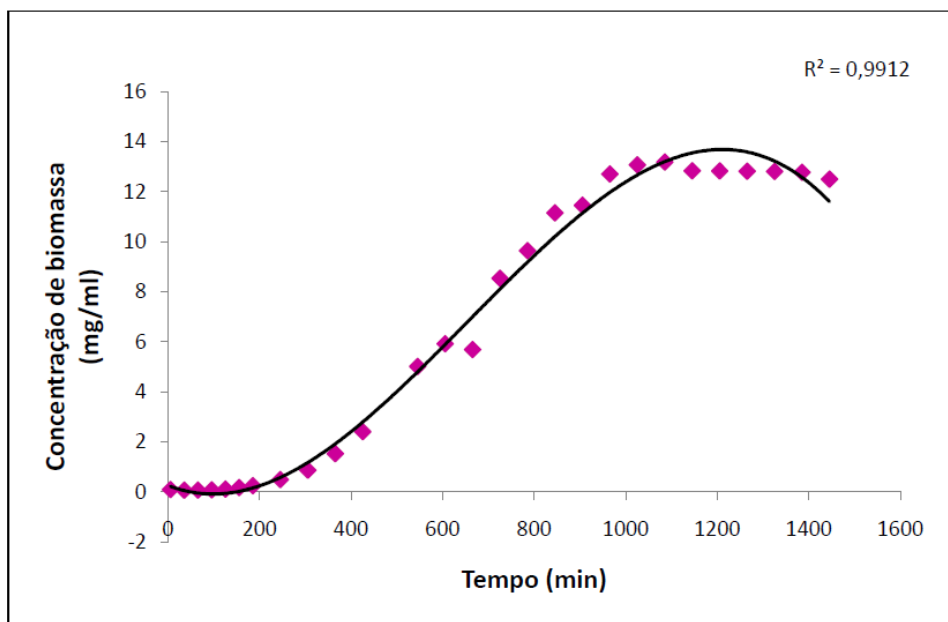


Figura 4 – Curva de crescimento da cultura LPR A, composta por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, cultivada por 24 horas em Caldo MRS a 35-37°C.

No período compreendido entre 0 e 4 horas (245 min), a cultura LPR A encontrava-se na fase *lag*, momento de adaptação às condições a que foi submetida (meio de cultivo, temperatura de incubação, volume de inóculo). Entre 5 e 16 horas (965 min), a cultura encontrava-se em sua fase de crescimento exponencial ou *log*, período onde as células dividem-se ao máximo, nesta ocasião a velocidade específica de crescimento foi constante e máxima no valor de 1,122 g/l*h. Entre 17 e 21 horas (1265 min), a cultura LPR A encontrava-se na fase estacionária, momento onde a velocidade

de crescimento diminui até que a divisão celular se iguale à morte celular. A partir de 22 horas de cultivo (1325 min), pode ser visualizada a morte celular, onde a cultura LPR A encontrava-se em declínio devido à diminuição no número de células viáveis (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997).

Segundo Meng *et al.* (2007), as culturas bacterianas podem responder ao estresse de diferentes maneiras dependendo da fase de crescimento na qual se encontram. Quando as bactérias estão na sua fase estacionária, elas tendem a desenvolver uma resistência geral ao estresse, sendo mais resistentes aos métodos de processamento e armazenamento do que em sua fase exponencial de crescimento ou *log* (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2006). Este fato ocorre, principalmente, devido ao esgotamento das fontes disponíveis de alimento, o que desperta uma resposta ao estresse e permite a sobrevivência da população celular (MENG *et al.*, 2007).

Em um estudo que visava comparar a sobrevivência do *Lactobacillus bulgaricus* durante as secagens por *spray-dryer* e liofilização, correlacionando-a com possíveis danos celulares, fase de crescimento celular, choque térmico e reidratação, Teixeira, Castro e Kirby (1995) verificaram que as células do *Lactobacillus bulgaricus* na fase estacionária eram significativamente mais resistentes à secagem por *spray-dryer* do que na fase exponencial. Resultados semelhantes foram obtidos por Corcoran *et al.* (2004), onde constatou-se que as células de *L. rhamnosus* na fase estacionária eram capazes de obter taxas de recuperação mais elevadas após o processo de secagem por *spray-dryer* (sobrevivência de 31-50%), do que as mesmas nas fases *lag* (2%) e *log* (14%).

Neste contexto, para o desenvolvimento do presente trabalho, com o intuito de utilizar a cultura LPR A em sua forma mais resistente, foi determinado o tempo de 18 horas de cultivo da cultura LPR A, correspondente à fase estacionária, com base nas características de crescimento dos *L. plantarum* e *L. rhamnosus* em Caldo MRS a 35-37°C.

5.2 SELEÇÃO DAS MISTURAS

As misturas utilizadas no presente estudo foram selecionadas com base em seus possíveis efeitos prebióticos, devido à presença de inulina (ROBERFROID, 2005; KOLIDA; GIBSON, 2007), e osmoprotetores, devido à presença de betaína (HUTKINS, ELLEFSON; KASHKET, 1987; ROBERT *et al.*, 2000), que supostamente poderiam auxiliar a sobrevivência dos microrganismos presentes na cultura LPR A durante e após a secagem (CORCORAN *et al.*, 2004; DESMOND, 2002; KAILASAPATHY, 2002; KETS, TEUNISSEN; DE BONT, 1996; KETS, GALINSKI; DE BONT, 1994).

Na Tabela 7 estão representadas as médias percentuais de células viáveis da cultura LPR A recuperadas após a secagem em cada uma das misturas (ensaios) correspondentes ao planejamento experimental utilizado.

Tabela 7 – Médias percentuais de determinações realizadas em duplicata de células viáveis da cultura LPR A, composta por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, recuperadas após a secagem em estufa de circulação de ar a 43-45°C, em cada um dos ensaios referentes ao Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice”.

Ensaio	Composição dos ensaios	% de células recuperadas *
1	100% beterraba	93,02 ; 92,22
2	100% batata-doce	41,62 ; 44,84
3	100 % mandioquinha	70,46 ; 64,67
4	33,3% beterraba; 66,7% batata-doce	38,59 ; 39,03
5	33,3% beterraba; 66,7% mandioquinha	42,17 ; 45,28
6	33,3% batata-doce; 66,7% mandioquinha	62,53 ; 62,23
7	66,7% beterraba; 33,3% batata-doce	56,72 ; 58,58
8	66,7% beterraba; 33,3% mandioquinha	43,75 ; 51,31
9	66,7% batata-doce; 33,3% mandioquinha	55,59 ; 56,78
10	33,3% beterraba; 33,3% batata-doce; 33,3% mandioquinha.	36,32 ; 33,47

$$* \% \text{ Células recuperadas} = \frac{\log \text{ UFC/g final}}{\log \text{ UFC/g inicial}} \times 100$$

Observa-se na Tabela 7 que o componente puro utilizado no ensaio 1 (beterraba) foi o que obteve o maior percentual de células viáveis recuperadas após a secagem. Já a proporção utilizada no ensaio 10 (mistura entre as três raízes) rendeu o menor percentual.

Em um planejamento experimental para misturas, os dados são gerados usando um projeto experimental, onde um modelo polinomial é ajustado aos dados e os contornos das superfícies de resposta são examinados para encontrar a região de interesse. O objetivo do projeto experimental é modelar a superfície de mistura com polinômios denominados formas canônicas de Scheffée para misturas. Por meio destes modelos é possível prever, para qualquer proporção de ingredientes, a resposta de interesse no espaço fator delimitado pelo projeto.

No presente trabalho, foram verificados três modelos numéricos para a determinação das superfícies de resposta, conforme a quantidade de pontos para a geração dos mesmos. Os três modelos numéricos estão representados na Figura 5, sendo estes: o modelo linear (5A), que abrange os 3 pontos correspondentes às variáveis raízes puras; o modelo quadrático (5B), que compreende os 3 pontos correspondentes às raízes puras e as interações binárias entre os mesmos; e modelo especial cúbico (5C), que envolve os 3 pontos correspondentes às variáveis puras, as interações binárias entre os mesmos e a interação ternária entre os 3 componentes .

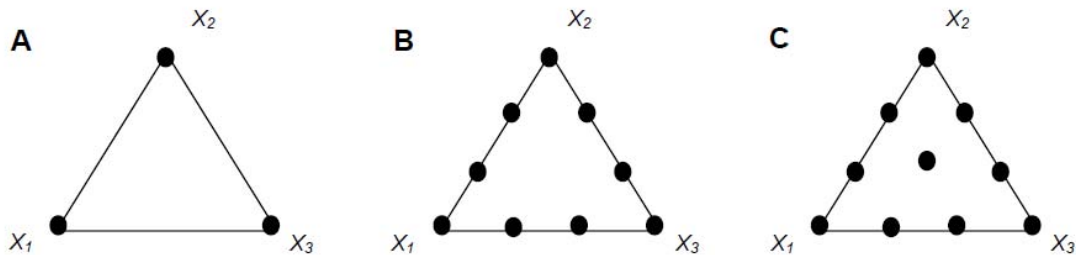


Figura 5 – Representação das superfícies de resposta e dos pontos experimentais para os respectivos modelos matemáticos (linear, quadrático e especial cúbico).

As porcentagens de células viáveis recuperadas após a secagem foram utilizadas para ajustar o melhor modelo referente ao planejamento experimental adotado. Processando-se os dados no Programa Statistic 6.0, observou-se que o modelo especial cúbico foi o que apresentou a menor falta de ajuste aos dados obtidos e o melhor coeficiente de determinação (R_2), no valor de 0,9827. Desta forma, o modelo especial cúbico foi o escolhido para descrever o comportamento do sistema em relação às misturas dos componentes.

A análise de variância para o ajuste do modelo especial cúbico aplicado às respostas do Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice” está representado na Tabela 8.

Tabela 8 – Análise de variância para o ajuste do modelo especial cúbico aplicado às respostas do Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice”.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Soma Quadrática Média	Teste F
Regressão	5212,358	6	868,7264	123,0884*
Resíduo	91,751	13	7,0577	
Falta de Ajuste	29,431	3	9,8102	1,5742
Erro Puro	62,320	10	6,2320	
Total	5304,109	19	279,1636	

* Significativo a um nível de 95% de confiança ($p=0,05$).

Na Tabela 9 podem ser observados os coeficientes do modelo especial cúbico, referentes ao planejamento experimental utilizado.

Tabela 9 – Coeficientes do modelo especial cúbico estimado para o Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice”.

X_1	X_2	X_3	X_{12}	X_{13}	X_{23}	X_{123}
92,31	43,164	67,941	- 87,782	- 155,24	16,785*	- 209,858
($\pm 1,7868$)	($\pm 1,7868$)	($\pm 1,7868$)	($\pm 8,3521$)	($\pm 8,3521$)	($\pm 8,3521$)	($\pm 61,2506$)

* Não significativo a um nível de 95% de confiança ($p=0,05$).

X_1 = beterraba (B)

X_{13} = interação binária entre B e M

X_2 = batata-doce (BD)

X_{23} = interação binária entre BD e M

X_3 = mandioquinha-salsa (M)

X_{123} = interação ternária entre B, BD e M

X_{12} = interação binária entre B e BD

De acordo com a Tabela 9, é possível observar que as interações entre as variáveis X_1 e X_2 (que corresponde à mistura de beterraba e batata-doce) e X_1 e X_3 (que corresponde à mistura de beterraba e mandioquinha-salsa) foram significativas e negativas, promovendo uma diminuição no valor da resposta, ou seja, um efeito antagônico, não favorecendo a recuperação celular. Já a interação entre as variáveis X_2

e X_3 , correspondente à mistura de batata-doce e mandioquinha-salsa, produziu um efeito sinérgico, levando a um aumento no valor da resposta, mas não significativo a um nível de 95% de confiança ($p=0,05$).

As variáveis X_1 , X_2 e X_3 (correspondentes as raízes puras) apresentaram efeitos positivos e significativos, promovendo uma elevação no valor da resposta, beneficiando, desta forma, a sobrevivência da cultura LPR A após a secagem.

A variável X_1 (beterraba pura) apresentou o maior coeficiente, e, portanto, a maior contribuição para com a resposta, levando a uma melhor recuperação celular após a secagem. No entanto, sua interação com as demais variáveis produziu efeitos antagônicos, como mencionado anteriormente.

A mistura ternária, composta pela interação entre as três variáveis, X_1 , X_2 e X_3 , apresentou o menor coeficiente e, conseqüentemente, a menor contribuição para com a resposta, sendo negativa e significativa a um nível de 95% de confiança ($p=0,05$).

A equação 3 expressa o modelo especial cúbico que estima a resposta (% de células viáveis recuperadas após a secagem) em função dos componentes da mistura (beterraba, batata-doce e mandioquinha-salsa).

$$Y = 92,31 X_1 + 43,164 X_2 + 67,941 X_3 - 87,782 X_1X_2 - 155,24 X_1X_3 + 16,785 X_2X_3 - 209,858 X_1X_2 X_3 \quad (\text{Eq. 3})$$

O comportamento do sistema pode ser melhor analisado através da superfície de resposta representada na Figura 6.

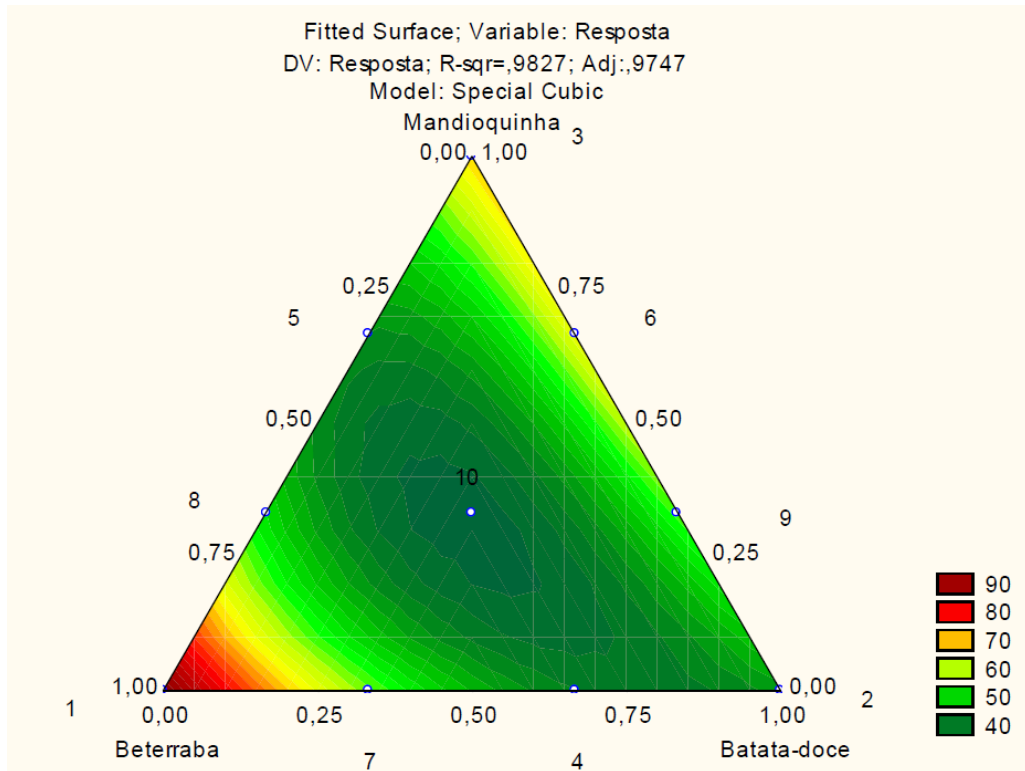


Figura 6 – Projeção da superfície de resposta em 2D destacando-se as estimativas dos valores da resposta (% de células viáveis recuperadas após a secagem) em função dos componentes da mistura (beterraba, batata-doce e mandioquinha-salsa).

De acordo com a Figura 6, observa-se que a região em que ocorre uma influência mais expressiva entre os componentes da mistura (raízes) e o percentual de células viáveis recuperadas após a secagem localiza-se na região da figura correspondente à variável X_1 (beterraba pura). Já as regiões correspondentes às interações X_1 e X_2 (beterraba e batata-doce), X_1 e X_3 (beterraba e mandioquinha-salsa) e X_{123} (mistura ternária) não são favorecidas.

Sendo assim, para se obter um maior número de células viáveis recuperadas após a secagem, deve-se adotar como meio apenas a beterraba, sem haver necessidade de utilizar as demais raízes.

A Figura 7 refere-se ao diagrama de Pareto, gráfico que nos permite verificar a importância dos termos do modelo especial cúbico a um nível de 95% de confiança ($p = 0,05$), evidenciando a maior contribuição da beterraba pura.

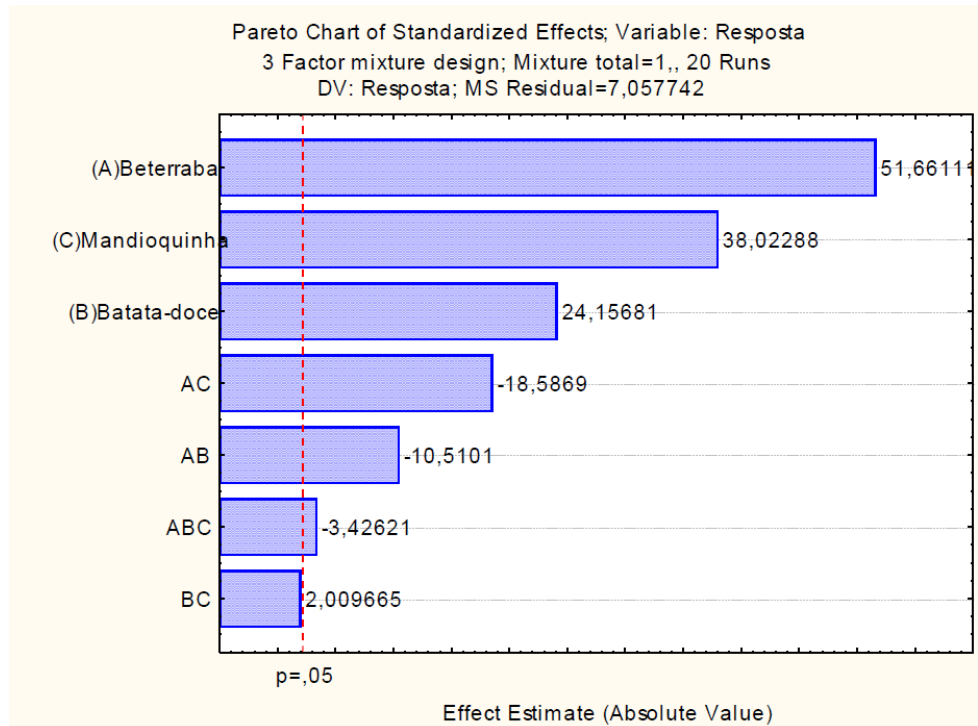


Figura 7 – Diagrama de Pareto para o Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice”.

O pH dos 10 ensaios após a secagem variou de $3,34 \pm 0,02$ a $3,81 \pm 0,01$; a A_w de $0,333 \pm 0,002$ a $0,421 \pm 0,002$ e a umidade de $5,2 \pm 0,1$ a $6,45 \pm 0,35$, conforme propriedades individuais de cada mistura (dados não mostrados).

As Tabelas 10 e 11 representam as médias de análises realizadas em duplicata dos resultados obtidos para as porcentagens de betaína (Tabela 10) e inulina (Tabela 11) nas misturas antes e depois dos processos de fermentação e secagem.

Tabela 10 – Média de determinações realizadas em duplicata dos resultados obtidos para porcentagens de betaína (g de betaína/100 g de amostra seca) em cada um dos ensaios referentes ao Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice”, antes e depois dos processos de fermentação e secagem.

Ensaio **	Antes da fermentação % de betaína *	Após a fermentação % de betaína *	Após a secagem % de betaína *
1	1,78 ± 0,01 ^f	0,77 ± 0,01 ^{tgijk}	0,52 ± 0,01 ^{abcdeh}
2	0,78 ± 0,01 ^{gijkl}	0,52 ± 0,01 ^{bcdef}	0,44 ± 0,01 ^{abcd}
3	0,92 ± 0,03 ^{ijkl}	0,55 ± 0,01 ^{cdefg}	0,27 ± 0,01 ^a
4	0,99 ± 0,01 ^{klmo}	0,72 ± 0,01 ^{efghij}	0,69 ± 0,01 ^{dfghi}
5	1,27 ± 0,21 ^{op}	0,98 ± 0,01 ^{ijklmn}	0,87 ± 0,01 ^{ijkl}
6	0,87 ± 0,02 ^{ijkl}	0,39 ± 0,01 ^{abc}	0,29 ± 0,01 ^{ab}
7	1,58 ± 0,01 ^{qr}	1,26 ± 0,01 ^{np}	1,01 ± 0,01 ^{lm}
8	1,63 ± 0,01 ^f	1,37 ± 0,01 ^{pq}	1,19 ± 0,01 ^{mno}
9	0,82 ± 0,01 ^{ijkl}	0,46 ± 0,01 ^{abce}	0,33 ± 0,01 ^{abc}
10	1,03 ± 0,01 ^{lmo}	0,86 ± 0,01 ^{ijkl}	0,79 ± 0,01 ^{hijkl}

* Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si a $p \geq 0,05$.

**1 = 100 % beterraba (B)

2 = 100 % batata-doce (BD)

3 = 100 % mandioquinha (M)

4 = 33,3 % B; 66,7 % BD

5 = 33,3 % B; 66,7 % M

6 = 33,3 % BD; 66,7 % M

7 = 66,7 % B; 33,3 % BD

8 = 66,7 % B; 33,3 % M

9 = 66,7 % BD; 33,3 % M;

10 = 33,3 % B; 33,3 % BD; 33,3 % M

Tabela 11 – Média de determinações realizadas em duplicata dos resultados obtidos para porcentagens de inulina (g de inulina/100 g de amostra seca) em cada um dos ensaios referentes ao Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice”, antes e depois dos processos de fermentação e secagem.

Ensaio **	Antes da fermentação % de Inulina *	Após a fermentação % de Inulina *	Após a secagem % de Inulina *
1	23,33 ± 0,01 ^p	15,62 ± 0,01 ⁿ	10,16 ± 0,14 ^l
2	2,2 ± 0,03 ^{de}	0,95 ± 0,01 ^b	0,19 ± 0,01 ^a
3	2,35 ± 0,15 ^e	1,78 ± 0,02 ^c	0,27 ± 0,02 ^a
4	8,57 ± 0,01 ^k	6,41 ± 0,01 ^g	4,80 ± 0,01 ^f
5	7,95 ± 0,01 ^j	6,69 ± 0,02 ^g	4,52 ± 0,01 ^f
6	2,10 ± 0,03 ^{de}	0,75 ± 0,01 ^b	0,28 ± 0,01 ^a
7	15,93 ± 0,01 ^o	11,01 ± 0,01 ^m	7,50 ± 0,1 ^{hi}
8	15,64 ± 0,01 ^{no}	11,15 ± 0,01 ^m	7,28 ± 0,01 ^h
9	2,04 ± 0,01 ^{de}	1,96 ± 0,03 ^{cd}	0,28 ± 0,01 ^a
10	8,26 ± 0,01 ^{jk}	7,56 ± 0,02 ^l	6,56 ± 0,01 ^g

* Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si a $p \geq 0,05$.

**1 = 100 % beterraba (B)

2 = 100 % batata-doce (BD)

3 = 100 % mandioquinha (M)

4 = 33,3 % B; 66,7 % BD

5 = 33,3 % B; 66,7 % M

6 = 33,3 % BD; 66,7 % M

7 = 66,7 % B; 33,3 % BD

8 = 66,7 % B; 33,3 % M

9 = 66,7 % BD; 33,3 % M;

10 = 33,3 % B; 33,3 % BD; 33,3 % M

Nas Tabelas 10 e 11, verifica-se que o componente puro utilizado no ensaio 1 (beterraba) é o que apresenta as maiores porcentagens de betaína e inulina encontradas nas misturas antes dos processos de fermentação e secagem. Estes resultados são semelhantes aos citados por Nyssölä (2001), onde é mencionado que, dependendo da fase de crescimento e linhagem, a beterraba pode conter de 1 a 1,5 % de betaína por peso seco.

A Figura 8 expressa a redução dos percentuais de betaína durante os processos de fermentação e secagem em cada um dos ensaios referentes ao Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice”. De acordo com a

Figura 8, é possível verificar que no ensaio 1 é observada a maior redução dos percentuais de betaína, sendo o contrário observado no ensaio 10.

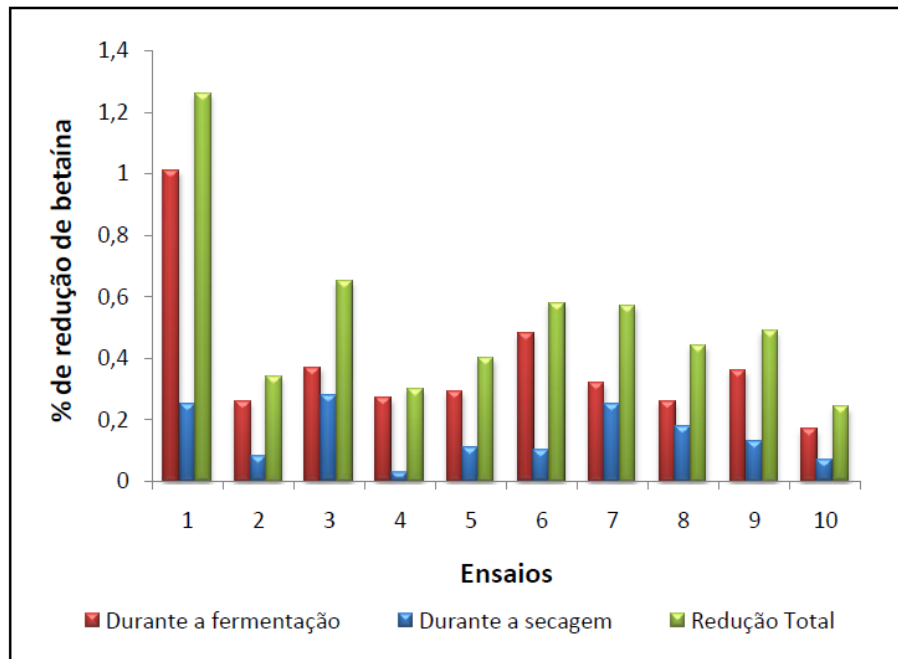


Figura 8 – Redução dos percentuais de betaína durante os processos de fermentação e secagem em cada um dos ensaios* referentes ao Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice”.

* 1 = 100 % beterraba (B)

2 = 100 % batata-doce (BD)

3 = 100 % mandioca (M)

4 = 33,3 % B; 66,7 % BD

5 = 33,3 % B; 66,7 % M

6 = 33,3 % BD; 66,7 % M

7 = 66,7 % B; 33,3 % BD

8 = 66,7 % B; 33,3 % M

9 = 66,7 % BD; 33,3 % M

10 = 33,3 % B; 33,3 % BD; 33,3 % M

Durante a secagem, a pressão osmótica externa aumenta substancialmente, o que faz com que os microrganismos sejam sujeitos ao estresse osmótico causado pela diminuição na A_w ocasionada pela secagem. Isto ocorre porque a redução da A_w gera uma condição hiperosmótica, que provoca um efluxo rápido de água do interior da célula para o exterior. A célula, anteriormente túrgida, começa a se retrair até que a membrana citoplasmática se desprenda da parede celular, processo

denominado plasmólise. Para sobreviver, as células precisam se adaptar, acumulando solutos específicos que regulem o seu equilíbrio osmótico, os chamados osmólitos (POOLMAN; GLAASKER, 1998). Sendo assim, a solução encontrada pelos organismos confrontados com uma baixa A_w , é acumular osmólitos como a betaína. O acúmulo destes osmólitos mantém o balanço entre os ambientes intra e extracelular, de modo que suas células permaneçam estáveis (KETS; DE BONT, 1994).

A Figura 9 expressa a redução dos percentuais de inulina durante os processos de fermentação e secagem em cada um dos ensaios referentes ao Planejamento Experimental para misturas do tipo "Simplex Lattice". Assim como foi verificado para a betaína, a maior redução dos percentuais de inulina também foi observada no ensaio 1, sendo o contrário observado no ensaio 10.

A maior viabilidade das células probióticas após a secagem encontrada no componente puro utilizado no ensaio 1 (beterraba) pode estar relacionada à maior redução dos percentuais de betaína e inulina, quando comparada as demais misturas, embora não se possa afirmar com exatidão que todos os percentuais de betaína e a inulina reduzidos tenham sido totalmente metabolizados ou utilizados pela cultura LPR A. Segundo Molenaar *et al.* (1993), uma fonte natural de betaína para microrganismos submetidos ao estresse pode ser encontrada na utilização de materiais de origem vegetal, como, por exemplo, a beterraba.

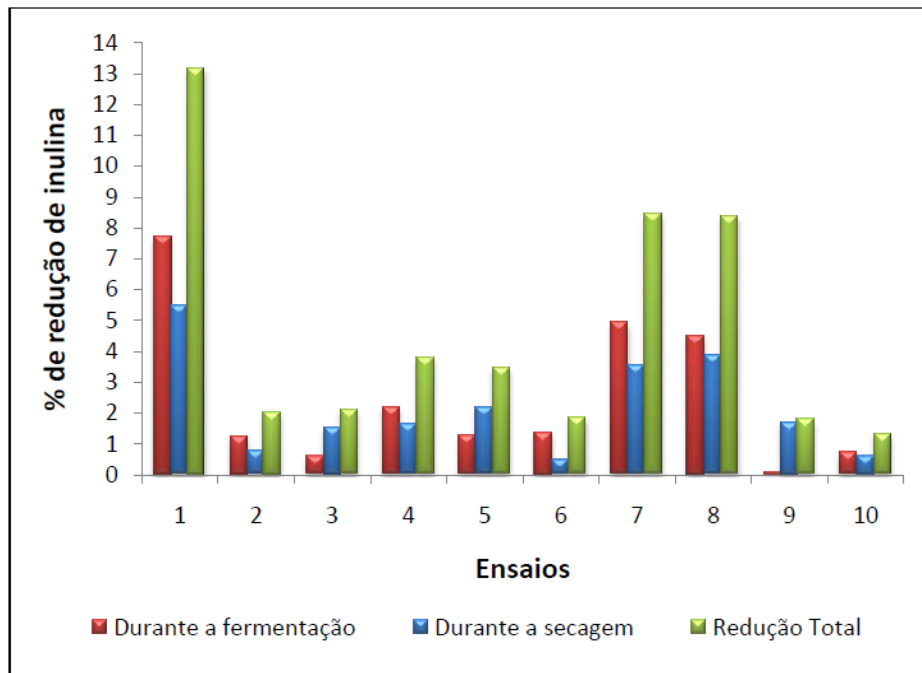


Figura 9 – Redução dos percentuais de inulina durante os processos de fermentação e secagem em cada um dos ensaios* referentes ao Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice”.

*1 = 100 % beterraba (B)

2 = 100 % batata-doce (BD)

3 = 100 % mandiocinha (M)

4 = 33,3 % B; 66,7 % BD

5 = 33,3 % B; 66,7 % M

6 = 33,3 % BD; 66,7 % M

7 = 66,7 % B; 33,3 % BD

8 = 66,7 % B; 33,3 % M

9 = 66,7 % BD; 33,3 % M

10 = 33,3 % B; 33,3 % BD; 33,3 % M

De modo semelhante, a menor redução dos percentuais de betaína e inulina observada no ensaio 10 pode ajudar a explicar a menor recuperação celular encontrada no mesmo. Kets, Teunissen e De Bont (1996), ao estudar a relação existente entre o acúmulo de betaína por bactérias lácticas e a sua possível sobrevivência após a secagem, observaram que uma das linhagens estudadas, correspondente ao *Lactobacillus bulgaricus*, não foi capaz de acumular a betaína adicionada ao meio, apresentando uma sobrevivência após a secagem muito reduzida. A reidratação é também um ponto crítico para a recuperação de microrganismos desidratados, porque as células sujeitas à injúria podem não ser capazes de reparar seu dano caso sejam reidratadas sob circunstâncias inadequadas (COSTA *et al.*, 2000;

CARVALHO *et al.*, 2004). Abadias *et al.* (2001) demonstraram um significativo aumento na viabilidade da *Candida sake* quando a mesma solução testada com o protetor no meio de secagem foi usada para reidratar as amostras desidratadas posteriormente. Como nenhum método especial foi adotado durante a reidratação das células após a secagem, é provável que a combinação dos fatores, pequena redução dos percentuais de betaína e inulina e injúria ocasionada pela secagem, possam ter contribuído para a menor recuperação celular encontrada neste ensaio. Segundo Carvalho *et al.* (2004), o uso do mesmo composto no meio de crescimento, na secagem e no meio do reidratação deve ser investigado.

A associação entre a redução total dos percentuais de betaína durante os processos de fermentação e secagem e a recuperação celular encontrada após o processo de secagem em cada um dos ensaios referentes ao Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice” pode ser melhor observada da Figura 10.

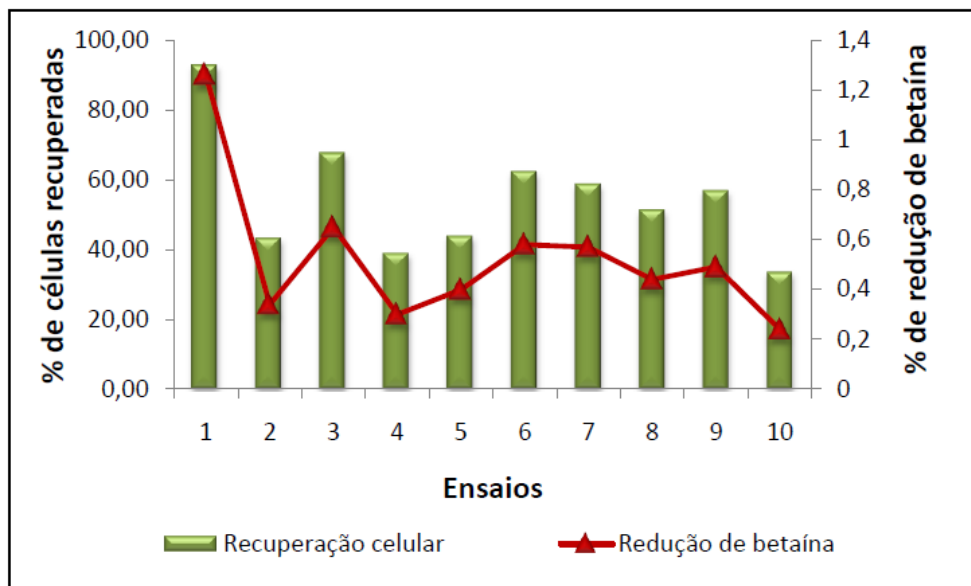


Figura 10 – Redução total dos percentuais de betaína durante os processos de fermentação e secagem e porcentagem de células recuperadas após o processo de secagem em cada um dos ensaios* referentes ao Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice”.

*1 = 100 % beterraba (B)	6 = 33,3 % BD; 66,7 % M
2 = 100 % batata-doce (BD)	7 = 66,7 % B; 33,3 % BD
3 = 100 % mandioquinha (M)	8 = 66,7 % B; 33,3 % M
4 = 33,3 % B; 66,7 % BD	9 = 66,7 % BD; 33,3 % M
5 = 33,3 % B; 66,7 % M	10 = 33,3 % B; 33,3 % BD; 33,3 % M

Observando a Figura 10, é possível verificar que a redução dos percentuais de betaína está diretamente relacionada à recuperação celular, uma vez que nos ensaios onde foram encontradas maiores recuperações celulares, também foram verificadas maiores reduções dos percentuais de betaína. Por outro lado, nos ensaios onde foram encontradas menores recuperações celulares, também foram verificadas menores reduções dos percentuais de betaína. Estes resultados ressaltam a importância da betaína naturalmente encontrada na beterraba pura como protetora das células bacterianas quando submetidas a situações de estresse, como por exemplo, o processo de desidratação, e sua possível utilização em trabalhos futuros.

5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA BETAÍNA INDUSTRIAL COMO PROTETOR CELULAR NA VIABILIDADE DOS MICRORGANISMOS ADERIDOS AS MISTURAS

De acordo com o Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice” realizado, foi constatado que o ensaio correspondente a beterraba pura (ensaio 1) foi o que apresentou a maior recuperação celular após a secagem em estufa de circulação de ar a 43-45°C. Dessa forma, a beterraba foi escolhida como o melhor meio para analisar o efeito da betaína industrial como protetor celular.

A Tabela 12 apresenta as concentrações de betaína industrial utilizada em cada ensaio.

Tabela 12 – Dados referentes à concentração de betaína industrial adicionada à solução de suspensão da biomassa (80 ml).

Ensaio	Concentração de betaína industrial
1	-
2	0,5 mM*
3	2 mM*

* Valores retirados de acordo com a literatura.

A Figura 11 apresenta as médias percentuais de células viáveis da cultura LPR A recuperadas após a secagem em cada um dos ensaios.

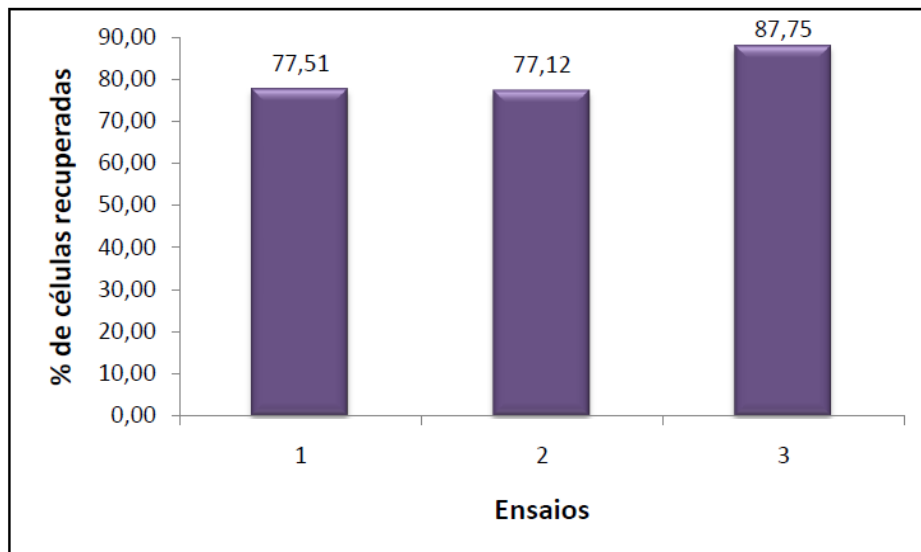


Figura 11 – Médias percentuais de determinações realizadas em duplicata de células da cultura LPR A (composta por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*) recuperadas em Agar MRS adicionado de cetoconazol (10 mg/ml) sob incubação de 35-37°C por 48 horas, após a secagem em estufa de circulação de ar a 43-45°C nos ensaios 1, 2 e 3. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.

De acordo com a Figura 11, é possível averiguar que os ensaios 1 e 2 apresentaram resultados semelhantes, onde não foi possível verificar diferença significativa a um nível de 95% de confiança ($p=0,05$). Em ambos ensaios foi observado que aproximadamente 77-78% das células bacterianas foram recuperadas. Já o ensaio 3, composto pela beterraba pura adicionada de 2 mM de betaína industrial, foi o que permitiu a maior recuperação celular após a secagem (quase 88%), apresentando diferença significativa a um nível de 95% ($p=0,05$) dos demais ensaios.

Kets, Teunissen, e De Bont (1996) estudaram a relação existente entre a acumulação de osmólitos e a habilidade de quatro linhagens de bactérias lácticas (*Enterococcus faecium*, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus bulgaricus* e *L. plantarum*) sobreviverem à secagem. Eles encontraram não somente que a betaína, adicionada ao meio na concentração de 2 mM, foi o principal soluto encontrado no *L. plantarum*, no *L. halotolerans* e no *E. faecium* quando estas bactérias foram sujeitas ao estresse osmótico, como também observaram que a sobrevivência das células sujeitadas à secagem foi muito maior quando a betaína foi acumulada. Por outro lado, como o *L. bulgaricus* não foi capaz de acumular este soluto, sua sobrevivência após a secagem foi consideravelmente menor.

Na Figura 12 estão representadas as médias percentuais de células viáveis de *L. rhamnosus* após a secagem em cada um dos ensaios.

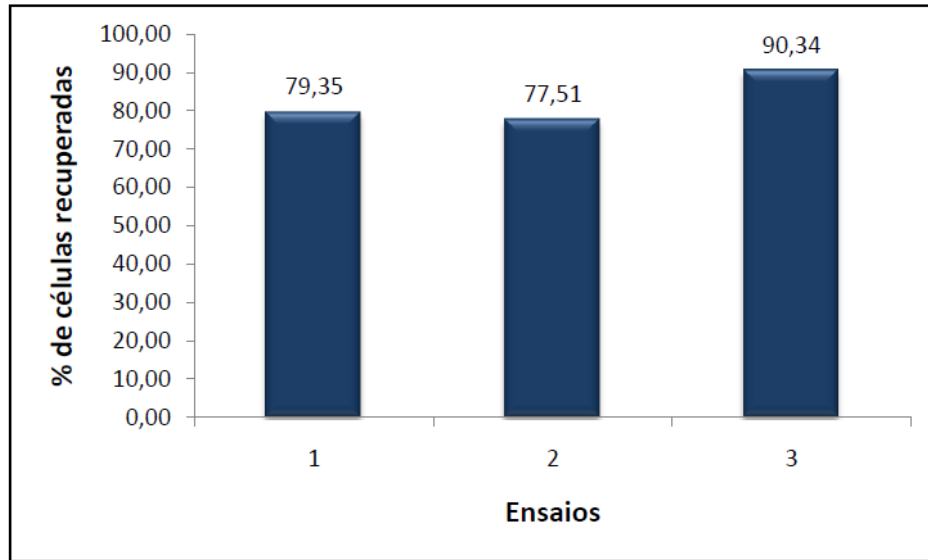


Figura 12 – Médias percentuais de determinações realizadas em duplicata de células de *L. rhamnosus* recuperadas em Agar MRS adicionado de gentamicina (10 µg/ml) e de cetoconazol (10 mg/ml) sob incubação de 35-37°C por 48-72 horas, após a secagem em estufa de circulação de ar a 43-45°C nos ensaios 1, 2 e 3. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.

Segundo a Figura 12, observa-se que no ensaio 1 cerca de 79% das células bacterianas foram recuperadas, enquanto que no ensaio 2 quase 78% das células de *L. rhamnosus* foram recuperadas, não sendo possível verificar diferença significativa a um nível de 95% de confiança ($p=0,05$) entre estes dois ensaios. No entanto, no ensaio 3 foi verificada uma maior recuperação celular, de aproximadamente 90%, sendo encontrada diferença significativa a um nível de 95% ($p=0,05$) entre este ensaio e os demais.

A Figura 13 mostra as médias percentuais de células viáveis de *L. plantarum* após a secagem em cada um dos ensaios.

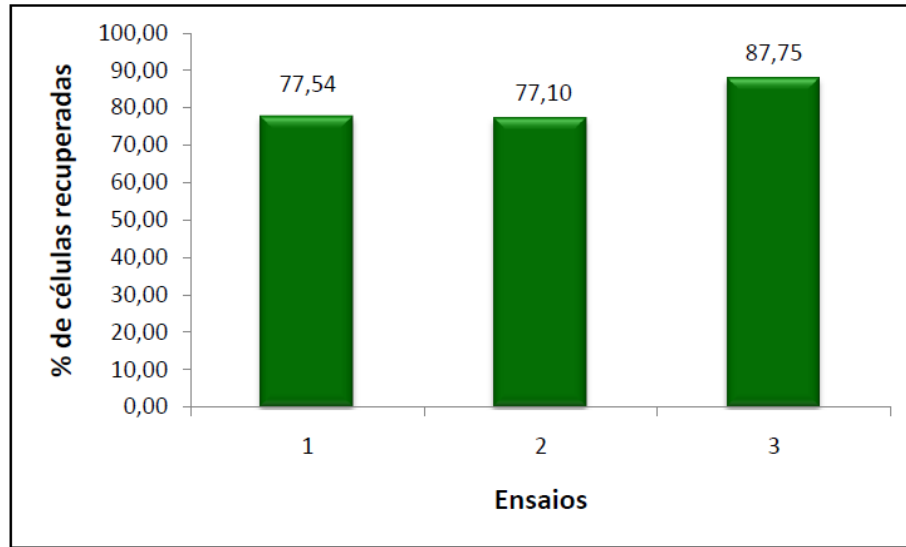


Figura 13 – Médias percentuais de determinações realizadas em duplicata de células de *L. plantarum* recuperadas após a secagem em estufa de circulação de ar a 43-45°C, por subtração das contagens de *L. rhamnosus* das contagens totais de bactérias lácticas, nos ensaios 1, 2 e 3. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.

De acordo com a Figura 13, verifica-se que os ensaios 1 e 2 apresentaram resultados muito próximos, não sendo possível verificar diferença significativa a um nível de 95% confiança ($p=0,05$) entre eles. Sendo assim, observa-se que aproximadamente 78% das células bacterianas foram recuperadas no ensaio 1 e 77% no ensaio 2. A sobrevivência do *L. plantarum* foi maior no ensaio 3, onde foi constatada uma recuperação celular de aproximadamente 88%. Este ensaio apresentou diferença significativa a um nível de 95% de confiança ($p=0,05$) dos demais.

Neste contexto, Kets e De Bont (1994), ao investigar o efeito da betaína na sobrevivência do *L. plantarum* sujeito à secagem a 30°C por 2,5 horas, verificaram que a adição de 2 mM de betaína ao meio aumentou não somente a taxa de crescimento das células sob estresse osmótico, mas também a taxa de sobrevivência após a secagem.

A umidade dos ensaios após a secagem variou de $6,1 \pm 0,1$ a $6,6 \pm 0,1$; a A_w de $0,354 \pm 0,002$ a $0,474 \pm 0,001$ e o pH de $3,53 \pm 0,02$ a $3,84 \pm 0,01$ (dados não mostrados).

A Tabela 13 representa a média de análises realizadas em duplicata dos resultados obtidos para porcentagens de betaína nos ensaios antes e depois dos processos de fermentação e secagem.

Tabela 13 – Média de análises realizadas em duplicata dos resultados obtidos para porcentagens de betaína (g de betaína/100 g de beterraba seca) em cada ensaio antes e depois dos processos de fermentação e secagem. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.

Ensaio	Antes da fermentação % de betaína *	Após a fermentação % de betaína *	Após a secagem % de betaína *
1	$1,7 \pm 0,01^b$	$1,25 \pm 0,19^a$	$1,05 \pm 0,04^a$
2	nd**	$5,49 \pm 0,01^d$	$4,41 \pm 0,01^c$
3	nd	$16,88 \pm 0,04^f$	$15,25 \pm 0,01^e$

* Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si a $p > 0,05$.

** nd: não determinado

Admitindo-se que a beterraba apresenta 1,7% de betaína natural por peso seco e considerando-se que foram adicionadas 4,686 g de betaína no ensaio 2 e 18,744 g de betaína no ensaio 3, através de cálculos baseados no peso seco da beterraba, encontrou-se que o total de betaína presente antes do processo de fermentação nos ensaios 2 e 3 foi de aproximadamente $6,24 \pm 0,06$ % e $17,74 \pm 0,05$ %, respectivamente.

A Tabela 14 apresenta a média de análises realizadas em duplicata dos resultados obtidos para porcentagens de inulina nos ensaios antes e depois dos processos de fermentação e secagem. 63

Tabela 14 – Média de análises realizadas em duplicata dos resultados obtidos para porcentagens de inulina (g de inulina/100 g de beterraba seca) em cada ensaio antes e depois dos processos de fermentação e secagem. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.

Ensaio	Antes da fermentação	Após a fermentação	Após a secagem
	% de inulina *	% de inulina *	% de inulina *
1	23,52 ± 0,03 ^d	19,16 ± 0,03 ^c	17,81 ± 0,04 ^b
2	nd	19 ± 0,01 ^c	17,9 ± 0,01 ^b
3	nd	18,89 ± 0,01 ^c	16,91 ± 0,01 ^a

* Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si a $p > 0,05$.

** nd: não determinado

Admitindo-se que a beterraba apresenta 23,52% de inulina por peso seco e considerando-se que foram adicionadas 4,686 g de betaína no ensaio 2 e 18,744 g de betaína no ensaio 3, através de cálculos baseados no peso seco da beterraba, encontrou-se que o total de inulina presente antes do processo de fermentação no ensaio 2 e 3 foi de aproximadamente $22,42 \pm 0,03 \%$ e $19,67 \pm 0,02 \%$, respectivamente.

A Figura 14 expressa a redução dos percentuais de betaína e inulina durante os processos de fermentação e secagem.

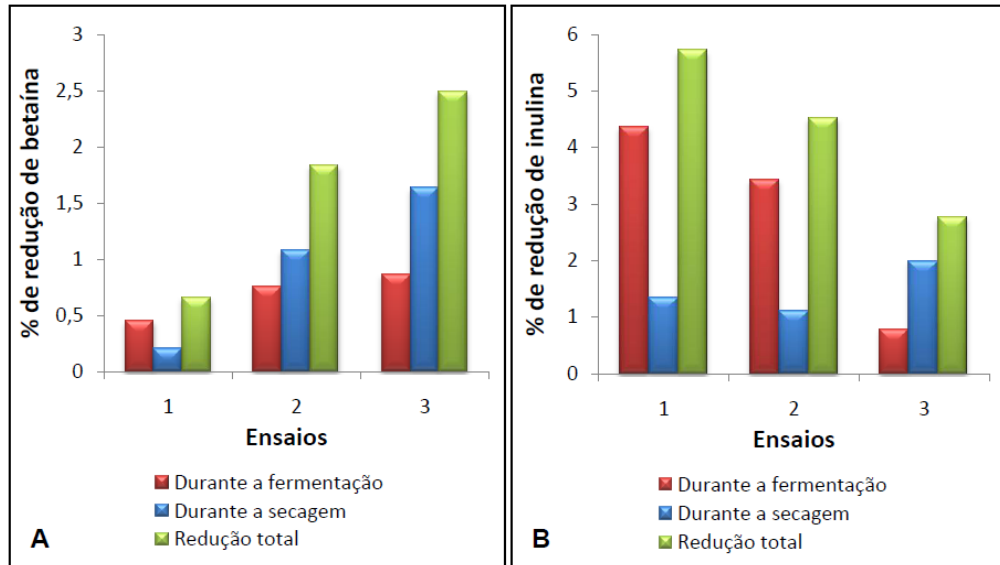


Figura 14 – Redução dos percentuais de betaína e inulina durante os processos de fermentação e secagem da beterraba contendo a cultura LPR A, constituída por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, nos ensaios 1, 2 e 3. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.

De acordo com a Figura 14A, observa-se que a redução dos percentuais de betaína foi maior no ensaio 3, sendo seguida pelos ensaios 2 e 1. Por outro lado, a redução dos percentuais de inulina (Figura 14B) foi maior no ensaio 1, sendo seguido pelos ensaios 2 e 3.

A associação entre a redução total dos percentuais de betaína durante os processos de fermentação e secagem e a recuperação celular encontrada após a secagem nos ensaios 1, 2 e 3 pode ser melhor observada da Figura 15.

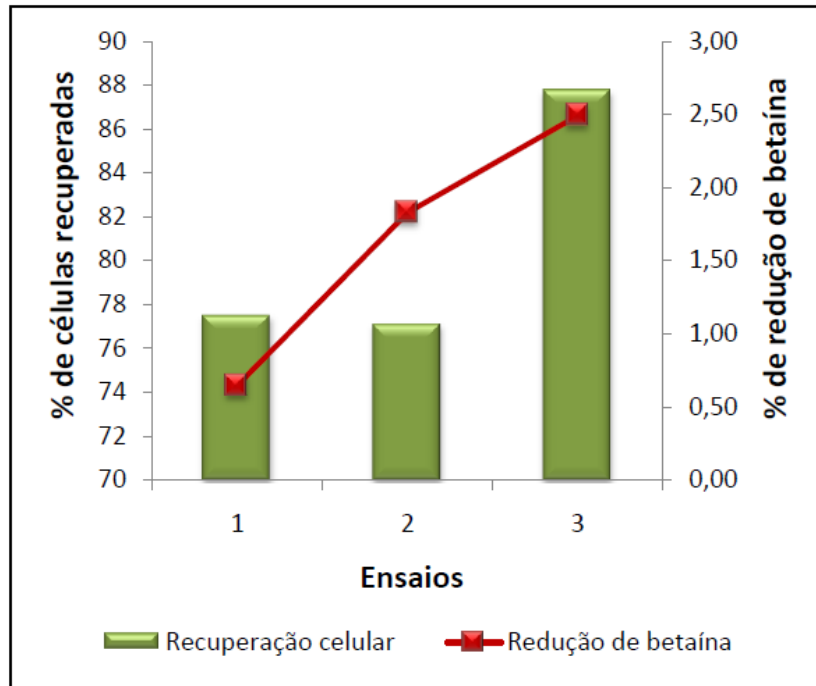


Figura 15 – Redução total dos percentuais de betaína durante os processos de fermentação e secagem e porcentagem de células recuperadas da cultura LPR A, constituída por *L. plantarum* e *L. rhamnosus* após a secagem, nos ensaios 1, 2 e 3. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.

Observando a Figura 15, é possível verificar a importância da redução dos percentuais de betaína para a manutenção da viabilidade celular no ensaio 3, uma vez que neste ensaio foi verificada a maior redução dos percentuais de betaína e a maior recuperação celular. Por outro lado, nos ensaios 1 e 2, onde foram encontradas recuperações celulares muito similares, a redução dos percentuais de betaína não foi semelhante, sendo maior no ensaio 2 do que no ensaio 1.

Segundo estudo realizado por Kets, Teunissen, e De Bont (1996), a concentração de betaína equivalente a 0,5 mM no meio foi suficiente para a proteção do *L. plantarum* contra o estresse salino. No entanto, para o estresse causado pela secagem, a betaína na concentração de 0,5 mM, utilizada no ensaio 2, não se mostrou efetiva para a maior viabilidade celular da cultura LPR A, do *L. plantarum* e do *L.*

rhamnosus, quando comparada a betaína naturalmente encontrada na beterraba pura, correspondente ao ensaio 1. Por outro lado, a betaína na concentração de 2 mM, utilizada no ensaio 3, favoreceu significativamente a melhor recuperação celular.

Ao contrário do que foi observado para a betaína, a menor redução dos percentuais de inulina foi encontrada no ensaio 3. Dessa forma, é provável que a inulina não tenha sido determinante para a sobrevivência celular. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Corcoran *et al.* (2004), onde constatou-se que a incorporação do prebiótico inulina não foi capaz de aumentar a viabilidade dos *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* E 800 e *L. salivarius* UCC durante e após a secagem estudada.

A partir dos resultados encontrados, foi verificado que a cultura LPR A, composta por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, apresentou maior sobrevivência ao processo de secagem quando a betaína industrial foi adicionada à beterraba pura na concentração de 2 mM.

As Figuras 16, 17 e 18 mostram o aspecto dos produtos nos ensaios 1, 2 e 3, respectivamente, após os processos de fermentação, secagem em estufa de circulação de ar a 43-45°C e moagem.

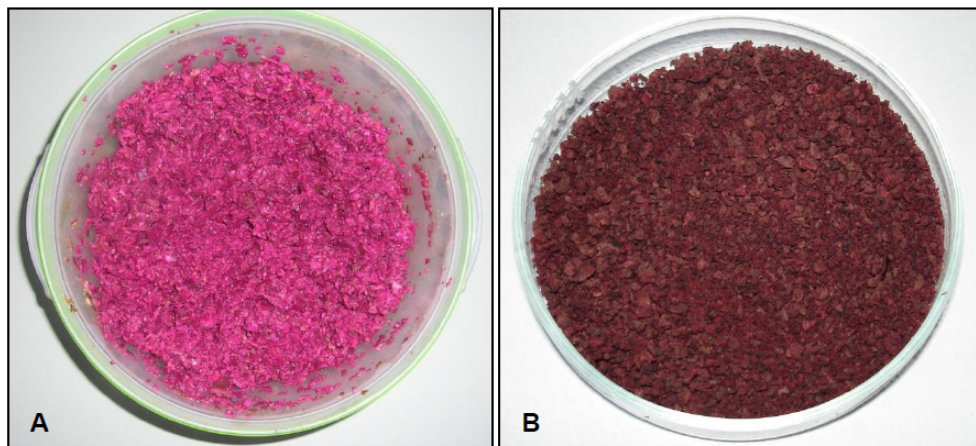


Figura 16 – Ensaio 1, composto pela beterraba pura, após a fermentação com a cultura LPR A (constituída por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*) (A) e após a secagem em estufa de circulação de ar a 43-45°C e moagem (B).

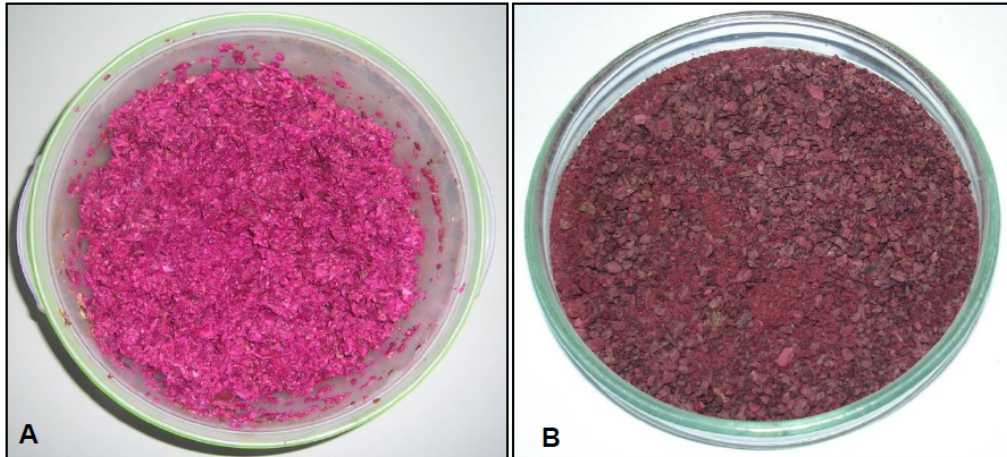


Figura 17 – Ensaio 2, composto pela beterraba pura e 0,5 mM de betaina industrial, após a fermentação com a cultura LPR A (constituída por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*) (A) e após a secagem em estufa de circulação de ar a 43-45°C e moagem (B).

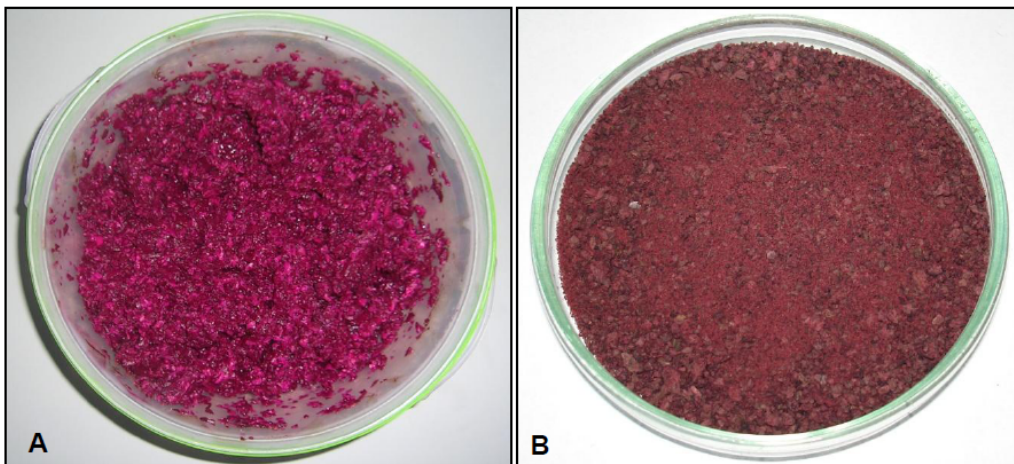


Figura 18 – Ensaio 3, composto pela beterraba pura e 2 mM de betaina industrial, após a fermentação com a cultura LPR A (constituída por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*) (A) e após a secagem em estufa de circulação de ar a 43-45°C e moagem (B).

Observando as Figuras 16, 17 e 18, é possível verificar que, após a fermentação, secagem em estufa de circulação de ar a 43-45°C e moagem, os ensaios mantiveram sua coloração inicial. As amostras em pó, além de manterem a coloração inicial, também apresentaram um aroma suavemente adocicado e um sabor insípido.

5.4 AVALIAÇÃO DURANTE O ARMAZENAMENTO

A estabilidade da cultura LPR A, constituída por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, após a fermentação e secagem nos ensaios 1, 2 e 3 durante 60 dias de armazenamento à temperatura de 25°C está apresentada na Figura 19.

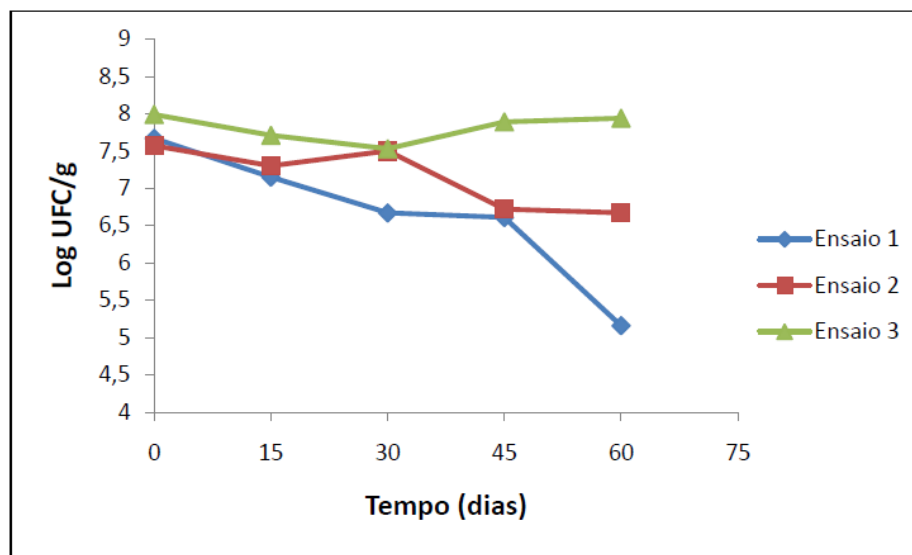


Figura 19 – Comportamento da cultura LPR A (composta por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*) nos ensaios 1, 2 e 3 durante o armazenamento por 60 dias, sob temperatura de 25°C. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.

No ensaio 1, onde somente a beterraba estava presente, a viabilidade da cultura LPR A durante a estocagem diminuiu 2,51 ciclos log, alcançando ao final dos 60 dias $5,16 \pm 0,01$ ciclos log. No ensaio 2, no qual foi adicionada 0,5 mM de betaína, a viabilidade da cultura diminuiu 0,9 ciclos log, atingindo ao final do período $6,67 \pm 0,01$ ciclos log. A maior estabilidade foi observada no ensaio 3, onde a maior concentração de betaína industrial foi adicionada (2 mM). Neste ensaio, a viabilidade da cultura LPR A diminuiu 0,05 ciclos log, alcançando ao fim do armazenamento $7,94 \pm 0,01$ ciclos log.

Carvalho *et al.* (2003) sugeriram que a presença de osmólitos no meio de cultivo pode promover a sobrevivência das bactérias lácticas no estado desidratado durante longos períodos de armazenamento. Segundo Kets e De Bont (1994), a betaína tem a capacidade de preservar a viabilidade das células durante a secagem e subseqüentes períodos de dessecação. Contudo, poucos são os relatos que associam a presença de betaína e a sobrevivência de bactérias lácticas desidratadas durante o armazenamento.

A estabilidade do *L. rhamnosus* e do *L. plantarum* nos ensaios 1, 2 e 3 durante 60 dias de armazenamento à temperatura de 25°C está apresentada na Figura 20.

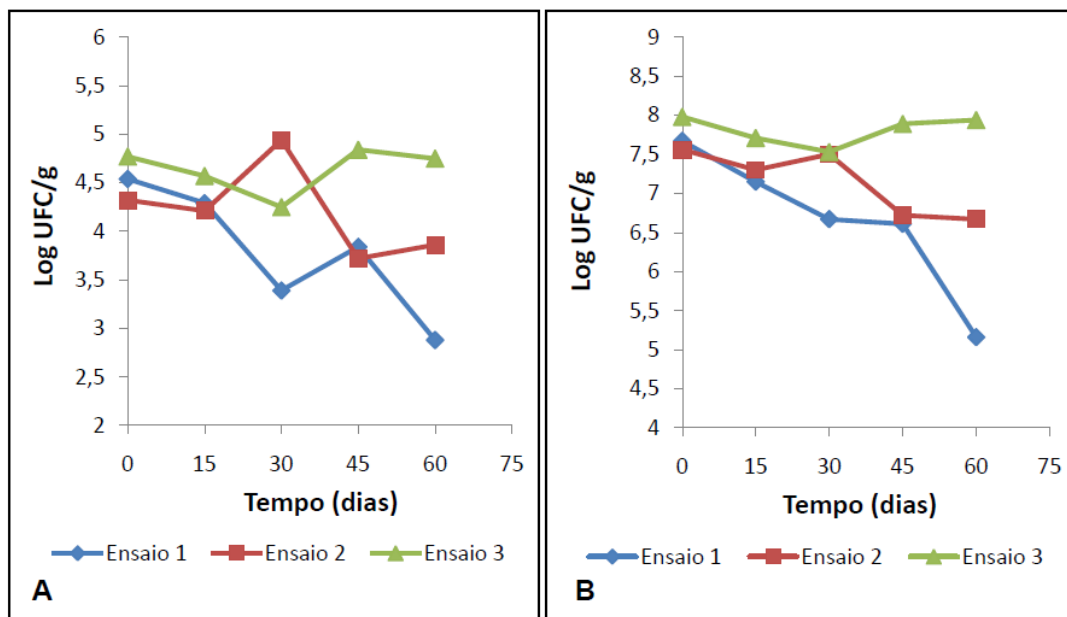


Figura 20 – Comportamento do *L. rhamnosus* (A) e *L. plantarum* (B) nos ensaios 1, 2 e 3 durante o armazenamento por 60 dias, sob temperatura de 25°C. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.

De acordo com a Figura 20A, é possível observar que no ensaio 1, a viabilidade do *L. rhamnosus* durante a estocagem diminuiu 1,66 ciclos log, atingindo ao final dos 60 dias $2,88 \pm 0,02$ ciclos log. No ensaio 2, a viabilidade do *L. rhamnosus* caiu

0,46 ciclos log, alcançando ao final do período $3,86 \pm 0,01$ ciclos log. A maior estabilidade foi observada no ensaio 3, onde a viabilidade do *L. rhamnosus* diminuiu apenas 0,02 ciclos log, alcançando ao fim do armazenamento $4,75 \pm 0,01$ ciclos log.

Segundo a Figura 20B, a maior estabilidade para o *L. plantarum* foi verificada no ensaio 3, onde a viabilidade do *L. plantarum* diminuiu somente 0,04 ciclos log, alcançando ao fim do armazenamento $7,94 \pm 0,01$ ciclos log. No ensaio 1, a viabilidade do *L. plantarum* durante a estocagem diminuiu 2,51 ciclos log, atingindo ao final dos 60 dias $5,16 \pm 0,01$ ciclos log. Já no ensaio 2, a viabilidade do *L. plantarum* regrediu 0,89 ciclos log, alcançando ao final do período $6,67 \pm 0,01$ ciclos log.

Tanto o *L. plantarum* quanto o *L. rhamnosus* apresentaram melhor viabilidade durante o período de armazenamento quando a betaína industrial foi adicionada na concentração de 2 mM, correspondente ao ensaio 3. Em pesquisas semelhantes, Carvalho *et al.* (2002) encontraram que a sobrevivência do *L. plantarum* e *L. rhamnosus* foi maior durante o armazenamento quando a desidratação foi realizada na presença de osmólitos como inositol, sorbitol, frutose, trealose, glutamato monossódico e propil galato.

Durante os 60 dias de armazenamento, a variação nos valores de pH, Aw e umidade foi pequena, não sendo observadas diferenças entre os ensaios, como pode ser verificado nas Tabelas 15, 16 e 17, respectivamente. Este acontecimento pode ser devido ao fato de que o substrato utilizado foi o mesmo (beterraba) nos três ensaios, com diferença apenas na adição de betaína.

Tabela 15 – Média de análises realizadas em duplicata dos resultados obtidos para o pH nos ensaios 1, 2 e 3, durante o armazenamento por 60 dias na temperatura de 25°C. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.

Ensaio	15 dias de armazenamento*	30 dias de armazenamento*	45 dias de armazenamento*	60 dias de armazenamento*
1	$3,92 \pm 0,02^{abc}$	$4,05 \pm 0,01^{bcd}$	$4,25 \pm 0,02^{cde}$	$4,15 \pm 0,15^{bcde}$
2	$3,86 \pm 0,02^{ab}$	$4,02 \pm 0,01^{abcd}$	$4,26 \pm 0,01^{cde}$	$4,2 \pm 0,1^{bcde}$
3	$3,7 \pm 0,01^a$	$4,14 \pm 0,01^{bcde}$	$4,42 \pm 0,01^e$	$4,3 \pm 0,1^{de}$

* Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si a $p > 0,05$.

Tabela 16 – Média de análises realizadas em duplicata dos resultados obtidos para a A_w nos ensaios 1, 2 e 3, durante o armazenamento por 60 dias na temperatura de 25°C. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.

Ensaio	15 dias de armazenamento*	30 dias de armazenamento*	45 dias de armazenamento*	60 dias de armazenamento*
1	0,433 ± 0,002 ^e	0,434 ± 0,002 ^e	0,433 ± 0,001 ^e	0,461 ± 0,002 ^f
2	0,365 ± 0,004 ^{ab}	0,377 ± 0,001 ^{bc}	0,391 ± 0,003 ^d	0,395 ± 0,003 ^d
3	0,358 ± 0,001 ^a	0,388 ± 0,002 ^d	0,384 ± 0,001 ^{cd}	0,386 ± 0,001 ^{cd}

* Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si a $p > 0,05$.

Tabela 17 – Média de análises realizadas em duplicata dos resultados obtidos para a umidade nos ensaios 1, 2 e 3, durante o armazenamento por 60 dias na temperatura de 25°C. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.

Ensaio	15 dias de armazenamento*	30 dias de armazenamento*	45 dias de armazenamento*	60 dias de armazenamento*
1	6,7 ± 0,1 ^d	6,75 ± 0,05 ^e	6,5 ± 0,1 ^{bcd}	6,6 ± 0,1 ^{cde}
2	6,25 ± 0,05 ^{abcd}	6,4 ± 0,1 ^{abcde}	6,45 ± 0,05 ^{abcde}	6,45 ± 0,05 ^{abcde}
3	6,05 ± 0,05 ^a	6,25 ± 0,05 ^{abce}	6,15 ± 0,05 ^{ab}	6,2 ± 0,1 ^{abc}

* Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si a $p > 0,05$.

Os percentuais de betaína e inulina em cada ensaio durante os 60 dias de armazenamento estão representados nas Tabelas 18 e 19.

Tabela 18 – Média de análises realizadas em duplicata dos resultados obtidos para os percentuais de betaína (g de betaína/100 g de beterraba seca) nos ensaios 1, 2 e 3, durante o armazenamento por 60 dias na temperatura de 25°C. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.

Ensaio	15 dias de armazenamento % de betaína *	30 dias de armazenamento % de betaína *	45 dias de armazenamento % de betaína *	60 dias de armazenamento % de betaína *
1	1,07 ± 0,01 ^a	1,05 ± 0,01 ^a	1,02 ± 0,01 ^a	1,02 ± 0,01 ^a
2	4,42 ± 0,01 ^b	4,41 ± 0,01 ^b	4,39 ± 0,01 ^b	4,37 ± 0,01 ^b
3	14,86 ± 0,04 ^d	14,61 ± 0,01 ^c	14,59 ± 0,04 ^c	14,58 ± 0,04 ^c

* Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si a $p > 0,05$.

Tabela 19 – Média de análises realizadas em duplicata dos resultados obtidos para os percentuais de inulina (g de inulina/100 g de beterraba seca) nos ensaios 1, 2 e 3, durante o armazenamento por 60 dias na temperatura de 25°C. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.

Ensaio	15 dias de armazenamento % de inulina *	30 dias de armazenamento % de inulina *	45 dias de armazenamento % de inulina *	60 dias de armazenamento % de inulina *
1	17,31 ± 0,09 ^f	16,88 ± 0,07 ^{de}	16,9 ± 0,07 ^e	16,4 ± 0,1 ^c
2	17,43 ± 0,03 ^f	16,8 ± 0,13 ^{cde}	16,72 ± 0,11 ^{cde}	16,46 ± 0,11 ^{cd}
3	16,72 ± 0,01 ^{cdef}	15,52 ± 0,01 ^b	15,36 ± 0,01 ^{ab}	15,08 ± 0,01 ^a

* Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si a $p > 0,05$.

De acordo com as Tabelas 18 e 19, é possível observar os percentuais de betaína e inulina mantiveram-se praticamente constantes, havendo apenas uma pequena redução em ambos os casos.

Os percentuais de betaína e inulina em cada ensaio durante os 60 dias de armazenamento podem ser melhor visualizados na Figura 21.

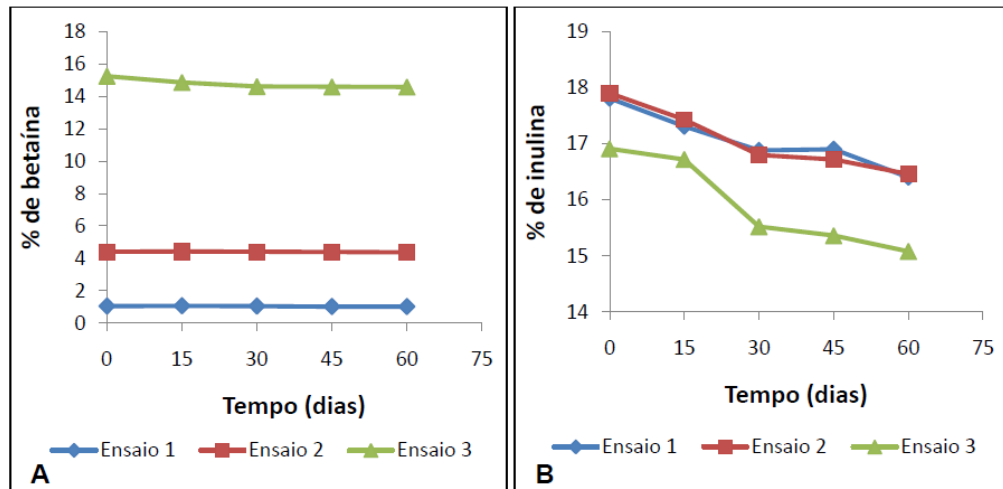


Figura 21 – Média de análises realizadas em duplicata dos resultados obtidos para os percentuais de betaína (g de betaína/100 g de beterraba seca) (A) e inulina (g de inulina/100 g de beterraba seca) (B) nos ensaios 1, 2 e 3, durante o armazenamento por 60 dias na temperatura de 25°C. Ensaio 1: beterraba; ensaio 2: beterraba + 0,5 mM de betaína; ensaio 3: beterraba + 2 mM de betaína.

Como nas bactérias lácticas todos os sistemas de transporte envolvidos no acúmulo de betaína parecem ser ativados pela exposição à pressão osmótica elevada (HUTKINS; ELLEFSON; KASHKET, 1987), é razoável encontrar que a maior redução dos percentuais de betaína tenha sido verificada durante os processos de fermentação e secagem do que durante o armazenamento.

A escolha do meio apropriado para ser utilizado durante o crescimento e posterior secagem é muito importante para que as bactérias lácticas apresentem um aumento nas suas taxas de sobrevivência durante a desidratação e subsequente armazenamento (CARVALHO *et al.*, 2004). A suplementação do meio de crescimento e secagem com osmólitos pode aumentar seu efeito protetor durante o armazenamento de diferentes maneiras dependendo de qual osmólito esta sendo adicionado. O exato mecanismo pelo qual os osmólitos protegem as células durante o armazenamento é ainda desconhecido (CARVALHO *et al.*, 2004). Entretanto, segundo Ko, Smith e Smith (1994) é razoável sugerir que o mecanismo de proteção seja similar ao da crioproteção, ou seja, impede a agregação, mantendo a solubilidade das proteínas celulares, e altera as propriedades físicas da membrana celular.

A partir dos resultados encontrados, foi constatado que a cultura LPR A, composta por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, apresentou maior sobrevivência ao armazenamento quando a betaína industrial foi adicionada à beterraba pura na concentração de 2 mM.

5.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Análises microbiológicas foram realizadas para garantir que os ensaios apresentassem condições adequadas e seguras, quanto à presença de microrganismos patogênicos e indicadores de qualidade higiênico-sanitária.

A Tabela 20 mostra os resultados obtidos para os microrganismos analisados e o limite máximo estabelecido pela resolução – RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001 da ANVISA.

Tabela 20 – Resultado obtido na análise de microrganismos patogênicos e indicadores e respectivos padrões microbiológicos exigidos pela legislação vigente para “raízes, tubérculos e similares, secas, desidratadas ou liofilizadas” encontrada na Resolução – RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001 da ANVISA.

Microrganismo	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Padrão segundo a RDC nº 12
Coliformes totais	< 1,0 x 10	< 1,0 x 10	< 1,0 x 10	-
Coliformes a 45°C*	< 1,0 x 10	< 1,0 x 10	< 1,0 x 10	10 ³
<i>Bacillus cereus</i> *	< 1,0 x 10	< 1,0 x 10	< 1,0 x 10	10 ³
<i>Salmonella spp</i> *	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i> coagulase positiva	< 1,0 x 10	< 1,0 x 10	< 1,0 x 10	-
Bolores e leveduras	< 1,0 x 10	< 1,0 x 10	2,4 x 10 ²	-

* Microrganismos exigidos pela Resolução – RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001 da ANVISA.

De acordo com a Tabela 20, verifica-se que os 3 ensaios apresentaram condições higiênico-sanitárias satisfatórias de acordo com os padrões legais vigentes.

6 CONCLUSÕES

De acordo com o Planejamento Experimental para misturas do tipo “Simplex Lattice”, foi verificado que o ensaio 1, correspondente à beterraba pura, permitiu maior viabilidade da cultura LPR A (92,62%) após a secagem em estufa de circulação forçada à 43-45°C; já o ensaio 10, correspondente à mistura ternária, apresentou a menor recuperação celular (34,9%).

A maior e menor viabilidade verificada nos ensaios 1 e 10, respectivamente, pode estar diretamente relacionada à betaína e inulina naturalmente presentes nas raízes utilizadas, visto que a maior redução dos percentuais betaína (1,26%) e inulina (13,17%) durante os processos de fermentação e secagem foi observada justamente no ensaio 1, enquanto que a menor redução dos percentuais de betaína (0,24%) e inulina (1,3%) foi observada no ensaio 10.

A adição de betaína industrial na concentração de 2 mM (solução de suspensão da biomassa) promoveu maior sobrevivência da cultura LPR A (87,75%), *L. plantarum* (87,75%) e *L. rhamnosus* (90,34%) após o processo de secagem em estufa de circulação forçada à 43-45°C. Nesta etapa do trabalho, a maior redução dos percentuais de betaína (2,49%) durante os processos de fermentação e secagem foi observada quando a betaína industrial foi adicionada à beterraba pura na concentração de 2 mM. Por outro lado, a maior redução dos percentuais de inulina (5,71%) foi observada na amostra de beterraba pura sem a adição de betaína industrial.

A maior sobrevivência durante os 60 dias de armazenamento da cultura LPR A, composta por *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, foi encontrada no ensaio correspondente à beterraba pura com adição de 2 mM de betaína industrial. No entanto, a sobrevivência da cultura LPR A durante o armazenamento também foi elevada quando a betaína industrial foi adicionada à beterraba pura na concentração de 0,5 mM. Ambos ensaios apresentaram a quantidade mínima de microrganismos probióticos exigida pela legislação vigente.

Conclui-se, portanto que betaína naturalmente presente na beterraba ou a adicionada protegeu as células de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* nas condições estudadas, sendo sua utilização uma alternativa para manutenção da viabilidade destes microrganismos probióticos a longo prazo.

REFERÊNCIAS

ABADIAS, M. et al. Viability, efficacy, and storage of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media. *Journal of Food Protection*, v.64, p.856-861, 2001.

ALMEIDA, F. A. G. et al. Estudo preliminar da fermentação alcoólica da alcachofra de jerusalém (*Helianthus tuberosus* L.) pelo *Kluyveromyces marxianus* Lg. no Ceará. *Ciência Agrônômica*, v.19, p.79-86, 1988.

ANDERSSON, R. E.; DAESCHEL, M. A.; ERIKSSON, C. E. Controlled lactic acid fermentation of vegetables. 1988. Disponível em: <<http://fsweb2.schaub.ncsu.edu/usdaars/ Acrobatpubs/P190-220/p210.pdf>>. Acesso em: 07 abr. 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA . Resolução RDC n°. 12, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação Funcional e ou de Saúde. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02_02rdc.htm>. Acesso em: 16 de abril de 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA . Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos – IX Lista de alegações de propriedade funcional aprovados. Agosto, 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 16 de abril de 2009.

AUKRUST, T. W. et al. Interactions between starter culture and raw material in lactic acid fermentation of sliced carrot. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, v. 27, p. 337-341, 1994.

BARBOSA, A. H. D. *Rendimento de batata-doce com adubação orgânica*. 2005. 79f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal da Paraíba - Areia, PB.

BASKAKOV, I.; WANG, A.; BOLEN, D. W. Trimethylamine N-oxide counteracts urea effects on rabbit muscle lactate dehydrogenase function: a test of the counteraction hypothesis. *Biophysical Journal*, v.74, p.2666-2673, 1998.

BETORET, N. et al. Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal of Food Engineering*, v.56, p.273-277, 2003.

BOTTAZZI, V. An introduction to rod-shaped lactic bacteria. *Biochimie*, v.70, p.303-315, 1988.

BURGOS, H. et al. Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). Gerencia Regional de Recursos Naturales y Gestión del Medio Ambiente. Trujillo (Perú). 2006. Disponível em: <<http://www.regionlalibertad.gob.pe/rrnn/admin/docs/Manual%20de%20Arracacha.pdf>>. Acesso em: 01 set. 2009.

BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. *Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, v.57, p.373-380, 2007.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. *Planejamento de experimentos usando o Statística*. Rio de Janeiro: Editora e-papers, 2003. 260 p.

CARABIN, I. G.; FLAMM, W. G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.30, p.268-282, 1999.

CARDOSO, A. D. et al. Características físicas e sensoriais de clones de batata-doce. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 31, p.1760-1765, 2007.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, v.28, p.281-370, 2002.

CARVALHO, A. S. et al. Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. *Biotechnology Letters*, v.24, p.1587-1591, 2002.

CARVALHO, A. S. et al. Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. *Journal of Applied Microbiology*, v.94, p.947-952, 2003.

CARVALHO, A. S. et al. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, v.14, p.835-847, 2004.

CEBECI, A.; GÜRAKAN, C. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiology*, v.20, p.511-518, 2003.

CENCI, S. A. et al. Boas Práticas de Processamento Mínimo de Vegetais. In: FENELON DO NASCIMENTO NETO. (org.). *Recomendações Básicas para a Aplicação das Boas Práticas Agropecuárias e de Fabricação na Agricultura Familiar*. 1a Edição, Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, p. 59-63, 2006. Disponível em: <<http://www.ctaa.embrapa.br/projetos/fhmp/arquivos/BOAS%20PRATICAS%20DE%20PROCESSAMENTO%20MINIMO%20%20DE%20VEGETAIS.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2009.

CEREDA, M. P. Importância das tuberosas tropicais. In: CEREDA, M. P. (org.). *Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas*. São Paulo, Fundação Cargill, v. 2, p.13-25, 2002.

CHIQUIERI, J. *Probiótico e prebiótico na alimentação de suínos em crescimento e terminação*. 2003. 59f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - Campos dos Goytacazes, RJ.

CICHOSKI, A. J.; CUNICO, C.; DI LUCCIO, M.; ZITKOSKI, J. L.; CARVALHO, R. T. Efeito da adição de probióticos sobre as características de queijo prato com reduzido teor de gordura fabricado com fibras e lactato de potássio. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.28, p.214-219, 2008.

COLLINS, M. D.; PHILLIPS, B. A.; ZANONI, P. Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.39, p.105-108, 1989.

CONRAD, P. B.; MILLER, D. P.; CIELENSKI, P. R.; DE PABLO, J. J. Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology*, v.41, p.17-24, 2000.

CONWAY, P. Prebiotics and human health: the state of the art and future perspectives. *Scandinavian Journal of Clinical Nutrition*, v. 45, p. 13-21, 2001.

COPPOLA, R. et al. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Dairy Science and Technology*, v.85, p.193-204, 2005.

CORCORAN, B. M. et al. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*, v.96, p.1024-1039, 2004.

COSTA, E. et al. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, v.89, p.793-800, 2000.

CRAIG, S. A. S. Betain in human nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 80, p.539-549, 2004.

CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. Gastrointestinal effects of prebiotics. *British Journal of Nutrition*, v. 87, p.145-151, 2002.

DESMOND, C. et al. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *Journal of Applied Microbiology*, v.93, p.1003-1011, 2002.

DESTRO, M. V. P. *Interação estresse salino e aplicação exógena de espermidina nos teores de glicina betaína de guandu*. 2006. 80f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista - UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal - Jaboticabal, SP.

DE VRIES, M. C. et al. *Lactobacillus plantarum* - Survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, v.16, p.1018-1028, 2005.

EKLUND, M. et al. Potential nutritional and physiological functions of betaine in livestock. *Nutrition Research Reviews*, v.18, p.31-48, 2005.

FERREIRA, N. R.; VISSOCI, G.; PENHA-SILVA, N. Efeito da concentração de glicerol, sacarose, sarcosina e sorbitol sobre a extinção molar em 281,5 nm de N-Acetil-D,L-Triptofano Etil Éster e N-Acetil-D,L-Tirosina Etil Éster. *Bioscience Journal*, v. 20, p.83-91, 2004.

FIGUEIRA, G. M. et al. Evaluation of desorption isotherms, drying rates and inulin concentration of chicory roots (*Cichorium intybus* L.) with and without enzymatic inactivation. *Journal of Food Engineering*, v.63, p.273-280, 2004.

FLEMING, H. P. Fermented vegetables. *Economic Microbiology Fermented foods*, v.7, p.227-258, 1982.

FONT DE VALDEZ, G. et al. Protective effect of adonitol on lactic acid bacteria subjected to freeze-drying. *Applied and Environmental Microbiology*, v.45, p.302-304, 1983.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Roots, tubers, plantains and bananas in human nutrition. *FAO Food and Nutrition Papers*. 1990. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/t0207e/t0207e00.HTM>>. Acesso em: 21 de março de 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, 30 abril e 01 maio, 2002.

FOOKS, L. J.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal*, v.9, p.53-61, 1999.

GARDNER, N. J. et al. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *International Journal of Food Microbiology*, v.64, p. 261-275, 2001.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, v.125, p.1401-1412, 1995.

GLAASKER, E.; KONINGS, W. N.; POOLMAN, B. Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology*, v.178, p.575-582, 1996.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotic. *Trend in Food Science and Technology*, v.10, p.139-157, 1999.

GRIEVE, C. M.; GRATTAN, S. R. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant and Soil*, v.70, p.303-307, 1983.

HAULY, M. C. O.; MOSCATTO J. A. Inulina e Oligofrutoses: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeito prebiótico e importância na indústria de alimentos. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológica*, v. 23, p. 105-118, 2002.

HELLER, K. J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.73, p.374-379, 2001.

HERMANN, M. Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). 1997. Disponível em: <http://www.cipotato.org/artc/artc_hermann/Arracacha.pdf>. Acesso em: 01 de setembro de 2009.

HERNANDES, N. H. *Aplicação de baixas doses de radiação gama para extensão da vida útil de beterraba vermelha (Beta vulgaris ssp. vulgaris L.), cv. Early Wonder, minimamente processada*. 2006. 107f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ - Rio de Janeiro, RJ.

HOLMSTRÖM, K. et al. Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *Journal of Experimental Botany*, v.51, p.177-185, 2000.

HUTKINS, R. W.; ELLEFSON, W. L.; KASHKET, E. R. Betaine transport imparts osmotolerance on a strain of *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.53, p.2275-2281, 1987.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. *Métodos físico-químicos para a análise de alimentos*. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

JÄGERSTAD, M.; JASTREBOVA, J.; SVENSSON, U. Foliates in fermented vegetables-a pilot study. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, v.37, p. 603-611, 2004.

KAILA KAILASAPATHY. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, v.3, p.39-48, 2002.

KARAGÜL-YÜCEER, Y.; WILSON, J. C.; WHITE, C. H. Formulations and processing of yogurt affect the microbial quality of carbonated yogurt. *Journal of Dairy Science*, v.84, p.543-550, 2001.

KAROVICOVA, J.; KOHAJDOVA, Z. Lactic acid fermented vegetable juices – palatable and wholesome foods. *Chemical Papers*, v.59, p.143-148, 2005.

KETS, E. P. W.; DE BONT, J. A. M. Protective effect of betaina on survival of *Lactobacillus plantarum* subjected to drying. *FEMS Microbiology Letters*, v.116, p.251-256, 1994.

KETS E. P. W.; GALINSKI E. A.; DE BONT J. A. M. Carnitine: a novel compatible solute in *Lactobacillus plantarum*. *Archives of Microbiology*, v.62, p.243-248, 1994.

KETS, E. P. W.; TEUNISSEN, P. J. M.; DE BONT, J. A. M. Effect of compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.259-261, 1996.

KETS, E. P. W.; NIEROP GROOT, M.; GALINSKI, E. A.; DE BONT, J. A. M. Choline and acetylcholine: novel cationic osmolytes in *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.48, p.94-98, 1997.

KO, R.; SMITH L. T.; SMITH, G. M. Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, v.176, p.426-431, 1994.

KOLIDA, S.; GIBSON, G. R. Prebiotic capacity of inulin-type fructans. *The Journal of Nutrition*, v.137, p. 2503S-2506S, 2007.

LANGE, W.; BRANDENBURG, W. A.; DE BOCK, T. S. M. Taxonomy and cultonomy of beet (*Beta vulgaris* L.). *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.130, p.81-96, 1999.

LEONEL, M.; CEREDA, MARNEY PASCOLI. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, p. 65-69, 2002.

LEONEL, M. et al. Composição química e perfil de açúcares de tubérculos de Alcachofra de Jerusalém submetidos a diferentes condições de armazenamento. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 9, p.109-113, 2006.

LESLIE, S. B. et al. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, p.3592-3597, 1995.

LINDERS, L. J. M. et al. Effect of added carbohydrates on membrane phase behavior and survival of dried *Lactobacillus plantarum*. *Cryobiology*, v.35, p.31-40, 1997.

LUENGO, R. de F. A. et al. *Tabela de composição nutricional das hortaliças*. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 4 p.

MADEIRA, N. R.; SOUSA, R. J. *Mandioquinha-salsa: alternativa para o pequeno produtor*. Lavras: Editora Ufla., 2004. 71 p.

MAY DE MIO, L. L. et al. Proposta de escala diagramática para quantificação da cercosporiose da beterraba. *Scientia Agraria*, v. 9, p. 331-339, 2008.

MENG, X. C. et al. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry*, v.106, p.1406-1416, 2007.

MIRANDA, J. E. C. Brazlândia Roxa, Brazlândia Branca; Brazlândia Rosada e Coquinho: novas cultivares de batata-doce. 1989. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.7, n.1, p.32-33, 1989. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/cultivares/bat-doce.ht>>. Acesso em: 14 mar. 2010.

MOLENAAR, D. et al. Characteristics and osmoregulatory roles of uptake systems for proline and glycine betaine in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, v.175, p.5438-5444, 1993.

MOLIN G. *Lactobacillus plantarum 299v*, 2006. Disponível em: <<http://goodbelly.com/uploads/47919210aed3f.pdf>>. Acesso em: 16 de junho de 2008. Acesso em: 30 mar. 2009.

NASCIMENTO, R. M. et al. Infestação natural de cultivares de batata-doce, *Ipomoea batatas* (L.) Lam., por "brocas das ramas" (Lepdótera: Pyralidae) no Recôncavo Baiano. *Magistra*. v. 12, 2000.

NINESS, K. R. Inulin and oligofuctose: what are they? *Journal of Nutrition*, v.129, p.1402s-1406s, 1999.

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO - NEPA, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos*. 2. ed. Campinas, 114p, 2006.

NYSSÖLÄ, A. *Pathways of glycine betaine synthesis in two extremely halophilic bacteria, Actinopolyspora halophila e Ectothiorhodospira halochloris*. 2001. 68f. Tese (Doutorado em Ciência em Tecnologia) - Helsinki University of Technology – Departamento de Tecnologia Química - Espoo, Finlândia.

OLIVEIRA, R. A. de et al. Otimização de extração de inulina de raízes de chicória. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 6, p. 131-140, 2004.

PAVLOV, A. et al. Biosynthesis and radical scavenging activity of betalains during the cultivation of red beet (*Beta vulgaris*) hairy root cultures. *Z Naturforsch*, v.57, p.640-644, 2002

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N.R. *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*. 2. ed. Makron Books, 1997. V.1, 534 p.

PEREIRA, J. C. Prebióticos, probióticos e simbióticos. *Boletim do Criadouro Campo das Caviúnas*, n.22, p.1-11, 2007.

POOLMAN, B.; GLAASKER, E. Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Molecular Microbiology*, v.29, p.397-407, 1998.

POTTS, E. A.; FLEMING, H. P. Prevention of mold-induced fermentation with *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Food Science*, v.47, p.1723-1727, 1982.

PRASAD, J.; MCJARROW, P.; GOPAL, P. Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, p. 917-925, 2003.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R. et al. Development of functional ingredients for gut health. *Trends in Food Science & Technology*, v.13, p.3-11, 2002.

RAKIN, M. et al. The examination of parameters for lactic acid fermentation and nutritive value of fermented juice of beetroot, carrot and brewer's yeast autolysate. *Journal of the Serbian Chemical Society*, v.69, p.625-634, 2004.

ROBERFROID, M. Dietary fiber, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 33, p.103-148, 1993.

ROBERFROID, M. B. Prebiotics: preferential substrates for specific germs? *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 73, p.406S-409S, 2001.

ROBERFROID, M. B. Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition*, v.93, p.S13-S25, 2005.

ROBERT, H. et al. Glycine betaine, carnitine, and choline enhance salinity tolerance and prevent the accumulation of sodium to a level inhibiting growth of *Tetragenococcus halophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, p.509-517, 2000.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v 42, p.1-16, 2006.

SAARELA, M. et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, v.84, p.197-215, 2000.

SACCARO, D. M. *Efeito da associação de culturas iniciadoras e probióticas na acidificação, textura e viabilidade em leite fermentado*. 2008. 119f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-farmacêutica) - Universidade de São Paulo - USP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - São Paulo, SP.

SAKAMOTO, A.; MURATA, N. Genetic engineering of glycine betaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, v.51, p.81-88, 2000.

SANDERS, M. E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, v.8, p.341-347, 1998.

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. *Nutrition Reviews*, v.61, n.3, p.91-99, 2003.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK U.; FOERST, P. Effect of carbohydrates on the survival of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *Letters in Applied Microbiology*, v.42, p.271-276, 2006.

SANTIVARANGKNA, C.; HIGL, B.; FOERST, P. Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. *Food microbiology*, v.25, p.429-441, 2008.

SANTOS, R. J. JR. et al. Antimicrobial Activity of Broth Fermented with Kombucha Colonies. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, v.1, p. 072-078, 2009.

SCOTT, G. J.; ROSEGRANT, M. W.; RINGLER, C. Roots and tubers for the 21st century: trends, projections, and policy options. *A 2020 Vision for Food, Agriculture, and the Environment*, 2000. Disponível em: <<http://ageconsearch.umn.edu/bitstream/16340/1/br00066e.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2010.

SELMER-OLSEN, E.; BIRKELAND, S. E.; SÔRHAUG, T. Effect of protective solutes on leakage from and survival of immobilized *Lactobacillus* subjected to drying, storage and rehydration. *Journal of Applied Microbiology*, v.87, p.429-437, 1999.

SILVA, N. DA; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Livraria Varela, 317p, 2001.

SILVA, J. B. C.; LOPES, C. A.; MAGALHÃES, J. S. Cultura da Batata-doce. In: CEREDA, M. P.. (org.). *Agricultura: tuberosas amiláceas latino-americanas*. São Paulo: Fundação Cargill, v.4, p. 448-504, 2002.

SILVA, S.V. da. *Desenvolvimento de logurte Probiótico com Prebiótico*. 2007. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria - UFSM - Santa Maria, RS.

SOARES, K.T.; MELO, A. S. de; MATIAS, E. C. A cultura da batata-doce (*Ipomea batatas* (L.) Lam), 2002. Disponível em: <http://www.emepa.org.br/batata_doce.php>. Acesso em: 16 abr. 2009.

SOUZA, CI. H. B. de. *Influência de uma cultura starter termofílica sobre a viabilidade de Lactobacillus acidophilus e as características de queijo minas frescal probiótico*. 2006. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - São Paulo, SP.

TEIXEIRA, P.; CASTRO, H.; KIRBY, R. Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Applied Bacteriology*, v.70, p.456-462, 1995.

TEIXEIRA, P.; CASTRO, H.; KIRBY, R. Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. *Letters in Applied Microbiology*, v.22, p.34-38, 1996.

TEIXEIRA, P.; CASTRO, H.; KIRBY, R. Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying. *Journal of Applied Microbiology*, v.82, p.87-94, 1997.

VIANA, Y. A.; GARROTE-FILHO, M. DA S.; PENHA-SILVA, N. Estabilização das proteínas por osmólitos. *Bioscience Journal*, v.21, p.83-88, 2005.

VIDAL, W. N.; VIDAL, M. R. R. *Botânica organográfica: quadros sinóticos ilustrados de fanerógamos*. 3. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1990.

VISSER R. et al. Antagonism of lactic acid bacteria against phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.52, p.552-555, 1986.

WELS, M. W. W. *Unraveling the regulatory network of Lactobacillus plantarum WCFS1*. 2008. 192f. Tese (Pós-doutorado) - Universidade de Wageningen – Holanda.

WITHERS, P. C. et al. Role of urea and methylamines in buoyancy of elasmobranchs. *Journal of Experimental Biology*, v.188, p.175-189, 1994.

WONGKHALAUNG, C. Lactic acid fermentation of sweetpotato. *Kasetsart Journal: Natural Science*, v.29, p.251-256, 1995.

YANCEY, P. H. et al. Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science*, v.217, p.1214-1222, 1982.

YANCEY, P. H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of Experimental Biology*, v.208, p.2818-2830, 2005.

YOON, K. Y.; WOODAMS, E. E.; HANG, Y. D. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, v.38, p.73-75, 2005.

ZIEMER, C.; GIBSON, G. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*, v. 8, p. 473-479, 1998.