



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MARLI BUSANELLO

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E ESTABILIDADE DE  
LEITE FERMENTADO COM BACTÉRIAS LÁTICAS E  
FARINHA DE BANANA VERDE**

---

Londrina  
2016

MARLI BUSANELLO

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E ESTABILIDADE DE  
LEITE FERMENTADO COM BACTÉRIAS LÁTICAS E  
FARINHA DE BANANA VERDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência De Alimentos, nível doutorado, da  
Universidade Estadual de Londrina, como requisito  
parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de  
Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Garcia

Londrina  
2016

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

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

Busanello, Marli.

Desenvolvimento, otimização e estabilidade de leite fermentado com bactérias láticas e farinha de banana verde / Marli Busanello. - Londrina, 2016.  
124 f.

Orientador: Sandra Garcia.

Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2016.  
Inclui bibliografia.

1. Bactérias láticas - Tese. 2. Farinha de banana verde - Tese. 3. Leite fermentado - Tese. 4. Peptídeos bioativos - Tese. I. Garcia, Sandra . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

MARLI BUSANELLO

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E ESTABILIDADE DE LEITE  
FERMENTADO COM BACTÉRIAS LÁTICAS E FARINHA DE  
BANANA VERDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência De Alimentos, nível doutorado, da  
Universidade Estadual de Londrina, como requisito  
parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de  
Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Garcia  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Magali Soares dos Santos Pozza  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

---

Prof. Dr. Gilberto Alves  
Universidade Paranaense – UNIPAR

---

Prof. Dra. Cinthia Hoch Batista de Souza  
Universidade Norte do Paraná – UNOPAR

---

Prof. Dra. Giselle Aparecida Nobre Costa  
Universidade Norte do Paraná – UNOPAR

Londrina, 5 de agosto de 2016.

À minha família,  
em especial meus pais  
Angelo e Nadir, meus irmãos  
Edilson, Ademir e Mauro,  
pelo amor, confiança e por  
sempre estarem ao meu lado,  
incondicionalmente.

À meu esposo, Renã,  
pelo amor, carinho, por  
acreditar em mim e sempre  
me apoiar.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

À Deus e a Nossa Senhora Aparecida, pela graça de mais esta conquista, por sempre iluminar e guiar meu caminho e meus passos concedendo-me fé, paciência e sabedoria para enfrentar as dificuldades e pelos ótimos momentos e pessoas especiais que me concederam ao longo do doutoramento.

À Professora Dra. Sandra Garcia, pela estimada orientação, pela confiança, pelos ensinamentos que proporcionaram meu desenvolvimento no âmbito pessoal e profissional meu imenso respeito e admiração.

À Professora Dra. Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira por ter concedido o Laboratório de Imunotecnologia, em especial à Natália Harumi Niguma pelo auxílio na análise de eletroforese.

À Professora Dra. Célia Guadalupe Tardelli de Jesus, por ter concedido o Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise e ao técnico Osvaldo Capelo pelo auxílio na execução da análise de microscopia.

A técnica de Laboratório Alessandra Cristina Silva pelo seu empenho, dedicação e por estar sempre disposta a auxiliar, meus sinceros agradecimentos.

Aos demais docentes e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina pelos ensinamentos e amparo, aqui em nome das professoras Elza Ioko Ida e Marta Marta de Toledo Benassi, coordenadoras do Programa de Pós-Graduação durante o meu período de doutoramento, que sempre estiveram à disposição para auxiliar.

À Capes, pela bolsa de estudo concedida que foi de primordial importância para a realização deste estudo.

À Clerici-Sacco, na pessoa de Hans Knudsen, pelas culturas de *Lactobacillus plantarum* BG 112 (probiótica) e *Lactobacillus helveticus* LH 13 que foram imprescindíveis para a realização deste estudo.

A empresa Rositos, pela farinha de banana verde utilizada neste estudo.

Aos amigos do coração que o doutorado me presenteou e que sempre estiveram presentes nos momentos difíceis e nas alegrias, me auxiliando na teoria e na prática dos experimentos e por ser minha segunda família em Londrina, Karla Bigetti Guergoletto, Alessandra Bosso, Marsilvio Lima de Moraes Filho, Naiara Ramos, as palavras não são suficientes para expressar meu amor e gratidão a vocês.

Às amigas Suzana Matsubara, Maria Thereza Carlos Fernandes e Fernanda Farinazzo, pela colaboração nos experimentos, pela amizade e pelos bons momentos.

Às minhas amigas de “longa data”, Elizete Grip e Naldiane Borella, Ana Paula Sartori Chambó, Priscilla Cenci de Barros pela amizade sincera e mesmo de longe sempre se fizeram presentes.

Aos colegas de laboratório e do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, em especial, Adriana Bosso, Carolina Saori, Katri Gasparin, Raissa Curti, Andrea Iak, Fernando Sanches de Lima, Cintia Handa, Maria Rita, Natália Niguma, Dirlei Kieling, Paulo de Tarso, pelos bons momentos durante o doutoramento.

Às minhas cunhadas Elizete, Daiane e Everlise, por sempre estarem ao meu lado, aos meus amados sobrinhos (as) Luana, Karine, Lucas, Danter, Amanda e Alice, minhas jóias raras, pelo amor incondicional.

À todos que direta ou indiretamente auxiliaram no desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos” (Marcel Proust).

BUSANELLO, Marli. **Desenvolvimento, otimização e estabilidade de leite fermentado com bactérias lácticas e farinha de banana verde**. 2016. 124 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## RESUMO

Considerando os efeitos benéficos conferidos por bactérias ácido lácticas (BAL), incluindo os microrganismos probióticos, assim como os compostos bioativos presentes na farinha de banana verde (FBV), este trabalho objetivou avaliar o efeito do processo fermentativo por (*Lactobacillus plantarum* BG112 ou *Lactobacillus helveticus* LH 13) em leite adicionado de FBV no crescimento e sobrevivência dos microrganismos durante a simulação gastrointestinal *in vitro* e armazenamento assim como, a atividade antioxidante e a potencial produção de peptídeos bioativos. Os fermentados por *L. plantarum* ou *L. helveticus* adicionados de FBV foram conduzidos a uma otimização visando maior crescimento celular. Foram formulados produtos nos quais avaliou-se durante o armazenamento (28 dias a 4 °C) a viabilidade celular, simulação gastrointestinal *in vitro*, características físico-químicas, cor, viscosidade, capacidade de retenção de água (CRA) e aceitação sensorial (após 48 h de fermentação). Durante a fermentação foi avaliada, a atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS, a capacidade de proteção ao DNA plasmidial, a atividade proteolítica e a produção de peptídeos bioativos com capacidade anti-hipertensiva. Observou-se que a adição de 1,08 % de FBV favoreceu o crescimento celular, e após 48 h de fermentação a contagem média no fermentado por *L. plantarum* foi de  $10,01 \pm 0,09$  log UFC. mL<sup>-1</sup>, e para o fermentado por *L. helveticus* foi de  $9,33 \pm 0,04$  log UFC. mL<sup>-1</sup>, sendo a presença dos microrganismos confirmada por microscopia eletrônica de varredura. Na simulação gastrointestinal *in vitro* o fermentado por *L. helveticus* (após 28 dias de armazenamento) apresentou a maior resistência e contagem de  $5,16 \pm 0,04$  log UFC. mL<sup>-1</sup>. Os fermentados com FBV apresentaram maior viscosidade, CRA e atividade antioxidante em relação aos fermentados sem adição de FBV. O leite fermentado por *L. helveticus* apresentou maior atividade proteolítica, maior atividade de peptídeos anti-hipertensivos e melhor proteção ao DNA plasmidial em relação ao fermentado por *L. plantarum*. Os atributos sensoriais não diferiram entre os fermentados, com aceitação global superior a 70 %. Portanto, o desenvolvimento de leites fermentados adicionados de FBV é de grande valia no aporte de antioxidantes e peptídeos com atividades biológicas.

**Palavras chave:** Antioxidantes. Anti-hipertensiva. DNA plasmidial. Fermentação. *Lactobacillus spp.* Proteolítico.

BUSANELLO, Marli. **Development, optimization and stability of fermented milk by lactic acid bacteria and green banana flour**. 2016. 124 p. Thesis (Doctor Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

### ABSTRACT

Considering the beneficial effects conferred by lactic acid bacteria (LAB), including probiotic micro-organisms, as well as bioactive compounds present in green banana flour (GBF), this study aimed to evaluate the effect of the fermentation process (*Lactobacillus plantarum* BG112 or *Lactobacillus helveticus* LH 13) in milk added of GBF, on growth and survival of microorganisms during the gastrointestinal simulation *in vitro* and storage as well as antioxidant activity and potential production of bioactive peptides. Fermented by *L. plantarum* or *L. helveticus* added GBF were led to an optimization seeking greater cell growth. which products were formulated to be evaluated during storage (28 days at 4 ° C) cell viability gastrointestinal simulation *in vitro*, physical-chemical characteristics, color, viscosity, water retention ability (WRA) and sensory acceptance (after 48 h of fermentation). During fermentation was evaluated the antioxidant activity by DPPH and ABTS methods, the ability to protect the plasmid DNA, proteolytic activity and the production of bioactive peptides with anti-hypertensive capacity. It was observed that the addition of 1.08% of GBF favored cell growth, and after 48 h of fermentation the average count in fermented milk by *L. plantarum* was  $10.01 \pm 0.09$  log CFU. ml<sup>-1</sup>, and fermented milk by *L. helveticus* was  $9.33 \pm 0.04$  log CFU. ml<sup>-1</sup> and the presence of micro-organisms confirmed by scanning electron microscopy. In the gastrointestinal simulation *in vitro*, fermented milk by *L. helveticus* (after 28 days of storage) showed the highest resistance and score of  $5.16 \pm 0.04$  log CFU. ml<sup>-1</sup>. Fermented milk with GBF showed higher viscosity, CRA and antioxidant activity compared to fermented milk without adding of GBF. The fermented milk by *L. helveticus* showed larger proteolytic activity, larger activity of antihypertensive peptides and better protection of the plasmid DNA in relation to the fermented milk by *L. plantarum*. The sensory attributes did not differ between fermented milk, with above global acceptance to 70%. Therefore, the development of fermented milk added of GBF is of great value in the contribution of antioxidants and peptides with biological activities.

**Keywords:** Antioxidants. Anti-hypertensive. Plasmidial DNA. Fermentation. *Lactobacillus spp.* Proteolytic.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I

- Figura 1** – Classificação da banana verde segundo escala de maturação Von Loesecke..... 28
- Figura 2** – Estrutura da amilose (A), polímero linear composto por D-glicoses unidas em  $\alpha$ -(1-4) e amilopectina (B), polímero ramificado composto por D-glicoses unidas em  $\alpha$ -(1-6) ..... 30
- Figura 3** – Esquema da liberação de peptídeos bioativos e possíveis diferenças entre a fragmentação da proteína através de fermentação e/ou digestão gastrointestinal. Adaptado de Moller et al. (2008)..... 43

### CAPÍTULO II

- Figure 1** – Response surfaces for *L. helveticus* (a) and *L. plantarum* (b) as a function of fermentation time and GBF concentration ..... 70
- Figure 2** – LAB enumeration, pH values (a), total acidity and sugar content (b) during 72 h of fermentation by *L. helveticus* and *L. plantarum*..... 71
- Figure 3** – Mean  $\pm$  standard deviation followed by the same uppercase letters did not differ between the time points (1, 7, 14, 21 and 28 days) of storage. Mean  $\pm$  standard deviation followed by the same lowercase letters did not differ between treatments for the same storage period by Tukey test at a significance level of 5 %. *L. plantarum* and *L. helveticus* Control: milk fermented with *L. plantarum* or *L. helveticus* with no flour, no sugar and no essence; *L. plantarum* and *L. helveticus* Formulated: Fermented milk with *L. plantarum* or *L. helveticus* with added 1.08 % (w/v) green banana flour, 16 % (w/v) sucrose and 0.06 % (w/v) banana essence..... 75

### CAPÍTULO III

- Figura 1** – Atividade antioxidante pelo sequestro de radicais DPPH• e ABTS+• em leite fermentado por *L. plantarum* (27 °C) ou *L. helveticus* (29 °C) adicionado de 1,08% (m/v) de FBV durante 72 h..... 88

<b>Figura 2</b> –	Análise da atividade antioxidante pelo sequestro dos radicais ABTS+• em leites fermentados durante 28 dias de armazenamento a 4 °C. <i>L. plantarum</i> ou <i>L. helveticus</i> controle: leite fermentado com <i>L. plantarum</i> ou <i>L. helveticus</i> sem adição de FBV, sacarose e essência de banana; <i>L. plantarum</i> ou <i>L. helveticus</i> formulado: leite fermentado com <i>L. plantarum</i> ou <i>L. helveticus</i> adicionado de 1,08% (m/v) de FBV, 16% (m/v) de sacarose e 0,06% (v/v) de essência de banana .....	89
<b>Figura 3</b> –	Análise da atividade antioxidante pelo sequestro dos radicais DPPH• em leites fermentados durante 28 dias de armazenamento a 4 °C. <i>L. plantarum</i> ou <i>L. helveticus</i> controle: leite fermentado com <i>L. plantarum</i> ou <i>L. helveticus</i> sem adição de FBV, sacarose e essência de banana; <i>L. plantarum</i> ou <i>L. helveticus</i> formulado: leite fermentado com <i>L. plantarum</i> ou <i>L. helveticus</i> adicionado de 1,08% (m/v) de FBV, 16% (m/v) de sacarose e 0,06% (v/v) de essência de banana .....	90
<b>Figura 4</b> –	Padrão de eletroforese em gel de agarose (1 %); coluna (C+): controle com DNA nativo; coluna (C-): DNA incubado com reagente de Fenton; linhas (A e B): leite fermentado com <i>L. plantarum</i> (27 °C) e <i>L. helveticus</i> (29 °C) respectivamente, adicionados de 1,08 % (m/v) de FBV durante 72 h .....	91
<b>Figura 5</b> –	Atividade proteolítica avaliada pelo método OPA (orto-ftaldialdeído) em leites fermentados <i>L. helveticus</i> (24 h /29 °C) e <i>L. plantarum</i> (24 h/27 °C) adicionados de 1,08 % (m/v) de FBV .....	93
<b>Figura 6</b> –	Atividade inibitória de ACE in vitro durante o crescimento dos fermentados com <i>L. helveticus</i> (24 h /29 °C) e <i>L. plantarum</i> (24 h/27 °C) adicionados de 1,08 % (m/v) de FBV .....	94

#### CAPÍTULO IV

<b>Figura 1</b> –	Análise do efeito do armazenamento de 28 dias a 4 °C sobre os parâmetros de cor em leites fermentados. Leite fermentado controle: <i>L. plantarum</i> ou <i>L. helveticus</i> sem adição de FBV, açúcar e essência; Leite formulado fermentado por <i>L. plantarum</i> ou <i>L. helveticus</i> adicionado de 1,08% (m/v) FBV, 16 % (m/v) de sacarose e 0,06 % (v/v) de essência de banana. Valor de L* (Figura A), valor de a* (Figura B) e valor de b*( Figura C). L* = Luminosidade (0- preto 100-branco); a* (+a indica vermelho e –a indica verde); b* (+b indica amarelo e –b indica azul) .....	107
-------------------	---	-----

- Figura 2** – Análise de viscosidade aparente (a) e CRA (b) em leites fermentados controle: Leite fermentado com *L. plantarum* ou *L. helveticus* sem adição de FBV, açúcar e essência; Formulado: Leite fermentado com *L. plantarum* ou *L. helveticus* adicionado de 1,08 % (m/v) FBV, 16 % (m/v) de sacarose e 0,06 % (v/v) de essência de banana..... 108
- Figura 3** – Microscopia eletrônica de varredura em leites fermentados durante 48h; Controle: leite fermentado com *L. helveticus* (A) e *L. plantarum* (C) sem adição de FBV; Formulado: leite fermentado com *L. helveticus* (B) e *L. plantarum* (D) com adição de 1,08 % (m/v) de FBV. Setas: EPS; Círculos: Mícelas de caseína ..... 110
- Figura 4** – Produção de ácido acético (a) e láctico (b) em leites fermentados por *L. helveticus* e por *L. plantarum* com adição de 1,08 % (m/v) de FBV durante a fermentação de 72 h..... 111
- Figura 5** – Avaliação dos atributos sensoriais (escala de 1-9). Médias (n= 76) seguidas de letras iguais não diferem entre os tratamentos pelo teste T a 5 % de significância. Leite fermentado por *L. plantarum* ou *L. helveticus* adicionado de 1,08 % (m/v) de FBV, 16 % (m/v) de sacarose e 0,06 % (v/v) de essência de banana..... 113

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1</b> – Parâmetros comparativos entre a banana verde e madura da variedade Taiwan.....	28
--	----

### CAPÍTULO II

<b>Table 1</b> – Experimental design (22) with the real and coded values for variable x1 (GBF concentration), x2 (fermentation temperature) and <i>L. plantarum</i> and <i>L. helveticus</i> counts on milk with added GBF after 48 hours of fermentation (log CFU.mL <sup>-1</sup> ) a .....	67
<b>Table 2</b> – Estimated effects and regression coefficients for the response variable ( <i>L. helveticus</i> (LH) and <i>L. plantarum</i> (LP) counts) a68	
<b>Table 3</b> – ANOVA for the growth of <i>Lactobacillus plantarum</i> (LP) and <i>Lactobacillus helveticus</i> (LH) in the milk system with added green banana flour a .....	69
<b>Table 4</b> – Chemical composition the GBF and milk fermented by <i>L. helveticus</i> or <i>L</i> .....	75
<b>Table 5</b> – LAB enumeration (log CFU.mL <sup>-1</sup> ), pH and titratable acidity of milk fermented by <i>L. plantarum</i> or <i>L. helveticus</i> during 28 days of storage at 4 °C a.....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a*	Componente vermelho-verde
ACE	Enzima conversora da angiotensina
ABTS+●	Radical do cátion ABTS
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	Amido resistente
BAL	Bactérias ácido lácticas
b*	Componente amarelo-azul
CEP	Proteinase do envelope celular
CRA	Capacidade de retenção de água
CCRD	Central composite rotational design
CFU	Colony forming units
DPPH●	Radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EPS	Exopolissacarídeo
FBV	Farinha de banana verde
GBF	Green banana flour
L*	Luminosidade
LDR	leite desnatado reconstituído
P	Nível de Significância
UFC	Unidades formadoras de colônia
SRM	Surface response methodology

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	17
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	20
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	21
<b>IV –</b>	<b>Artigo: Influência de bactérias lácticas e adição de farinha de banana verde na produção de ácidos orgânicos e aceitação sensorial de leites fermentados</b> .....	24
	<b>CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	25
1.1	ALIMENTOS FUNCIONAIS .....	25
1.2	BANANA ( <i>MUSA SPP</i> ) .....	26
1.2.1	Farinha de Banana Verde (FBV) .....	28
1.2.2	Amido Resistente (AR) .....	29
1.3	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	32
1.3.1	Antioxidantes .....	32
1.3.2	Determinação da Atividade Antioxidante .....	34
1.4	LEITE FERMENTADO .....	34
1.5	PROBIÓTICOS .....	36
1.5.1	Efeitos Benéficos Associados à Probióticos .....	37
1.5.2	Mecanismos de Ação .....	38
1.5.3	Uso de Probióticos .....	38
1.6	BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS (BAL) .....	39
1.6.1	<i>Lactobacillus plantarum</i> ( <i>L. plantarum</i> ) .....	40
1.6.2	<i>Lactobacillus helveticus</i> ( <i>L. helveticus</i> ) .....	40
1.6.3	Sistema Proteolítico .....	41
1.7	PEPTÍDEOS BIOATIVOS .....	42
1.7.1	Atividade Anti-hipertensiva .....	43
1.8	REFERÊNCIAS .....	45

**CAPÍTULO II – Fermentative ability of *Lactobacillus plantarum* BG 112 and *Lactobacillus helveticus* LH 13 during growth in skim milk with added green banana flour**..... 61

2.1	INTRODUCTION.....	62
2.2	MATERIAL AND METHODS .....	63
2.2.1	Ingredients and Starter Culture.....	63
2.2.2	Inoculum Preparation and Culture Maintenance.....	63
2.2.3	Production of Control Fermented Milk and Fermented Milk with the Addition of GBF.....	63
2.2.4	Starch Determination.....	64
2.2.5	Experimental Design .....	64
2.2.6	Study of the Growth Kinetics.....	65
2.2.7	Preparation of Fermented Milk with GBF .....	65
2.2.8	Proximate Composition and other Determinations .....	65
2.2.9	Lactic Acid Bacteria Enumeration .....	66
2.2.10	Simulated Gastrointestinal Conditions and LAB Resistance within the GBF Fermented Milk Matrix .....	66
2.2.11	Statistical Analysis .....	66
2.3	RESULTS AND DISCUSSION .....	66
2.3.1	Starch Determination.....	66
2.3.2	Optimization.....	67
2.3.3	Growth Curve .....	70
2.3.3	Proximate Composition of GBF and Fermented Milk During Storage.....	72
2.3.4	Storage Stability .....	73
2.3.5	Mean Counts of Lactic Acid Bacteria after Incubation in Simulated Gastrointestinal Conditions .....	75
2.4	CONCLUSION .....	77
2.5	REFERENCES.....	77

<b>CAPÍTULO III – Atividade antioxidante em farinha de banana verde e capacidade inibitória da enzima conversora de angiotensina e atividade protetora do DNA em leite fermentado com <i>L. plantarum</i> BG 112 e <i>L. helveticus</i> LH 13</b> ..... 81	
3.1	INTRODUÇÃO..... 82
3.2	MATERIAL E MÉTODOS..... 83
3.2.1	Matérias Primas e Cultura Starter ..... 83
3.2.2	Determinação de Compostos Fenólicos Totais e Taninos Condensados ..... 84
3.2.3	Determinação da Atividade Antioxidante: Sequestro de Radicais DPPH• ..... 84
3.2.4	Determinação da Atividade Antioxidante: Sequestro de Radicais ABTS+•..... 84
3.2.5	Análise de Proteção Contra Oxidação do DNA Plasmidial ..... 85
3.2.6	Determinação da Atividade Proteolítica..... 85
3.2.7	Inibição <i>in vitro</i> da Enzima Conversora da Angiotensina (atividade inibidora- ACE)..... 85
3.2.8	Análise Estatística ..... 86
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 86
3.3.1	Compostos Fenólicos Totais e Taninos Condensados Presentes na FBV..... 86
3.3.2	Atividade Antioxidante pelo Sequestro dos Radicais DPPH• e ABTS+• Presente na FBV ..... 87
3.3.3	Habilidade Protetora Contra a Oxidação do DNA Plasmidial ..... 91
3.3.4	Avaliação da Atividade Proteolítica Durante o Processo Fermentativo ..... 92
3.3.5	Inibição <i>in vitro</i> da Enzima Conversora da Angiotensina (atividade inibidora de ACE) ..... 94
3.4	CONCLUSÃO..... 95
3.5	REFERÊNCIAS ..... 96

<b>CAPÍTULO IV – Influência de bactérias lácticas e adição de farinha de banana verde na produção de ácidos orgânicos e aceitação sensorial de leites fermentados</b> ..... 101	
4.1	INTRODUÇÃO..... 102
4.2	MATERIAL E MÉTODOS..... 103
4.2.1	Matérias Primas e Cultura Starter ..... 103
4.2.2	Análise da Viscosidade Aparente, CRA e Cor..... 103

4.2.3	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	104
4.2.4	Ácidos Orgânicos .....	104
4.2.5	Análise Sensorial .....	105
4.2.6	Análise Estatística .....	105
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	106
4.3.1	Análise de Cor .....	106
4.3.2	Análise de Viscosidade Aparente e CRA.....	108
4.3.3	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	110
4.3.4	Ácidos Orgânicos .....	111
4.3.5	Análise Sensorial.....	112
4.4	CONCLUSÃO.....	114
4.5	REFERÊNCIAS .....	114
	<b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>119</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>120</b>
	<b>Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – UEL .....</b>	<b>121</b>
	<b>Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido na Forma de Convite Para os Provedores do Leite Fermentado no Teste de Aceitação.....</b>	<b>122</b>
	<b>Anexo 3 – Coleta de Dados do Provedor.....</b>	<b>123</b>
	<b>Anexo 4 – Ficha para Avaliação Sensorial: Teste de Aceitação .....</b>	<b>124</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A busca por melhor qualidade de vida aliada à redução dos riscos de enfermidades por meio da ingestão de alimentos desperta cada vez mais o interesse e a pesquisa. Estudos tem demonstrado a relação direta entre consumo ou a carência de alimentos e os benefícios ou riscos, ressaltando o quanto a saúde é significativamente influenciada pela alimentação (BASHO; BIN, 2010; GUILLAMÓN et al. 2010).

No entanto, ao mesmo tempo em que há uma maior conscientização e preocupação com a qualidade de vida, a população tem uma vida muito mais agitada e com hábitos que interferem significativamente na alimentação, levando muitas vezes a uma ingestão excessiva de gorduras e açúcares e diminuição considerável de fibras alimentares, vitaminas e minerais, que aliada à falta de atividade física contribui diretamente para o desenvolvimento de doenças, sobretudo na fase adulta (TARDIDO; FALCÃO, 2006).

Os alimentos, que antes eram considerados apenas fonte de nutrientes essenciais à manutenção da vida tornam-se hoje parte de estudos que os relacionam como meios para a promoção de bem-estar e saúde, ao mesmo tempo em que reduzem os riscos de enfermidades. Assim, alimentos funcionais são definidos como aqueles que proporcionam diversos benefícios à saúde, além do valor nutritivo relacionado à sua composição química (NEUMANN et al. 2000). Estes podem atuar no sistema gastrointestinal; sistema cardiovascular; no metabolismo de substratos; no crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular bem como no desempenho de funções fisiológicas (SOUZA et al. 2003).

Dentre os principais componentes dos alimentos funcionais, destacam-se os ácidos graxos poli-insaturados, as fibras alimentares, os compostos fitoquímicos, os peptídeos bioativos, os prebióticos como a inulina e oligofrutose, os compostos antioxidantes, além dos probióticos (ABREU et al. 2015; BORGES, 2000).

Neste contexto, os microrganismos probióticos são vastamente estudados e incorporados na alimentação, pois se consumidos regularmente, em quantidades adequadas são capazes de colonizar o trato gastrointestinal e conferir benefícios à saúde do hospedeiro, tais como prevenção de diarreia causada por rotavírus e associada a antibióticos (GOLDENBERG et al. 2013; PATTANI et al. 2013); regulação dos níveis de colesterol sérico; modulação do sistema imunológico; prevenção do câncer de cólon (FARNWORTH, 2008); geração de peptídeos bioativos com propriedades anti-hipertensivas (CHEN et al. 2014; ELFAHRI et al. 2014; SHU et al. 2015); propriedades antioxidantes (AHIRE et al.

2013; ELFAHRI et al. 2014; RAMESH et al. 2012), prevenção de oxidações do DNA (MARAZZA et al. 2012; XIAO et al. 2015) entre outros.

A grande maioria dos probióticos é consumida em derivados lácteos, especialmente os leites fermentados. Os leites fermentados são resultado da acidificação do leite pela atividade metabólica de bactérias ácido lácticas (BAL), que promovem nestes produtos significativas modificações físico-químicas, sensoriais e microbiológicas (CASAROTTI; PENA, 2015). Ao adicionar bactérias probióticas aos leites fermentados muitos dos efeitos benéficos atribuídos a estes microrganismos podem favorecer a saúde do consumidor.

O sabor e o aroma típicos dos leites fermentados são devidos à formação de ácidos orgânicos, como os ácidos láctico e acético, formados durante o processo fermentativo e estocagem. No entanto, o perfil de produção desses ácidos é alterado de acordo com a cultura *starter* utilizada, portanto, esta é uma variável muito importante e que pode ter influência direta na qualidade sensorial do produto (CASAROTTI et al. 2014).

*L. helveticus* tem como característica primordial à produção de concentrações elevadas de ácido láctico e de expressar um sistema proteolítico eficiente (BORGO et al. 2007), sendo as enzimas proteolíticas importantes na formação principalmente de aroma e sabor (PAN; TANOKURA, 2004). *L. plantarum* tem sido utilizada como cultura *starter* em diversos processos fermentativos contribuindo para os atributos sensoriais de sabor e textura. Além de colaborarem com as propriedades tecnológicas dos produtos, estudos têm conferido a estes capacidade de colonizar o intestino humano, atenuar problemas intestinais (WANG et al. 2009), prevenir doenças coronárias (CAVALLINI et al. 2011) entre outros.

Estudos têm investigado os benefícios à saúde do consumidor, ao adicionar a leites fermentados frutas ou fibras de frutas (CASAROTTI; PENA, 2015; ESPÍRITO-SANTO et al. 2013; SOUZA et al. 2013), uma vez que os frutos são ricos em compostos fenólicos, fibras, minerais, vitaminas e como já citado, uma alimentação saudável contribui para a prevenção e/ou redução de enfermidades.

A banana é uma das frutas mais populares e consumidas mundialmente (MEECHAONA et al. 2007; SULAIMAN et al. 2011), podendo ser consumida *in natura* como fruta doce ou sobremesa ou por meio de diversos tipos de preparo em todas as fases de amadurecimento (AURORE et al. 2009). Quando a fruta está verde, é composta de carboidratos não digeríveis que representam 60-80 % em matéria seca, e fazem parte deste percentual a celulose, hemicelulose, lignina, amido, fibra dietética e principalmente amido resistente (MENEZES et al. 2011; SARAWONG et al. 2014). Nesse estágio de maturação, a melhor forma de agregar valor aos frutos é a produção de farinhas, por evitar o desperdício,

aproveitar os compostos benéficos e assim garantir a utilização da banana verde pela indústria alimentícia (SARAWONG et al. 2014). Estudos relatam o valor nutricional e os efeitos benéficos da adição da farinha de banana verde, sobretudo em produtos de panificação e dietéticos (VERNAZA et al. 2011).

Assim, considerando os potenciais efeitos presentes nos leites fermentados com bactérias lácticas, aliados aos compostos presentes na farinha de banana verde, torna-se interessante estudar o efeito do processo fermentativo deste produto adicionado de *Lactobacillus plantarum* BG112 ou *Lactobacillus helveticus* LH 13 e farinha de banana, no crescimento e sobrevivência dos microrganismos durante armazenamento e simulação gastrointestinal, assim como, a atividade antioxidante e o potencial dos microrganismos na produção de peptídeos bioativos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

✓ Avaliar o efeito do processo fermentativo por *Lactobacillus plantarum* BG112 ou *Lactobacillus helveticus* LH 13 em leite adicionado de farinha de banana verde no crescimento e sobrevivência dos microrganismos durante a simulação gastrointestinal, assim como a atividade antioxidante e a potencial produção de peptídeos bioativos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar a farinha de banana verde quanto à composição química e o teor de amido resistente;
- ✓ Otimizar por metodologia de superfície de resposta a contagem de bactérias lácticas em leite fermentado por *Lactobacillus plantarum* ou *Lactobacillus helveticus* adicionados de farinha de banana verde;
- ✓ Analisar os fermentados armazenados durante 28 dias a 4 °C quanto às características físico-químicas, contagem de bactérias lácticas e sobrevivência dos microrganismos sob condições gastrointestinais simuladas;
- ✓ Analisar os compostos fenólicos e a atividade antioxidante da farinha de banana verde e dos fermentados;
- ✓ Avaliar os fermentados quanto à atividade proteolítica, atividade anti-hipertensiva e capacidade de proteção do DNA plasmidial contra oxidações;
- ✓ Avaliar a produção de ácidos orgânicos nos fermentados;
- ✓ Avaliar os produtos otimizados quanto à aceitação sensorial.

### 3 REFERÊNCIAS

- AHIRE, J. J.; MOKASHE, N. U.; PATIL, H. J.; CHAUDHARI, B. L. Antioxidative potential of folate producing probiotic *Lactobacillus helveticus* CD6. *Journal of Food Science and Technology*, v. 50, p. 26-34, 2013.
- AUORE, G.; PARFAIT, B.; FAHRASMANE, L. Bananas, raw materials for making processed food products. *Trends in Food Science & Technology*, v. 20, p. 78 – 91, 2009.
- BASHO, S. M.; BIN, M. C. Propriedades dos alimentos funcionais e seu papel na prevenção e controle da hipertensão e diabetes. *Interbio*, v.4, 2010.
- BORGES, V. C. Alimentos funcionais: Prebióticos, Probióticos, Fitoquímicos e Simbióticos. In: Waitzberg DL. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, p.1495-509, 2000.
- CASAROTTI, S. N.; MONTEIRO, D. A.; MORETTI, M. M. S.; PENNA. A. L. B. Influence of the combination of probiotic cultures during fermentation and storage of fermented milk. *Food Research International*, v.59, p. 67-75, 2014.
- CASAROTTI, S. N.; PENNA, A. L. B. Acidification profile, probiotic in vitro gastrointestinal tolerance and viability in fermented milk with fruit flours. *International Dairy Journal*, v. 41, p. 1-6, 2015.
- CAVALLINI, D. C. U.; SUZUKI, J. Y.; ABDALLA, D. S. P.; VENDRAMINI, R. C.; PAULY-SILVEIRA, N. D.; ROSELINO, M. N.; PINTO, R. A.; ROSSI, E. A. Influence of a probiotic soy product on fecal microbiota and its association with cardiovascular risk factors in an animal model. *Lipids in Health and disease*, v. 10, 2011.
- CHEN ,Y.; LIU, W.; XUE, J.; YANG, J.; CHEN, X.; SHAO, Y.; et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of *Lactobacillus helveticus* strains from traditional fermented dairy foods and antihypertensive effect of fermented milk of strain H9. *Journal of Dairy Science*, v. 97, p. 6680-6692, 2014.
- ELFAHRI, K. R.; DONKOR, O. N.; VASILJEVIC, T. Potential of novel *Lactobacillus helveticus* strains and their cell wall bound proteases to release physiologically active peptides from milk proteins. *International Dairy Journal*, v.38, p.37-46, 2014.
- ESPIRITO SANTO, A. P.; CARTOLANO, N. S.; SILVA, T. F.; SOARES, F. A.; GIOIELLI, L. A.; PEREGO, P.; et al. Fibers from fruit by-products enhance probiotic viability and fatty acid profile and increase CLA content in yoghurts. *International Journal of Food Microbiology*, v. 154, n. 3, p. 135-144, 2012.
- FARNWORTH, E. R. The Evidence to Support Health Claims for Probiotics. *The Journal of Nutrition*, v. 138, p. 1250-1254, 2008.
- GOLDENBERG, J. Z.; MA, S. S.; SAXTON, J. D.; MARTZEN, M. R.; VANDVIK, P. O.; THORLUND, K.; et al. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database Systematic Reviews*, v. 31, 2013.

GUILLAMÓN, E.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; LOZANO, M.; D'ARRIGO, M.; ROSTAGNO, M. A.; VILLARES, A.; et al. Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*, v. 81, p.715–723, 2010.

MARAZZA, J. A.; NAZARENO, M. A.; GIORI, G. S.; GARRO, M. S. Enhancement of the antioxidant capacity of soymilk by fermentation with *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of functional foods*, v. 4, p. 594-601, 2012.

MEECHAONA, R.; SENGPRACHA, W.; BANDITPURITAT, J.; KAWAREE, R.; PHUTDHAWONG, W. Fatty acid content and antioxidant activity of Thai bananas. *International Journal of Science and Technology*, v. 1, p. 222–228, 2007.

NEUMANN, P. A. I. C.; ABREU, E. S.; TORRES, E. A. F. S. Alimentos saudáveis, alimentos funcionais, fármaco alimentos, nutraceuticos. *Higiene Alimentar*, v.14, p.19-23, 2000.

OVANDO-MARTINEZ, M.; SÁYAGO-AYERDI, M.; AGAMA-ACEVEDO, S.; GOÑI, I.; BELLO-PÉREZ, L. A. Unripe banana flour as an ingredient to increase the indigestible carbohydrates of pasta. *Food Chemistry*, v.113, p.121-126, 2009.

PAN, D.; TANOKURA, M. Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* JCM 1004. *Food Chemistry*, v. 88, p. 511–516, 2004.

PATTANI, R.; PALDA, V. A.; HWANG, S.; SHAH, W. S. Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infection among hospitalized patients: systematic review and meta-analysis. *Open Medicine*, v. 7, p. 56-67, 2013.

RAMESH, V.; KUMAR, R.; SINGH, R. R. B.; KAUSHIK, J. K.; MANN, B. Comparative evaluation of selected strains of lactobacilli for the development of antioxidant activity in milk. *Dairy Science and Technology*, v. 92, p. 179-188, 2012.

SARAWONG, C.; SCHOENLECHNER, R.; SEKIGUCHI, K.; BERGHOFER, E.; NG, P. K. W. Effect of extrusion cooking on the physicochemical properties, resistant starch, phenolic content and antioxidant capacities of green banana flour. *Food Chemistry*, v. 143, p. 33–39, 2014.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais dos alimentos. *Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.37, p. 127-135, 2003.

Souza, A. H. P. de; COSTA, G. A. N.; MIGLIORANZA, L. H. da.; FURLANETO-MAIA, L.; OLIVEIRA, A. F. de. Microbiological, physical, chemical and sensory characteristics of milk fermented with *Lactobacillus plantarum*. *Acta Scientiarum*, v.35, p. 125-131, 2013.

SULAIMAN, S. F.; YUSOFF, N. A. M. D.; ELDEEN, I. M.; SEOW, E. M.; SAJAK, A.A.B.; OOI, S. K. L. Correlation between total phenolic and mineral contents with antioxidant activity of eight Malaysian bananas (*Musa* sp). *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 24, p. 1–10, 2011.

SHU, G.; YANG, H.; CHEN, H.; ZHANG, Q.; TIAN, Y. Effect of incubation time, inoculum size, temperature, pasteurization time, goat milk powder and whey powder on ace inhibitory activity in fermented milk by *L. plantarum* LP69. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, v. 14, p. 107–116, 2015.

TARDIDO, A. P; FALCÃO, M. C. O impacto da modernização na transição nutricional e obesidade. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, v. 21, p. 117-124, 2006.

VERNAZA, M. G.; GULARTE, M. A.; CHANG, Y. K. Addition of green banana flour to instant noodles: Rheological and technological properties. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 35, p. 1157-1165, 2011.

WANG, B.; LI, J.; LI, Q.; ZHANG, H.; LI, N. Isolation of adhesive atrains and evaluation of the colonization and immune response by *Lactobacillus plantarum* L2 in the rat gastrointestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, v. 132, p. 59-66, 2009.

XIAO, Y.; WANG, L.; RUI, X.; LI, W.; CHEN, X.; JIANG, M. Enhancement of the antioxidant capacity of soy whey by fermentation with *Lactobacillus plantarum* B1–6. *Journal of Functional Foods*, v.12, p. 33–44, 2015.

A tese será apresentada em quatro capítulos distintos, descritos abaixo, seguidos de uma conclusão geral e Anexos:

**I** - Revisão Bibliográfica: Alimentos funcionais; Banana (*Musa* spp); Farinha de banana verde; Amido Resistente; Atividade antioxidante; Leite Fermentado; Probióticos; Bactérias Ácido Lácticas; Sistema Proteolítico; Peptídeos Bioativos;

**II** – Artigo: Fermentative ability of *Lactobacillus plantarum* BG 112 and *Lactobacillus helveticus* LH 13 during growth in skim milk with added green banana flour;

**III** – Artigo: Atividade antioxidante em farinha de banana verde e capacidade inibitória da enzima conversora de angiotensina e atividade protetora do DNA em leite fermentado por *L. plantarum* BG 112 e *L. helveticus* LH 13;

**IV** - Artigo: Influência de bactérias lácticas e adição de farinha de banana verde na produção de ácidos orgânicos e aceitação sensorial de leites fermentados.

## CAPÍTULO I REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Os alimentos funcionais são uma tendência do mercado alimentício e entre os fatores que explicam o êxito desse tipo de produto, cita-se a preocupação crescente da população com a saúde e bem-estar e a crescente comprovação científica das relações existentes entre dieta e saúde (RAUD, 2008).

O termo alimento funcional surgiu no Japão na década de 80, através de um programa de governo que tinha como objetivo desenvolver alimentos saudáveis para uma população que envelhecia e apresentava uma grande expectativa de vida (ANJO, 2004). O Japão foi o pioneiro na produção e comercialização de alimentos funcionais denominados FOSHU (Foods for Specified Health Use - Alimentos para uso específico de saúde).

Assim, a denominação “alimentos funcionais” é utilizada para caracterizar alimentos e ou ingredientes alimentares que, além de suas funções nutricionais, como fonte de energia e substrato para a formação de células e tecidos, possuem, em sua composição, uma ou mais substâncias capazes de atuar como biocomplexos moduladores dos processos metabólicos, melhorando as condições de saúde, promovendo o bem-estar e prevenindo o surgimento precoce de doenças degenerativas (COZZOLINO, 2005).

A American Dietetic Association (ADA) define três classes de alimentos funcionais (alimentos convencionais, modificados e sintetizados). Os alimentos convencionais caracterizam-se por conterem compostos bioativos naturais que possuem propriedades funcionais, para além da sua nutrição essencial, por exemplo: vitaminas antioxidantes na laranja; isoflavonas nos derivados de soja; prebióticos e probióticos. Alimentos modificados, entretanto, são aqueles que apresentam compostos bioativos provenientes de métodos de fortificação e enriquecimento, como alimentos enriquecidos com ômega-3. E, por último, os alimentos sintetizados, como, por exemplo, os que contêm hidratos de carbono não digeríveis, que fornecem benefícios prebióticos, como os oligossacarídeos ou amido resistente (CROWE; FRANCIS, 2013).

No entanto, não existe uma definição aceita a nível mundial para os alimentos funcionais. No Brasil estes são regulamentados pela Agência de Vigilância Sanitária – ANVISA, que não define alimento funcional, e sim alegação de propriedade funcional e alegação de propriedade de saúde e estabelece as diretrizes para sua utilização, bem como as condições de registro para os alimentos com alegação de propriedade funcional e/ou de saúde.

(BRASIL, 2016)

Dentre as diretrizes para os alimentos funcionais são permitidas alegações funcionais relacionadas ao papel fisiológico no crescimento, desenvolvimento e funções normais do organismo e, ou, ainda alegações sobre a manutenção geral da saúde e a redução de risco de doenças, em caráter opcional. Não são permitidas alegações que façam referência à cura ou à prevenção de doenças. Até a presente data, foram aprovadas pela ANVISA, as alegações de propriedades funcionais e de saúde para ácidos graxos, carotenóides, fibras alimentares, fitoesteróis, polióis, probióticos e proteína de soja, e cada um dos nutrientes precisa estar de acordo com os requisitos especificados e adequados às resoluções RDC nº 19/1999; RDC nº 2/2002; RDC nº 54/2012 (BRASIL, 2016).

## 1.2 BANANA (*MUSA SPP*)

Dentre os ramos da atividade agrícola no Brasil, a fruticultura assume uma importante função, pois além do valor nutritivo e os benefícios à saúde da população vinculada aos frutos, estes destacam-se na economia e cultura. Neste contexto, encontra-se a banana que teve sua origem no sul e sudeste do continente Asiático e segundo a história, é provável que a domesticação da bananeira tenha iniciado de forma paralela à agricultura dos cultivos (ROSALES et al. 1998) E graças ao maior conhecimento e ao uso mais intensivo de tecnologias, a bananicultura tem nas últimas décadas se expandido significativamente em grande parte dos países, proporcionando maior e melhor produtividade.

As bananas pertencem à classe *Monocotyledonea* da ordem *Scimitales*. A família *Musaceae* possui três subfamílias, a principal delas, *Mucoideae*, apresenta dois gêneros, o gênero *Musa*, onde se encontram os frutos comestíveis e de interesse tecnológico, composto por cerca de 30 espécies e o gênero *Ensete* com frutos ornamentais, representado por cerca de oito espécies (RIBEIRO, 2011). As variedades mais cultivadas no Brasil são as de mesa, como a prata (*Prata*, *Pacovan* e *Prata Anã*), nanica (*Nanica* ou *Caturra*, *Nanicão* e *Grande Naine*) e maçã (EMBRAPA, 2008).

A banana constitui uma importante fonte alimentar, com capacidade de diversos tipos de preparo, podendo ser utilizada verde ou madura, crua ou processada. Além disso, a boa aceitação deve-se aos aspectos sensoriais e ao valor nutricional, consistindo em fonte energética, benéfica à saúde, devido à presença de carboidratos, sais minerais, vitaminas, amido resistente, compostos fenólicos, atividade antioxidante (ASMAR et al. 2013; REBELLO et al. 2014; SARAWONG et al. 2014; WANG et al. 2012 ) e contribui para a

aceitação à ausência de sementes duras e de suco na polpa, além de disponibilidade durante todo o ano (FASOLIN et al. 2007).

Atualmente o cultivo de banana é praticado em mais de 125 países, em alguns deles, a atividade representa uma das principais fontes de arrecadação e geração de emprego e renda. Em termos de produção, o continente asiático lidera com 58 % do volume produzido; o americano vem em segundo lugar, com 26 % (América do Sul com 17 % e América Central com 8 %); e em terceiro lugar com 14 % está o continente africano. Entre os países, a Índia lidera a produção no ranking mundial, sendo responsável por 28,1 %, em segundo lugar vem a China, com 10,1 %, seguida pelas Filipinas, com 8,6 %; Equador, com 7 %; e o Brasil que corresponde a 6,9 % (IBGE, 2016).

No Brasil, os maiores estados produtores da fruta são: São Paulo com 1.205,7 toneladas (16,6 %), Bahia com 1.070,2 toneladas (14,7 %), Minas Gerais com 783,8 toneladas (10,8 %). O Paraná ocupa a 9ª posição com 279,3 toneladas (3,8 %). No montante total, a produção brasileira no ano de 2015 foi de 7.271,3 toneladas (IBGE, 2016).

Em relação ao consumo mundial, a banana é a segunda fruta mais consumida com 11,4 kg/hab/ano, perdendo apenas para a laranja com 12,2 kg/hab/ano, tendo como maior consumidor o continente americano com 15,2 kg/habitantes/ano, destacando-se a América do Sul, com 20 kg/hab/ano e a América Central com 13,9 kg/hab/ano (FAO, 2013).

Ainda em relação ao consumo de banana, na grande maioria dos países este é feito quando a fruta encontra-se madura, na forma de sobremesa. No entanto, existem países como Cuba e Equador, onde são consumidas preparações de banana no estágio de maturação verde em sopas e em pratos fritos, enquanto na África Central ela é utilizada na fabricação de cervejas (IZIDORO, 2007).

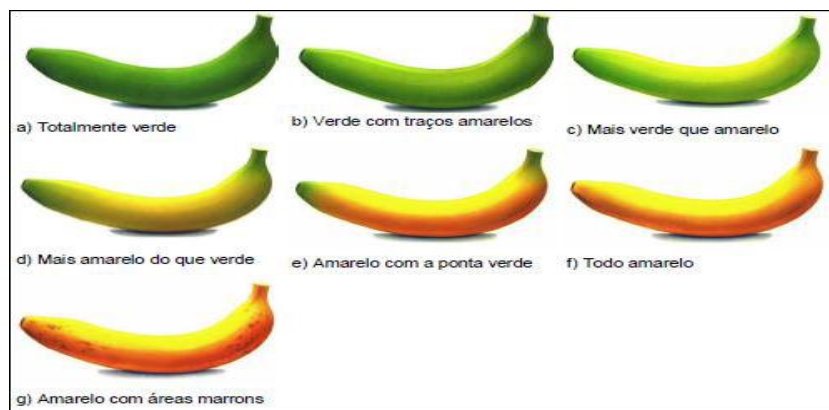
A banana é muita rica em nutrientes, e o amido é o principal constituinte da banana verde, representando um teor médio de 70-80 % em base seca (ZHANG et al. 2005). Deste percentual, a maior parte corresponde a amido resistente. No entanto, no processo de amadurecimento os frutos passam por alterações que afetam a sua composição química. Uma das principais transformações é a hidrólise do amido, onde ocorre a conversão do amido em açúcares, pela ação da enzima amilase ocasionando mudanças na textura da banana, ocorre também diminuição no teor de vitamina C devido à ação da enzima ácido ascórbico oxidase ou pela influência de enzimas oxidantes como a peroxidase (ALMEIDA, 2011). Na Tabela 1 pode ser observada a comparação entre a banana nos estágios verde e maduro. Dentre os parâmetros apresentados, destaca-se a diferença existente entre os teores de amido, sacarose e açúcares redutores.

**Tabela 1-** Parâmetros comparativos entre a banana verde e madura da variedade Taiwan.

Parâmetros	Banana verde (%)	Banana madura (%)
Proteínas	5,30	5,52
Lipídios	0,78	0,68
Fibra bruta	0,49	0,30
Cinzas	3,27	4,09
Amido	62,0	2,58
Sacarose	1,23	53,2
Açúcares redutores	0,24	33,6

Fonte: Izidoro (2007).

O processo de amadurecimento da banana pode ser classificado em sete estágios de acordo com a cor da casca e segundo a escala de Von Loesecke, (Figura 1).



**Figura 1** Classificação da banana verde segundo escala de maturação Von Loesecke. Fonte: Izidoro (2007).

As condições de clima favoráveis como temperatura, umidade relativa, precipitação e insolação, favorecem a distribuição da produção durante todo o ano e permite cultivo na maioria dos estados brasileiros. Devido à grande distribuição em praticamente todo território nacional, a banana torna-se uma matéria-prima de fácil acesso e de baixo custo para a população (LOBO; SILVA, 2003), além disso, representa a quarta fonte de energia depois do milho, arroz e trigo (SOUSA et al. 2003).

### 1.2.1 Farinha de Banana Verde (FBV)

As perdas de produtos ocorrem em qualquer produção, fato indesejado e que acarreta prejuízos a todo o setor, não sendo diferente na bananicultura, onde as perdas ocorrem antes e após a colheita, atingindo valores de 60 % (IZIDORO et al. 2008). Visando diminuir esse

percentual e também para melhor aproveitar os alimentos agregando valor a estes, a FBV pode ser um produto promissor na indústria alimentícia.

Especialmente no Brasil, a banana é pouco ou não é consumida quando encontra-se verde, sobretudo pela dureza característica e elevada adstringência, acarretada pela presença de compostos fenólicos solúveis, como o tanino e também pelo aspecto cultural no qual não há o hábito de preparações do fruto neste estágio. Logo, uma excelente alternativa para garantir a utilização dos frutos verdes pela indústria alimentícia é a obtenção de FBV (SARAWONG et al. 2014).

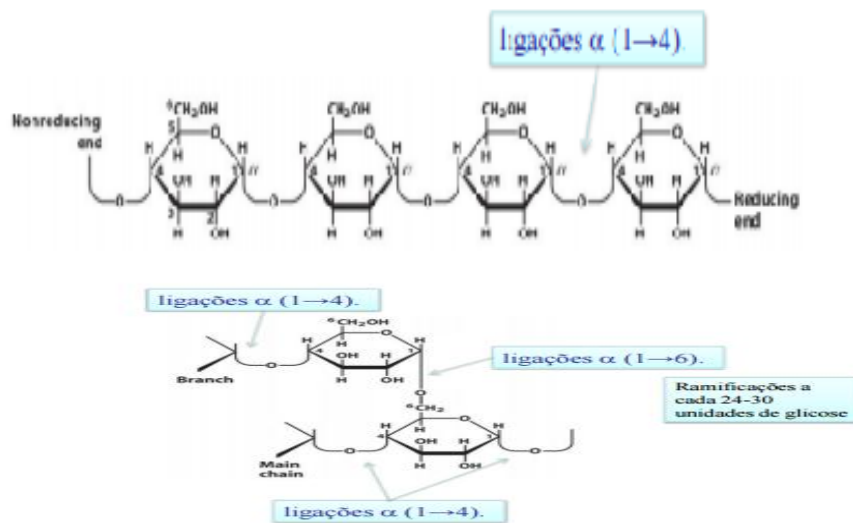
As FBV podem ser obtidas por secagem natural ou artificial, através de bananas verdes ou semiverdes das variedades, Prata, Terra, Cavendish, Nanica ou Nanicão (SBRT, 2005). A produção de farinhas representa alternativas de uso para a indústria alimentícia, sobretudo, em produtos de panificação, dietéticos e alimentos infantis, por conter nutrientes benéficos à saúde (CARVALHO, 2000), como fibras e amido resistente. Estudos de Bezerra et al. (2013), Hung et al. (2013) e Sarawong et al (2014) relataram valores de amido resistente de 35,06 %, 11,2 % e 47,25 % respectivamente. No entanto, a composição da FBV sofre alteração de acordo com a variedade da banana, com as condições de desenvolvimento, maturação e processamento para a obtenção da mesma.

O interesse em melhor conhecer e empregar as farinhas de frutas vem crescendo e encontra-se na literatura alguns estudos com adição de farinhas ou fibras de frutos na elaboração de leites fermentados, mudanças nas características físico-químicas e efeitos benéficos. Espirito Santo et al. (2012) relataram melhora na viabilidade dos probióticos e no perfil de ácidos graxos em leite fermentado com fibras de banana, maçã e maracujá, assim como no estudo de Agil et al. (2013) que relataram aumento da viabilidade de *L. acidophilus* e *B. animalis* com a inclusão de farinha de lentilha ao leite; maior viabilidade foi também observada por Guergoletto et al. (2010) em estudo de *L. casei* e farinha de banana verde e farelo de aveia, Casarotti e Pena, (2015) relataram que a suplementação com farinhas de banana, maçã e uva em leite fermentado por *L. acidophilus* protegeram o microrganismo durante a simulação das condições do trato gastrointestinal.

Assim, a FBV é um ingrediente de fácil obtenção, rica em amido resistente, vitaminas, minerais, compostos fenólicos, além de baixo custo, mostrando-se uma ótima alternativa para a elaboração de produtos com apelo funcional.

### 1.2.2 Amido Resistente (AR)

Estruturalmente, o amido é um homopolissacarídeo composto por cadeias de amilose e amilopectina (Figura 2). A amilose é formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, originando uma cadeia essencialmente linear (GRANT et al. 2004). A amilopectina é uma molécula de alto peso molecular, altamente ramificada, com ligações semelhantes à amilose. As proporções em que estas estruturas aparecem diferem entre as diversas fontes, entre variedades de uma mesma espécie e ainda, numa mesma variedade, de acordo com o grau de maturação da planta (WANG; WHITE, 1994).



**Figura 2** Estrutura da amilose (A), polímero linear composto por D-glicoses unidas em  $\alpha$ -(1-4) e amilopectina (B), polímero ramificado composto por D-glicoses unidas em  $\alpha$ -(1-6). Adaptado de Lajolo; Menezes (2006).

O amido é classificado em função da sua estrutura físico-química e da sua susceptibilidade à hidrólise enzimática, e de acordo com a velocidade com a qual o alimento é digerido *in vitro*, o amido divide-se em: rapidamente digerível (ARD) quando, ao ser submetido à incubação com amilase pancreática e amiloglicosidade em temperatura de 37 °C, converte-se em glicose em 20 minutos; lentamente digerível (ALD) quando nas condições anteriores é convertido em glicose em 120 minutos e amido resistente (AR), que resiste à ação das enzimas digestivas (ENGLYST et al. 1992).

Assim, o termo AR foi sugerido inicialmente por Englyst et al. (1982), quando constatou-se que muitos alimentos processados continham maior teor aparente de polissacarídeos não amiláceos do que os produtos crus correspondentes. Os estudos revelaram que o aumento era devido a um composto formado por n-glicoses, que podia ser disperso em hidróxido de potássio. Assim, definiram AR como sendo aquele que resiste à dispersão em água fervente e hidrólise pela ação da amilase pancreática e da pululanase. Esta fração era constituída principalmente de amilose retrogradada, que também parecia ser altamente

resistente à digestão (CHAMP; FAISANT, 1996).

A partir de 1992, a definição para AR assumiu um caráter mais relacionado aos seus efeitos fisiológicos, representando “a soma do amido e produtos de sua degradação que não são absorvidos no intestino delgado de indivíduos saudáveis” (CHAMP; FAISANT, 1996; FAISANT et al.1993; GOÑI et al.1995).

Pode-se dizer, então, que o AR é a fração que não fornecerá glicose ao organismo, mas que será fermentada no intestino grosso produzindo gases e principalmente ácidos graxos de cadeia curta. Deste modo, esta fração do amido apresenta comportamento similar ao da fibra alimentar, e tem sido relacionada a efeitos benéficos locais, prioritariamente no intestino grosso (ASP, 1992).

No entanto, existem diferenças entre o AR e as fibras, como o tipo de ligação existente entre as unidades de glicose, que nas fibras dietéticas são do tipo  $\beta$ , nas quais a  $\alpha$ -amilase não pode atuar, enquanto que no AR as ligações são do tipo  $\alpha$ , as quais podem ser hidrolisadas pelas enzimas do trato gastrointestinal. Dessa forma, a digestibilidade do AR refere-se à inacessibilidade física desta fração de amido às enzimas digestivas, e não à sua composição química (VAN DOKKUM, 2008).

Conforme a sua resistência à digestão, o AR é classificado em quatro tipos: o AR1 é o termo usado para designar o amido resistente fisicamente inacessível à digestão, devido à presença de paredes celulares intactas de grãos, sementes ou tubérculos; já o AR2 engloba os grânulos de amido nativos que são protegidos da digestão pela configuração da estrutura do grânulo de amido, e está presente em batatas cruas, bananas verdes e amidos com “alto teor em amilose”. O AR2 é o único que mantém a sua estrutura e resistência, até mesmo durante o processo e preparação de muitos alimentos. O tipo AR3 refere-se ao amido indigerível que se forma após tratamento com água e calor; este é geralmente formado durante a retrogradação dos grânulos de amido, são exemplos as batatas e flocos de milho quando são cozidos, e depois retrogradados, e por último o AR4, um grupo de amidos que foram modificados quimicamente, através de ésteres, fosfatos e éteres, bem como amidos com ligações cruzadas, sendo estes também resistentes à digestão no intestino delgado (NUGENT, 2005).

O principal interesse em relação ao AR envolve seu papel fisiológico, pois o que não é absorvido no intestino delgado torna-se substrato no colón para fermentação por bactérias anaeróbias da microbiota intestinal humana, essa fração compartilha muitas das características e benefícios atribuídos à fibra alimentar e aos prebióticos, por proporcionar benefícios à saúde intestinal, aumentando o volume e maciez do bolo fecal e a regularidade

das evacuações (MUIR; O'DEA, 1992). Os produtos dessa fermentação são os ácidos graxos de cadeia curta, acético, propiônico e butírico (TOPPING; CLIFTON, 2001). Estudos *in vitro* e com animais indicam que o propionato e o butirato, em particular, têm potencial para ajudar a manter a saúde do intestino e reduzir fatores de risco envolvidos no desenvolvimento de inflamação intestinal, colite ulcerativa e câncer colorretal (BROUNS et al. 2002).

Somado aos efeitos acima citados, essa fermentação é benéfica no favorecimento da vasodilatação, aumento da absorção de água e sais, redução da constipação, inibição da síntese de colesterol, melhor controle do diabetes devido ao baixo índice glicêmico e redução nos níveis de colesterol LDL e de triglicérides na hiperlipidemia (FERREIRA, 2003; JENKINS et al. 1998; TOPPING; CLIFTON, 2001; YUE; WARING, 1998).

A incorporação de amidos resistentes a produtos de panificação ou a bebidas contribui tanto para melhorar propriedades tecnológicas como viscosidade e CRA, quanto para os benefícios à saúde (SHARMA et al. 2008). O metabolismo do AR ocorre entre 5 a 7 h após a ingestão, aumentando o tempo de saciedade, melhorando a resposta glicêmica e insulinêmica com efeito importante no controle da síndrome metabólica, responsável por alguns dos maiores problemas de saúde: obesidade, doenças cardiovasculares e diabetes (VAN DOKKUM, 2008).

O consumo médio de AR na Europa e na América Latina ainda é considerado baixo, (3 a 6 g / dia) em relação ao consumo em outros continentes como a Ásia que consome de 8 a 19 g / dia (BEZERRA et al. 2013), no entanto, ao utilizar produtos ricos em AR como a FBV é possível aumentar esse percentual e proporcionar uma melhor qualidade de vida, devido a seus efeitos benéficos.

### 1.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

#### 1.3.1 Antioxidantes

Os antioxidantes são compostos que mesmo em pequenas quantidades são capazes de dificultar ou impedir a oxidação de substratos oxidáveis. Dentre os substratos oxidáveis encontrados em alimentos e tecidos celulares estão os lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e outras moléculas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; YOUNG; WOODSIDE, 2001).

A grande maioria dos frutos e também alguns legumes e grãos contêm antioxidantes naturais que podem sequestrar os radicais livres. Entre as moléculas que têm essa capacidade

estão as vitaminas (carotenos, ácido ascórbico e tocoferóis), fibras, minerais e os compostos fenólicos, como flavonoides (KIM et al. 2007; SAURA-CALIXTO; GOÑI, 2006) e taninos condensados, presentes em banana verde (PEREIRA, 2010).

Os radicais livres caracterizam-se como átomos ou moléculas altamente reativas, que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, sendo este desemparelhamento de elétrons que lhes atribui uma alta reatividade (KOVACIC et al. 2005).

A oxidação faz parte da vida aeróbica e do metabolismo, sendo produzidos naturalmente, principalmente pela respiração. A ingestão de alimentos ricos em compostos antioxidantes naturais está associada com a estabilização dos peróxidos ( $H_2O_2$ ) e os radicais livres gerados no metabolismo. Quando ocorre produção excessiva de radicais livres provenientes de fontes endógenas ou exógenas, há implicações com efeitos negativos na peroxidação de lipídios de membrana, ataque a proteínas de tecidos e membranas, às enzimas, carboidratos e ao DNA (RAMALHO; JORGE, 2006). A ação de radicais livres está também associada ao envelhecimento, além de diversas doenças, como câncer, doenças inflamatórias, diabetes e doenças cardiovasculares (ZIBADI et al. 2007; SERKEDJIEVA, 2010).

Portanto, os antioxidantes naturais são de interesse na indústria de cosméticos, farmacêutica e especialmente nas indústrias alimentícias, uma vez que são utilizados como substitutos de antioxidantes sintéticos (HO et al. 2010), e a ingestão de antioxidantes naturais tem sido associada a uma menor incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (MORAIS et al. 2009).

Os compostos fenólicos são substâncias características de alimentos de origem vegetal e são considerados os antioxidantes de maior consumo. Os grupamentos fenólicos presentes nos alimentos podem ajudar a limitar danos celulares, agindo diretamente sobre as espécies reativas de oxigênio ou estimulando sistemas endógenos de defesa (SCARLBERT; WILLIAMSON, 2000).

Os grupos fenólicos podem aceitar um elétron para formar complexos relativamente estáveis, inibindo reações de oxidação em cadeia de componentes celulares (MOURE et al. 2001; SCARLBERT et al. 2005). Com isso, sua atividade antioxidante está correlacionada com o número e a posição dos grupos hidroxílicos e conjugações. O potencial antioxidante dos polifenóis é descrito como sendo maior do que todos os outros antioxidantes conhecidos como vitamina C, E e carotenoides (CHINA et al. 2011; SCALBERT; WILLIAMSON, 2000).

Além da atividade antioxidante, está associada aos compostos fenólicos, uma ampla gama de atividades biológicas como efeito antibacteriano, antitrombótico, vasodilatador, anti-

inflamatório e anticarcinogênico, mediados por diferentes mecanismos de ação (GIBELLINI et al. 2011; KNEK et al. 2002), além disso também contribuem para o aroma, o sabor e a cor dos alimentos (SAHIDI; NACZK, 2004).

### 1.3.2 Determinação da Atividade Antioxidante

A quantificação da atividade antioxidante é muito importante, porque ela é passível de influência pelo substrato, solvente, pelo método de extração, bem como pelas variáveis tempo e temperatura (LOCATELLI et al. 2009; OLIVEIRA et al. 2009).

Os métodos mais comumente utilizados para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* são os métodos ABTS (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]) e DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), devido a fatores como simplicidade de procedimento, estabilidade e acessibilidade de realização a qualquer laboratório.

Os métodos DPPH e ABTS quantificam compostos diferentes, ou seja, o método ABTS permite avaliar a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica; enquanto que o DPPH só pode ser dissolvido em meio orgânico, por isso a importância de se utilizar mais de um método de determinação.

Para a quantificação dos compostos fenólicos o método mais empregado é o que utiliza o reagente de Folin Ciocalteu, no entanto, este não é um método específico, pois detecta todos os grupos fenólicos presentes no extrato (SOUSA et al. 2007).

Na maioria dos métodos utilizados para analisar a atividade antioxidante de alimentos os resultados são expressos como capacidade antioxidante equivalente Trolox (TEAC – *trolox equivalent antioxidant capacity*). Trolox (6-Hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) é um potente antioxidante hidrossolúvel análogo à vitamina E (KIM et al., 2002).

## 1.4 LEITE FERMENTADO

Os leites fermentados são produtos resultantes do crescimento seletivo de bactérias específicas em leite, estes produtos estão presentes no mundo há milhares de anos e acredita-se que os mesmos tenham surgido na região que atualmente corresponde ao Oriente Médio, decorrente da necessidade de manter a qualidade do leite por mais tempo na ausência de refrigeração (KOSIKOWSKI, 1977).

No começo do século XX, a partir de estudos de Elie Metchnikoff (1845- 1916) – Instituto *Pasteur*, houve uma associação da produção de leites fermentados com o

metabolismo de microrganismos lácticos. A partir disso, ocorreu o isolamento e a caracterização de várias culturas lácticas, assim como maior controle e padronização de processos fermentativos (ROBINSON, 1991). Esse desenvolvimento levou a uma melhor compreensão das relações entre os microrganismos específicos, seus produtos e atividades.

Segundo a legislação brasileira, os leites fermentados são definidos como “produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidos por coagulação e diminuição do pH do leite, ou leite reconstituído, adicionado ou não de produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microrganismos específicos, estes devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade” (BRASIL, 2007).

Os ingredientes obrigatórios para a produção de leites fermentados são o leite e/ou leite reconstituído padronizado em seu conteúdo de gordura e o cultivo de bactérias lácticas específicas ou não. Entre os ingredientes opcionais estão o leite concentrado, creme, manteiga, gordura anidra de leite ou *butter oil*, leite em pó, caseinatos, proteínas lácteas, outros sólidos de origem láctea, soros lácteos, concentrados de soros lácteos, frutas em forma de pedaços, polpa(s), suco(s) e outros preparados à base de frutas, maltodextrinas, além de outras substâncias alimentícias, tais como: mel, coco, cereais, vegetais, frutas secas, chocolate, especiarias, café entre outras (BRASIL, 2007). Adicionalmente, podem ser incorporados açúcares e/ou glicídios (exceto polialcoóis e polissacarídeos); cultivos de bactérias lácticas coadjuvantes e amidos ou amidos modificados em uma proporção máxima de 1 % (m/m) do produto final. A recomendação é de que os ingredientes opcionais não lácteos estejam presentes em uma proporção máxima de 30 % (m/m) do produto final (BRASIL, 2007).

A conversão de lactose em ácido láctico pelas bactérias é a mudança mais significativa que ocorre durante o processo fermentativo do leite, são também produzidos durante a fermentação outros metabólitos, tais como o acetaldeído, acetona, ácido fórmico, diacetil, ácido acético e ácido propiônico que cooperam para o aroma e o sabor característico do leite fermentado (CHANDAN; O'RELL, 2006).

Os leites fermentados têm como principais características de qualidade, a textura, sabor e aroma (POURAHMAD; ASSADI, 2005). Além disso, são altamente nutritivos, e seus principais constituintes sofrem hidrólise parcial durante o processo fermentativo, tornando o produto facilmente digerível, sendo considerado um agente regulador das funções digestivas. Entre as razões para utilizar o processo fermentativo em leites, a principal e mais antiga é aumentar a vida de prateleira, além de melhorar os atributos tecnológicos e produzir derivados (ROBINSON; TAMINE, 2006).

Outras propriedades fisiológicas também estão relacionadas a leites fermentados, como efeitos anticolesterolêmicos; anticarcinogênicos (RODAS et al. 2001); controle da microbiota intestinal; diminuição da população de patógenos pela produção de ácidos acético, láctico e de bacteriocinas ou outros compostos antimicrobianos; alívio da intolerância à lactose; estimulação do sistema imune; alívio da constipação (CAO; FERNANDEZ, 2005; SAAD, 2006); efeitos anti-hipertensivos (SEPP0 et al. 2003); redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori*; controle de colite (SAAD, 2006) entre outros.

A qualidade do leite fermentado pode ser avaliada através da composição química, características microbiológicas e físicas. Geralmente, os parâmetros químicos e microbiológicos são instituídos pela legislação de cada país (CASAROTTI, 2013). Em geral, o leite fermentado deve ser firme, com textura suave, livre de grânulos e sem sinérese sobre a superfície do produto (TAMIME; ROBINSON, 1999), e entre os métodos para avaliar os atributos dos leites fermentados incluem-se os testes sensoriais.

## 1.5 PROBIÓTICOS

Os probióticos são os principais componentes bioativos de produtos lácteos fermentados funcionais, e juntamente com iogurtes, são os mais comercializados, assim, a introdução de microrganismos probióticos continua a crescer e vem de encontro às tecnologias de desenvolvimento de novos produtos que incorporam os benefícios inerentes dos probióticos à saúde do consumidor.

Duas vertentes são consideradas em relação à probióticos, a primeira são os microrganismos probióticos em si efetivamente e a segunda são os microrganismos com efeito probiótico. A primeira diz respeito aos microrganismos que são isolados originalmente do trato gastrointestinal da espécie que irá consumi-lo; e a segunda são os microrganismos que trazem benefício para o hospedeiro ao ser ingerido, porém não pertencem à microbiota intestinal da espécie consumidora (FERREIRA, 2008).

Pesquisas relacionadas a probióticos têm apresentado importantes avanços na indústria de alimentos, sendo que a definição internacional de probióticos refere-se a microrganismos vivos que, quando administrados em quantidade adequada, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/ WHO, 2002). De acordo com Bertazzoni et al (2013) e os ministérios da saúde do Canadá e da Itália (2013; 2009), produtos probióticos devem conter um número mínimo de bactérias viáveis de  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC) por dose por dia de linhagens específicas, entre elas *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*,

*casei, fermentum, gasseri, johnsonii, paracasei, plantarum, rhamnosus* ou *salivarius*.

No Brasil, são considerados microrganismos probióticos as bactérias *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei shirota*, *L. casei* variedade *rhamnosus*, *L. casei* variedade *defensis*, *L. paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. animalis* (incluindo a subespécie *lactis*), *B. longum* e *Enterococcus faecium*. Estes devem conter entre  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  UFC por dose por dia (BRASIL, 2008).

Dentre os microrganismos comumente descritos com características probióticas, destacam-se as bactérias produtoras de ácido láctico, principalmente os gêneros *Lactobacillus* isolados do intestino delgado e *Bifidobacterium*, do intestino grosso, como os mais utilizados em alimentos (O'SULLIVAN, 2006). Estudos tem sugerido que outros constituintes da microbiota humana tem potencial como novos candidatos a probióticos (HILL et al. 2014).

#### 1.5.1 Efeitos Benéficos Associados à Probióticos

De acordo com Smug et al. (2014) o benefício central dos probióticos é a geração de uma microbiota intestinal saudável. Mas, além disso, estudos comprovam que a ingestão dos probióticos auxilia no desenvolvimento de um sistema digestivo e imunológico mais saudável, e entre os efeitos benéficos citam-se melhora nos sintomas da diarreia infecciosa e associada a antibióticos, melhora do trânsito intestinal, melhora dos sintomas da síndrome do intestino irritável, dor abdominal, colite ulcerativa, flatulência (APOENTE et al. 2013; ALFALEH et al. 2011; ALLEN et al. 2010; GOLDENBERG et al. 2013; RITCHIE et al. 2012).

São ainda considerados promissores outros efeitos benéficos com relação ao sistema reprodutivo; associados à saúde da pele; dos pulmões e até mesmo cerebrais, mas as conclusões ainda não foram ligadas a uma gama suficiente de probióticos (HILL et al. 2014). Os microrganismos probióticos são também produtores de substâncias antimicrobianas, como os ácidos orgânicos (acético, láctico, fórmico) e outras (ácidos graxos, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, etanol, diacetil, acetaldeído, D-leucina, enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas, antifúngicos e antibióticos) que são responsáveis pelos efeitos bactericida ou bacteriostático contra espécies patogênicas (CROWLEY et al. 2013; REIS et al. 2012; RYAN et al. 2011).

Em relação aos benefícios presentes nos produtos lácteos fermentados com microrganismos probióticos, estudos associam a ingestão ao menor risco de diabetes tipo 2, perda de peso, redução nos níveis de triglicerídeos e glicose, atenuação da pressão arterial

sistólica quando comparados a indivíduos controle (MOZAFFARIAN et al. 2011; SOEDAMAH-MUTHU et al. 2013; SLUIJS et al. 2012; STRUIJK et al. 2013; TONG et al. 2011), ainda segundo os autores estes fermentados poderiam ser uma recomendação benéfica para a dieta.

### 1.5.2 Mecanismos de Ação

Dado o avanço nas pesquisas com probióticos e seus efeitos na saúde, descobriu-se que alguns mecanismos de ação pertencem a uma ampla gama de linhagens enquanto outros não, assim como alguns mecanismos podem ocorrer em uma única linhagem.

Os mecanismos estão divididos em três classes de efeitos ligados aos probióticos, a primeira engloba linhagens com efeitos considerados raros como neurológicos, imunológicos, endócrinos e de produção de espécies bioativas; a segunda diz respeito aos efeitos frequentes como síntese de vitaminas, antagonismo, reforço de barreira intestinal, metabolismo de sais biliares, atividade enzimática, neutralização de substâncias cancerígenas, e na terceira classe estão aqueles considerados como muito difundidos entre os estudos, que são resistência à colonização por patógenos, produção de ácidos e ácidos graxos de cadeia curta, regulação do trânsito intestinal, aumento de enterócitos e exclusão competitiva de patógenos (HEUVELIN et al. 2009; KUMAR et al. 2013; MACHO FERNANDEZ et al. 2011; REID et al. 2011).

Mas para que possam desempenhar os efeitos benéficos os microrganismos probióticos precisam sobreviver às condições adversas presentes no trato gastrointestinal, tolerando o ácido, os sais biliares e enzimas gástricas e entéricas, para então aderir e colonizar o epitélio intestinal (VINDEROLA et al. 2011).

### 1.5.3. Uso de Probióticos

Como já citado, os principais produtos alimentícios comercializados no mundo contendo culturas probióticas são os leites fermentados e os iogurtes, porém, existe no mercado uma série de produtos comerciais que podem apresentar estas culturas; como sorvetes, diversos tipos de queijos; barras de cereais, creme de leite, fórmulas infantis, entre outros (CRUZ et al. 2009; GRANATO et al. 2010; SINGH et al. 2011).

Atualmente, é bem conhecido o fato de que matrizes alimentares cumprem um papel significativo na proteção aos probióticos durante a passagem pelo trato gastrointestinal bem como na estabilidade durante o período de armazenamento dos alimentos. Logo, ao

desenvolver alimentos probióticos é de extrema importância à seleção de matrizes adequadas para o carregamento de probióticos, para garantir que estes ultrapassem as barreiras físicas e bioquímicas presentes no trato gastrointestinal (MARTINEZ et al. 2011; WANG et al. 2009).

Mundialmente o consumo de alimentos probióticos tem aumentado e, aliado a outros alimentos e ingredientes funcionais, constituem a fatia de mercado que mais cresce na indústria alimentícia (CASAROTTI et al. 2014). Estima-se que na última década foram lançados no mercado mundial cerca de 500 novos produtos probióticos (ASHRAF; SHAH, 2011), movimentando cerca de 20 bilhões de euros (GASPAR et al. 2013).

## 1.6 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS (BAL)

BAL são descritas como microrganismos Gram-positivos, bacilos ou cocos, desprovidos de citocromos, não esporogênicos e catalase negativos. Compõem um grupo bastante heterogêneo quando se refere à capacidade de assimilar oxigênio, podendo ser anaeróbias, anaeróbias facultativas, aeróbias ou microaerófilas. A habilidade de colonizar uma grande variedade de habitats é uma consequência direta da diversidade metabólica deste grupo (GIRAFFA, 2010).

Considerando a temperatura ótima de crescimento, são definidos como mesófilos (20-40 °C) ou termófilos (40-50 °C). Quanto às necessidades nutricionais são consideradas bactérias extremamente exigentes, pois necessitam de nutrientes específicos, como aminoácidos e vitaminas (SALMINEN et al. 2004). Algumas cepas caracterizam-se por apresentar alta tolerância a ácidos. Produzem ácido lático como o principal produto metabólico, sendo, portanto, microrganismos estritamente fermentadores (HOLZAPFEL et al. 2001).

Justifica-se a importância industrial dos lactobacilos, pois o maior grupo de microrganismos utilizados pertence ao gênero *Lactobacillus* (AXELSSON, 2004), são considerados do grupo de LAB os microrganismos dos gêneros *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella* (CROWLEY et al. 2013).

BAL são de significativa importância, pois são utilizadas como culturas iniciadoras na fermentação industrial e artesanal, contribuindo para a conservação, desenvolvimento de sabor, aroma e textura de alimentos fermentados (DE VRIES et al. 2006).

### 1.6.1 *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*)

*L. plantarum* é uma bactéria mesófila com temperatura ótima de crescimento por volta de 30 °C (CROW et al. 2001). É versátil e encontrada em uma variedade de nichos ambientais como produtos lácteos, cárneos e vegetais. Além disso, é frequentemente encontrada como habitante natural do trato gastrointestinal humano (KLEEREBEZEM et al. 2003). Devido a essa versatilidade *L. plantarum* tem sido apontado como um dos microrganismos mais importantes na indústria alimentícia (SABO et al. 2014), relatado como a espécie mais utilizada para fermentar vegetais e frutas (DI CAGNO et al. 2010; 2011), além disso, *L. plantarum* é de grande importância em produtos lácteos, sendo usado como cultura iniciadora na fermentação de alimentos, contribuindo para a conservação, o sabor, aroma e a textura dos fermentados (RUAS-MADIEDO et al. 2002).

*L. plantarum* é uma espécie com fermentação heterofermentativa facultativa (KLEEREBEZEM et al. 2003) e entre as características mais importantes para adaptação a diversos nichos estão a capacidade de fermentar uma ampla gama de carboidratos (BRINGEL et al. 2001) e outras fontes de energia, de metabolizar vários compostos polifenólicos (RODRIGUES et al. 2008) bem como sintetizar compostos antimicrobianos (SURONO, 2008).

Estudos relatam os efeitos benéficos de *L. plantarum* na melhora da microbiota e na função intestinal (ANDERSON et al. 2010), nos sintomas da síndrome do intestino irritável (SABO et al. 2014); na proteção do DNA contra oxidação, e os produtos que os contém podem ser considerados como alimentos funcionais para as pessoas com doenças ligadas ao estresse oxidativo (XIAO et al. 2015), produção de bacteriocinas para inibir os patógenos (SURONO, 2008), atividade antioxidante (ELFAHRI et al. 2014), produção de peptídeos anti-hipertensivos (SHU et al. 2015).

### 1.6.2 *Lactobacillus helveticus* (*L. helveticus*)

*L. helveticus* é uma bactéria termófila com crescimento ótimo entre 40-45 °C podendo crescer entre 50-52 °C, não se desenvolvendo bem em temperaturas inferiores a 15 °C (FURTADO, 1990). É de grande interesse na área de laticínios, destacando-se pela produção de ácido lático, atividade lipolítica e proteolítica, usado principalmente na produção de leites fermentados e queijos tipo suíço, parmesão ou queijos curados, utilizado para melhorar o sabor, diminuir o amargor, produzir compostos aromáticos e peptídeos bioativos (GATTI et

al. 2004; SADAT-MEKMENE et al. 2011; VINDEROLA et al. 2007).

Este microrganismo utiliza a via glicolítica ou Embden Meyerhof-Parnas para fermentar a lactose, sendo a redução do ácido pirúvico a ácido láctico catalisada pela enzima lactato desidrogenase, por via homofermentativa e com forte produção de ácido láctico (ARNAUD; GUIRAUD, 1985). Torriani et al. (1994) consideram que esses microrganismos produzem ácido láctico em concentrações maiores que 2 %, no entanto há diferenças na capacidade de acidificação em diferentes linhagens de *L. helveticus*, e essa característica pode ser utilizada para seleção de culturas para perfis biotecnológicos de interesse (FORTINA et al. 1998).

*L. helveticus* precisa de aminoácidos livres e peptídeos de baixo peso molecular para o crescimento, no entanto o leite não os contém em quantidade suficiente, assim a fim de hidrolisar as proteínas do leite para obter peptídeos e aminoácidos o *L. helveticus* possui um sistema ativo de proteases (LEBOS et al. 2012) para assegurar suas necessidades nutricionais.

Além da alta atividade proteolítica característica do *L. helveticus*, estudos relatam atividade antioxidante (AHIRE et al. 2013), produção de peptídeos anti-hipertensivos (ELFAHRI et al. 2014), proteção do DNA plasmidial contra oxidações (LI et al. 2014), produção de EPS (MENDE et al. 2016) que entre outras funcionalidades em fermentados melhoram os aspectos tecnológicos de viscosidade e CRA.

### 1.6.3 Sistema Proteolítico

BAL possuem um eficiente sistema proteolítico para reduzir grandes subunidades de caseína em oligopeptídeos ou pequenas cadeias de aminoácidos e assim obter os aminoácidos necessários para o crescimento em leite, contudo, o grau de proteólise é dependente da linhagem, bem como, das condições físicas em que ocorre o processo fermentativo.

A degradação da caseína é iniciada por uma proteinase do envelope celular (CEP) e em seguida os peptídeos são hidrolisados por uma grande variedade de peptidases a pequenos peptídeos e aminoácidos essenciais, ressaltando que as peptidases encontram-se dentro da célula e são altamente específicas (TJWANTAN et al. 1993).

A maioria das BAL possuem apenas uma CEP, mas em *L. helveticus* foram descritas ao menos duas: PrtH e PrtH2 (GILBERT et al. 1997; JULLIARD et al. 1995). Além disso, a existência de diversos genes constituindo o seu sistema hidrolítico pode explicar a alta eficiência proteolítica em relação às outras espécies (GENAY et al. 2009; GRIFFITHS; TELLEZ, 2013; WAKAI; YAMAMOTO, 2012).

Como já citado, a principal fonte de aminoácidos e peptídeos produzidos por LAB são derivados da caseína, a proteína mais abundante no leite (MEISEL; BOCKELMANN, 1999), sabe-se que o leite contém 32 g / L de proteínas, destas, 80 % são caseínas ( $\alpha$ -s1,  $\alpha$ -s2,  $\kappa$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$ ) e 20 % compõem as proteínas do soro ( $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina). Um grande e crescente número de peptídeos bioativos tem sido identificado a partir da hidrólise de proteínas de leite em produtos lácteos fermentados (CLARE et al. 2003; KORHONEN; PIHLANTO, 2006; SILVA; MALCATA, 2005;).

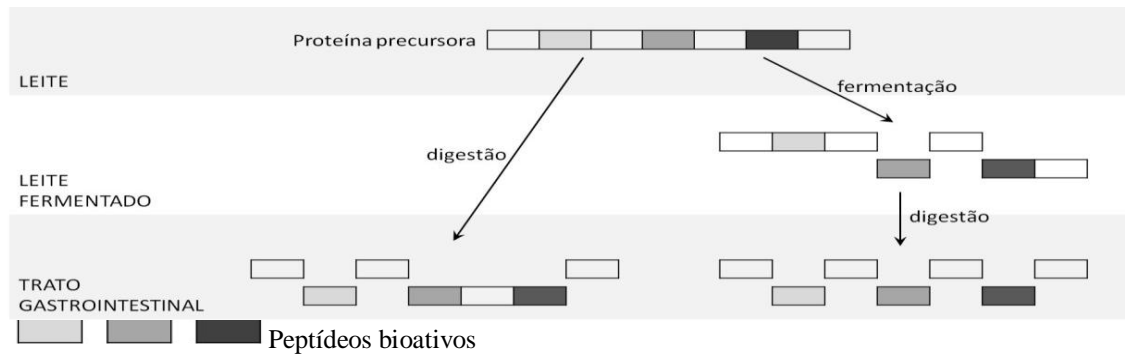
As proteínas de leite são utilizadas como matéria-prima para a obtenção de peptídeos bioativos por serem consideradas como uma fonte segura e de baixo custo (GRIFFITHS; TELLEZ, 2013). Diversos estudos tem relatado a capacidade de linhagens proteolíticas de *L. helveticus* e *L. plantarum* de produzir peptídeos anti-hipertensivos a partir da hidrólise das proteínas de leite (ELFAHRI et al. 2014; GONZALEZ-GONZALEZ et al. 2011; SHU et al. 2015), e em muitos deles a atividade proteolítica de *L. helveticus* é mais elevada em relação a outros lactobacilos (BEGANOVIC' et al. 2013; ELFAHRI et al. 2014; PIHLANTO et al. 2010).

### 1.7. PEPTÍDEOS BIOATIVOS

O leite já é conhecido e estudado por suas respeitáveis funções nutricionais que contribuem em diversas atividades do organismo, mas muito além disso, por apresentar constituintes importantes, destacando-se as proteínas que além do papel fisiológico, apresentam propriedades bioativas (KORHONEN et al. 2002; MEISEL et al. 1998).

Os peptídeos bioativos são fragmentos de proteínas específicas, com efeito positivo nas funções do organismo (KITTS; WEILER, 2003). Geralmente, estes fragmentos apresentam entre 2 a 20 resíduos de aminoácidos e por vezes apresentam atividade biológica multifuncional (KORHONEN, 2009; MOLLER et al. 2008).

Os peptídeos são inativos quando presentes na proteína de origem, e a liberação destes pode ocorrer basicamente através de três maneiras: hidrólise enzimática com enzimas digestivas, processos fermentativos no leite com bactérias proteolíticas e pela ação de enzimas derivadas de bactérias ou vegetais (BARÓ et al. 2001; KORHONEN et al. 2002; 2003). A combinação de duas fontes de hidrólise proteica (digestão e fermentação) potencializa a liberação de um maior número de peptídeos bioativos (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema da liberação de peptídeos bioativos e possíveis diferenças entre a fragmentação da proteína através de fermentação e/ou digestão gastrointestinal. Adaptado de Moller et al. (2008).

Entre as fontes de proteínas precursoras de peptídeos bioativos, o leite é considerado uma das melhores, embora estes também possam ser obtidos a partir de outras fontes como ovos, milho, soja, arroz, alguns peixes, entre outros (MOLLER et al. 2008).

Os peptídeos bioativos quando liberados no intestino, poderão atuar localmente ou passar através das paredes do intestino para a circulação sanguínea, atingindo um órgão alvo, com subsequente regulação de condições fisiológicas por meio dos sistemas nervoso, imunitário, vascular ou endócrino (KORHONEN; PIHLANTO, 2006; PIHLANTO-LEPPÄLÄ et al. 1998). Entre as propriedades biológicas e efeitos fisiológicos de responsabilidade dos peptídeos, destacam-se as antitrombóticas, anti-hipertensivas, antioxidantes, imunomoduladoras, antibacterianas, anti-gástricas, opióides, carreadora de minerais e de diminuição do colesterol (KORHONEN, 2009; SILVA; MALCATA, 2005; PINA; ROQUE, 2009).

Um dos procedimentos mais importantes em relação à determinação do potencial bioativo dos peptídeos formados em leites fermentados é o estudo da extensão da proteólise, e entre as metodologias tem-se a determinação com *o*-ftaldialdeído (OPA). A determinação com OPA é uma técnica que está baseada na quantificação dos grupos  $\alpha$ -amino livres, onde o OPA reage com os grupos  $\alpha$ -amino que têm elevada absorvância no comprimento de onda de 340nm. Em termos práticos, a determinação da extensão da proteólise com OPA dá uma quantificação relativa da concentração dos peptídeos e aminoácidos, que pode ou não ser estimada com recurso de uma curva padrão (PIHLANTO et al. 2010; QUIRÓS et al. 2007).

### 1.7.1 Atividade Anti-hipertensiva

Os peptídeos com propriedade anti-hipertensiva têm sido os mais estudados entre todos os peptídeos derivados do leite, isto dada a importância da hipertensão como um dos

principais fatores de risco em doenças cardiovasculares. A hipertensão é um dos maiores problemas de saúde pública e afeta mais de 30 % da população adulta em diversos países do ocidente, sendo que mais de 50 % dos indivíduos portadores desconhece seu quadro (MEDEIROS, 2010).

A hipertensão é acompanhada por alterações funcionais do sistema nervoso central simpático, sistema renal, sistema renina-angiotensina (SRA) além de outros mecanismos e disfunção arterial. A regulação da pressão arterial é parcialmente dependente do SRA. A renina atua no angiotensinogênio que liberta a angiotensina I que é convertida posteriormente a angiotensina II, um potente vasoconstritor, pela ação da enzima conversora de angiotensina (ACE). A angiotensina II ao inativar um vasodilatador, aumenta a produção de aldosterona que, por sua vez aumentará a retenção de água. Quando ocorre a inibição de ACE, a formação de angiotensina II é reduzida e a vasoconstrição arterial é menor, baixando assim, a tensão arterial.

Além do desenvolvimento da hipertensão arterial o funcionamento inadequado do SRA contribui de forma significativa para o desenvolvimento de outras patologias cardiovasculares e renais (CARUSO-NEVES et al. 2001; CHEUNG et al. 1980; FEITOSA, 2001; GUY et al. 2005; HATA et al. 1996; SPYROULIAS et al. 2003; WARNER et al. 2004).

Diante disso, com os peptídeos anti-hipertensivos espera-se atenuar os problemas de saúde ao encontrar um agente hipotensivo natural que não provoque os efeitos colaterais notados com o uso de medicamentos, como inibidores de ACE, que causam aumento dos níveis de potássio, redução da função renal, tosse, entre outros efeitos (CHEN et al. 2009; IRVIN et al. 1986; MICHAELIDOU, 2008).

A enzima conversora de angiotensina (ACE) é uma enzima multifuncional que atua como um dos principais reguladores da pressão arterial. Assim, a inibição da ACE é atualmente considerada como um das melhores estratégias para o tratamento da hipertensão (HERNANDEZ-LEDESMA et al. 2014).

A ação inibitória da ACE por peptídeos depende principalmente da especificidade estrutural de cada um, sendo que na maioria dos casos as sequências formadas por tripeptídeos são mais potentes que as de dipeptídeos, atuando ambos como substratos competitivos para a ACE (HONG et al. 2008). Estes substratos inibidores possuem a capacidade de adentrar na molécula de ACE interagir com o centro ativo e impedir a ligação com a angiotensina I, diminuindo assim o número de substratos disponíveis sobre os quais a enzima pode atuar (WU; DING, 2002).

Entre as espécies de microrganismos a que tem mais estudos relacionados à produção de peptídeos anti-hipertensivos está *L. helveticus* e a partir desta, foram obtidos os peptídeos bioativos mais conhecidos e comercializados sob a forma de leites fermentados (KORHONEN; PIHLANTO, 2006). São eles o Ameal S<sup>TM</sup>, fermentado com *Saccharomyces cerevisiae* em conjunto com *L. helveticus* CM4, desenvolvido pela Companhia Calpes, no Japão e o Evolus<sup>TM</sup>, fermentado com diferentes linhagens de *L. helveticus* LBK16H, desenvolvido pela Valio, na Finlândia, ambos possuem propriedades hipotensoras, e contêm os tripeptídeos IPP (Isoleucina-Prolina-Prolina) e VPP (Valina-Prolina-Prolina) (HATA et al. 1996; MIZUSHIMA et al. 2004; SEPPO et al. 2002; 2003; TUOMILETHO et al. 2004;).

Diversos estudos clínicos têm sido realizados com os tripeptídeos bioativos IPP e VPP e relata-se que estes peptídeos bioativos são mais estáveis no organismo do que outros peptídeos lácteos, por seu tamanho e estrutura e, portanto, podem ser absorvidos pelo organismo sem que sejam previamente decompostos pelas enzimas digestivas, mantendo-se estáveis no sangue e sob condições de simulação gastrointestinal (KITTS et al. 2003; MIZUNO et al. 2004; SEPPO et al. 2003).

Portanto, os produtos contendo peptídeos resultantes da hidrólise proteica de diversos alimentos representam uma alternativa natural, de baixo custo e segura para o consumidor levando em consideração o elevado valor dos medicamentos sintéticos que são comercializados (GUANG; PHILLIPS, 2009).

## 1.8 REFERÊNCIAS

AGIL, R.; GAGET, A.; GLIWA, J.; AVIS, T. J.; WILLMORE, W. G.; HOSSEINIAN, F. Lentils enhance probiotic growth in yogurt and provide added benefit of antioxidant protection. *LWT - Food Science and Technology*, v. 50, p. 45-49, 2013.

AHIRE, J. J, MOKASHE N. U, PATIL H. J, CHAUDHARI B. L. Antioxidative potential of folate producing probiotic *Lactobacillus helveticus* CD6. *Journal of Food Science and Technology*, v. 50, p. 26-34, 2013.

ALMEIDA, J. A. R. *Desidratação osmótica de banana (Musa spp.): cinética de desidratação e avaliação de compostos bioativos*. 2011. 51f. Dissertação (Mestrado em produção vegetal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2011.

ALFALEH, K.; ANABREES, J.; BASSLER, D.; AL-KHARFI, T. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v.16, 2011.

ALLEN, S. J.; MARTINEZ, E. G.; GREGORIO, G. V.; DANS, L. F. Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 11, 2010.

ANJO, D.L.C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *Jornal Vascular Brasileiro*, v.3, p. 145-154, 2004.

ANDERSON, R. C.; COOKSON, A. L.; MCNABB, W. C.; KELLY, W. J.; ROY, N. C. *Lactobacillus plantarum* DSM 2648 is a potential probiotic that enhances intestinal barrier function. *FEMS Microbiology Letters*, v. 309, p.184-192, 2010.

APONTE, G. B.; MANCILLA, C. A. B.; PARIASCA, N. Y. C.; GALARZA, R. A. R. Probiotics for treating persistent diarrhoea in children. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 8, 2013.

ASHRAF, R.; SHAH, N. P. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt--a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 149, n. 3, p. 194-208, 2011.

ARNAUD, A.; GIRAUD, J. P. Bioquímica microbiana. In: SCRIBAN, R. *Biotecnologia*. São Paulo: Mande, p. 47-102, 1985.

ASMAR, S. A.; CASTRO, E.M.; PASQUAL, M.; PEREIRA, F.J.; SOARES, J.D.R. Changes in leaf anatomy and photosynthesis of micropropagated banana plantlets under silicon sources. *Scientia Horticulturae*, v. 161, p. 328-332, 2013.

ASP, N. G. Resistant starch Proceedings from the second plenary meeting of EURESTA: European FLAIR Concerted Action n° 11 on physiological implications of the consumption of resistant starch in man. *European Journal of Clinical Nutrition*, v.46, 1992.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, Wright A, Ouwehand A. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3. ed. New York: Marcel Dekker; p.1- 66, 2004.

BARÓ, L.; JIMÉNEZ, J.; MARTÍNEZ-FÉREZ, A.; BOUZA J. J. Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. *Ars Pharmaceutica*, v. 42; p. 135-145, 2001.

BEGANOVIC, J.; KOS, B.; PAVUNC, A.L.; UROIC, K.; DZIDARA, P.; SUSKOVIC, J. Proteolytic activity of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Anaerobe*, v. 20, p. 58-64, 2013.

BERTAZZONI, E.; DONELLI, G.; MIDTVEDT, T.; NICOLI, J.; SANZ, Y. Probiotics and clinical effects: is the number what counts? *Journal of Chemother*, v. 25, p. 193–212, 2013.

BEZERRA C. V; RODRIGUES, A. M. da. C.; AMANTE, E. R.; SILVA, L. H. M. da.. Green banana (*Musa cavendishii*) flour obtained in spouted bed – Effect of drying on physicochemical, functional and morphological characteristics of the starch. *Industrial Crops and Products*, v.41, p.241-249, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa Nº 46. *Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados*. Brasília, 2007. Diário Oficial da União de 24/10/2007, Seção 1, Página 5.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos - *Lista de alegações de propriedade funcional*. Março, 2016. <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 13/06/2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos - IX *Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas*. Julho, 2008. <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 13/08/2016.

BRINGEL, F.; QUÉNÉE, P.; TAILLIEZ, P. Polyphasic Investigation of the Diversity within *Lactobacillus plantarum* Related Strains Revealed Two *L. plantarum* subgroups. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 24, p. 561-571, 2001.

BROUNS, F.; KETTLITZ, B.; ARRIGONI, E. Resistant starch and the butyrate revolution. *Food Science Technology*, v.13, p.251-261, 2002.

CAO, Y. C.; FERNÁNDEZ, A. F. Probióticos y reflexión necesaria. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, v. 21, p.3-4, 2005.

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

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

CASAROTTI, S. N.; PAULA, A. T.; G., C. M.; CARVALHO, C. C. P.; PENNA, A. L. B. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 in the presence of *Williopsis saturnus* var. *suaveolens*. *Journal of Food Science and Engineering*, v. 3, n. 4, p. 176-186, 2013.

CARVALHO, R. V. *Formulações de snacks de terceira geração por extrusão: caracterização textuométrica e microestrutural*. 2000. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

CARUSO-NEVES, C.; RANGEL, L. B. A.; LARA, L. S.; LOPES, A. G. Regulation of the renal proximal tubule second sodium pump by angiotensins. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 34, p. 1079-1084, 2001.

COZZOLINO, S. M. F. *Biodisponibilidade de nutrientes*. Barueri, São Paulo: Manole, 2005, 878 p.

CHANDAN, R. C.; O'RELL, K. R. Principles of yogurt processing. In: CHANDAN, R. C. *Manufacturing yogurt and fermented milks*. Iowa: Blackwell Publishing, 2006. p. 195-209.

CHAMP, M.; FAISANT, N. Resistant starch: analytical and physiological aspects. *Boletim da Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.30, p.37-43, 1996.

CHEN, Z. Y.; PENG, C.; JIAO, R.; WONG, Y. M.; YANG, N.; HUANG, Y. Anti-hypertensive nutraceuticals and functional foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, p. 4485-4499, 2009.

CHEUNG, H. S.; WANG F. L.; ONDETTI M. A.; SABO E. F.; CUSHMAN D. W. Binding of peptide substrates and inhibitors of Angiotensin-converting enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, v. 255, p. 401-407, 1980.

CHINA, R.; DUTTA, S.; SEN, S.; CHAKRABARTI, R.; BHOWMIK, D.; GHOSH, S.; et al. *In vitro* Antioxidant Activity of Different Cultivars of Banana Flower (*Musa paradisiacus* L.) Extracts Available in India. *Journal of Food Science*, v. 76, p. 1292-1299, 2011.

CLARE, D. A.; CATIGNANI, G. L.; SWAISGOOD, H. E. Biodefence properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides. *Current Pharmaceutical Design*, v. 9, p. 1239–1255, 2003.

CROW, V.; CURRY, B.; HAYES, M. The ecology of non starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjunct in New Zealand Cheddar. *International Dairy Journal*, v. 11, p. 275-283, 2001.

CROWLEY, S.; MAHONY, J.; SINDEREN, D. van. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, v. 33, p. 93–109, 2013.

CROWE, K. M.; FRANCIS, C. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Functional Foods. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, v. 113, p. 1096–1103, 2013.

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

DI CAGNO, R.; MINERVINI, G.; RIZZELLO, C. G.; ANGELIS, M. de.; GOBBETTI, M. Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiology*, v. 28, p. 1062–1071, 2011.

DI CAGNO, R.; MAZZACANE, F.; RIZZELLO, C. G.; ANGELIS, M. de.; MELONI, M.; SERVI, B. de. Synthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM19463: functional grape must beverage and dermatological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 86, p 731-741, 2010.

DE VRIES, M. C.; VAUGHAN, E. E.; KLEEREBEZEM, M.; DE VOS, W.M. *Lactobacillus plantarum* – survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 1018-1028, 2006.

ELFAHRI, K. R.; DONKOR, O. N.; VASILJEVIC, T. Potential of novel *Lactobacillus helveticus* strains and their cell wall bound proteases to release physiologically active peptides from milk proteins. *International Dairy Journal*, v. 38, p. 37-46, 2014.

EMPRABA. Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária. *Banana*. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia40/AGO1/Abertura.html>. Acesso em 07. maio. 2016.

ENGLYST, H. N.; KIGMAN, S. M.; CUMMINGS, J. H. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal Clinical Nutrition*, v. 46, p. 33-50, 1992.

ENGLYST, H.N.; WIGGINS, H. S.; CUMMINGS, J. H. Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst*, v. 107, p. 307-318, 1982.

ESPIRITO SANTO, A. P.; CARTOLANO, N. S.; SILVA, T. F.; SOARES, F. A.; GIOIELLI, L. A.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, M. N. Fibers from fruit by-products enhance probiotic viability and fatty acid profile and increase CLA content in yoghurts. *International Journal of Food Microbiology*, v. 154, p. 135-144, 2012.

FAISANT, N.; CHAMP, M.; COLONA, P.; BULÉON, A. Structural discrepancies in resistant starch obtained *in vivo* in humans and *in vitro*. *Carbohydrate Polymers*, v.21, p. 205-209, 1993.

FASOLIN, L. H.; ALMEIDA, G. C. de.; CASTANHO, P. S.; NETTO-OLIVEIRA, E. R. Biscoitos produzidos com farinha de banana verde: avaliações química, física e sensorial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, p. 524-529, 2007

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, 2002.

FAOSTAT, 2013. On-Line Statistical Database of the Food and Agricultural Organization of the United Nations. Disponível em <http://faostat.fao.org>. Acesso em 11, Junho 2016.

FEITOSA, G. S. O. Comportamento do sistema renina-angiotensina na insuficiência cardíaca congestiva. *Revista Brasileira de Ortopedia*, v. 8, p. 425-430, 2001.

FERREIRA, C. L. L. F. Microrganismos probióticos e de ação probiótica. *Leite & Derivados*, v. 17, p. 17-21, 2008.

FORTINA, M. G.; NICASTRO, G.; CARMINATI, D.; NEVIANI, E.; MANACHINI, P. L. *Lactobacillus helveticus* heterogeneity in natural cheese starters: the diversity in phenotypic characteristics. *Journal of Applied Microbiology*, v. 84, p. 72-80, 1998.

FURTADO, M. M. *Isolamento de bactérias lácticas de leite cru e soro de queijo de leite cru da região do Serro*, Minas Gerais. 1990. 95p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1990.

GASPAR, P.; CARVALHO, A. L.; VINGA, S.; SANTOS, H.; NEVES, A. R. From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*, v. 31, p. 764-788, 2013.

GATTI, M.; TRIVISANO, C.; FABRIZI, E.; NEVIANI, E.; GARDINI, F. Biodiversity among *Lactobacillus helveticus* strains isolated from different natural whey starter cultures as revealed by classification trees. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, p. 182–190, 2004.

GENAY, M.; SADAT, L.; GAGNAIRE, V.; LORTAL, S. prtH2, not prtH, is the ubiquitous cell wall proteinase gene in *Lactobacillus helveticus*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 75, p. 38-49, 2009.

GIBELLINI, L.; PINTI, M.; NASI, M.; MONTAGNA, J. P.; BIASI, S. de.; ROAT, E. Quercetin and Cancer Chemoprevention. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2011, p. 1-5, 2011.

GILBERT, C.; BLANC, B.; FROT-COUTAZ, J.; PORTALIER, R.; ATLAN, D. Comparison of cell surface proteinase activities within the *Lactobacillus* genus. *Journal of Dairy Research*, v. 64, p. 561–571, 1997.

GIRAFFA, G.; CHANISHVILI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*, v. 161, p. 480–487, 2010.

GOLDENBERG, J. Z.; MA, S. S.; SAXTON, J. D.; MARTZEN, M. R.; VANDVIK, P. O.; THORLUND, K.; et al. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v 31, 2013.

GOÑI, I.; GARCIA-ALONSO, A.; GARCIA, D. Almidon resistant component indigestible de la dieta alimentaria. *Alimentaria*, v. 261, p. 31-33, 1995.

GONZALEZ-GONZALEZ, C.R., TUOHY, K.M. JAUREGI, P. Production of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with probiotic strains: Effects of calcium, pH and peptides on the ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, v. 21, p. 615-622, 2011.

GUANG, C.; PHILLIPS, R. D. Plant food-derived Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 24, p. 5113-20, 2009.

GUERGOLETTI, K.B; MAGNANI, M; MARTIN, J. SAN; ANDRADE, C. G. T. DE JESUS; GARCIA, S. Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 11, p. 415–421, 2010.

GUY, J. L.; LAMBERT, D. W.; WARNER, F. J.; HOOPER, A. J.; TURNER, A. J. Membrane associated zinc peptidases families: comparing ACE and ACE2. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1751, p. 2-8, 2005.

GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. D. A. F.; SHAH, N. P. Probiotic dairy products as functional foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 9, p. 455-470, 2010.

GRANT, L. A., DOEHLERT, D. C., MCMULLEN, M. S., VIGNAUX, N. Spaghetti cooking quality of waxy and non-waxy durum wheats and blends. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.84, p.190-196, 2004.

GRIFFITHS, M. W., TELLEZ, A. M. *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system. *Frontiers in Microbiology*, v. 4, p. 30-39, 2013.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, p. 268-340, 2007.

HATA, Y.; YAMAMOTO, M.; OHNI, M.; NAKAJIMA, K.; NAKAMURA, Y.; TAKANO, T. A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 64, p. 767-771, 1996.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; GARCÍA-NEBOT, M. J.; FERNÁNDEZ-TOMÉ, S.; AMIGO, L.; RECIO, I. Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits, *International Dairy Journal*, v. 38, p. 82–100, 2014.

HEUVELIN, E.; LEBRETON, C.; GRANGETTE, C.; POT, B.; BENSUSSAN, N.; HEYMAN, M. Mechanisms involved in alleviation of intestinal inflammation by *Bifidobacterium breve* soluble factors. *Plos One*, v.4, 2009.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews -Gastroenterology & Hepatology Advance*, v.11, p. 506-514, 2014.

HO, C.; RAFI, M. M.; GHAI, G. Substâncias Bioativas: Nutracêuticas e Tóxicas. In: Damodaran, S.; Parkin, K.L.; FENNEMA, O. R. *Química de Alimentos de Fennema*, 4.ed., Porto Alegre: Artimed, 2010, 900 p.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 73, p. 365-373, 2001.

HONG, F.; MING, L.; YI, S.; ZHANXIA, L.; YONGQUAN, W. The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs? *Peptides*, v. 29, p. 1062–107, 2008.

HUNG, P. V.; CHAM, N. T. M.; TRUC, P. T. T. Characterization of Vietnamese banana starch and its resistant starch improvement. *International Food Research Journal*, v. 20, p. 205-211, 2013.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) *Levantamento. Sistemático da Produção Agrícola*, v. 29, p.1-79, 2016.

IZIDORO, D. R.; SCHEER, A. P.; NEGRE, M. F. de. O.; WINDSON, C.; HAMINIUK, I.; SIERAKOWSKI, M. R. Avaliação físico-química, colorimétrica e aceitação sensorial de emulsão estabilizada com polpa de banana verde. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 67, p. 167-176, 2008.

- IZIDORO, D. R. *Influência da polpa de banana (musa cavendishii) verde no comportamento reológico, sensorial e físico-químico de emulsão*. 2007. 133f. Dissertação (Mestrado em tecnologia de alimentos) – Setor de tecnologia, Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- JENKINS, D. J.; VUKSAN, V.; KENDALL, C. W. C.; WÜRSCH, P.; JEFFCOAT, R.; WARING, S. Physiological effects of resistant starches on fecal bulk, short chain fatty acids, blood lipids and glycemic index. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 17, p. 609-616, 1998.
- JUILLARD, V.; DOMINIQUE, L.; KUNJI, E.; KONINGS, W.; GRPON, J. C.; RICHARD, J. Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during Growth in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p. 3024–3030, 1995.
- KIM, D. O.; LEE, K.W.; LEE, H.J.; LEE, C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 3713-3717, 2002.
- KIM, Y. N.; GIRAUD, D. W.; DRISKELL, J. A. Tocopherol and carotenoid contents of selected Korean fruits and vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 20, p. 458- 465, 2007.
- KITTS, D. D.; WEILER, K. Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery. *Current Pharmaceutical Design*, v.9, p. 1309-1323, 2003.
- KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, v. 1, p. 177–187, 2009.
- KORHONEN, H., PIHLANTO, A. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, v, 16, p. 945–960, 2006.
- KORHONEN, H.; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.: Food-derived bioactive peptides – Opportunities for designing future foods, *Current Pharmaceutical Design*, v. 9, p. 1297-1308, 2003.
- KORHONEN, H.; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Formation of bioactive peptides from milk proteins through fermentation by dairy starters. In Lee, T.C.; Ho, C.T. *Bioactive Compounds in Foods. Effects of Processing and storage*. ACS Symposium Series, v. 816, p. 173-186, 2002.
- KOSIKOWSKI, F. V. *Cheese and fermented milk foods*. 2. ed. Ann Harbor; Edwards, 1977, 711p.
- KOVACIC, P.; POZOS, R.S.; SOMANATHAN, R.; SHANGARI, N.; O'BRIEN, P.J. Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. *Current Medicinal Chemistry*, v. 12, p. 2601-2623, 2005.

- KUMAR, M.; NAGPAL, R.; VERMA, V.; KUMAR, A.; KAUR, N.; HEMALATHA, R.; et al. Probiotic metabolites as epigenetic targets in the prevention of colon cancer. *Nutrition Reviews*, v. 71, p. 23–34, 2013.
- KNEKT, P.; KUMPULAINEN, J.; JÄRVINEN, R.; RISSANEN, H.; HELIÖVAARA, M.; REUNANEN, A.; et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.76, p.560-568, 2002.
- KLEEREBEZEM, M.; BOEKHORST, J.; van KRANENBURG, R.; MOLENAAR, D.; KUIPERS, O.P.; LEER, R. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, p. 1990- 1995, 2003.
- RYAN, L.A.M.; ZANNINI, E.; BELLO, F. dal.; PAWLOWSKA, A.; KOEHLER, P.; ARENDT, E.K. *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products. *International Journal of Food Microbiology*, v. 146, p. 276-283, 2011.
- LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. *Carboidratos en alimentos regionales Iberoamericanos*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2006. 648p
- LI, W.; JI, J.; RUI, X.; YU, J.; TANG, W.; CHEN, X. Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and its functional characteristics in vitro. *LWT - Food Science and Technology*, v. 59, p. 732- 739, 2014.
- LOBO, A. R.; SILVA, G. M. L. Amido resistente e suas propriedades físico- químicas. *Revista de Nutrição*, v. 16, p. 219-226, 2003.
- LOCATELLI, M.; GINDRO, R.; TRAVAGLIA, F.; COISSON, J. D.; RINALDI, M.; ARLORIO, M. Study of the DPPH scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chemistry*, v. 114, p. 889-897, 2009.
- MACHO, F. E.; VALENTI, V.; ROCKEL, C.; HERMANN, C.; POT, B.; BONECA, I.G.; et al. Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Journal of the British Society of Gastroenterology*, v. 60, p. 1050–1059, 2011.
- MARAGKOUidakis, P. A.; MIARIS, C.; ROJEZ, P.; MANALIS, N.; MAGKANARI, F.; KALANTZOPOULOS, G.; et al. Production of traditional Greek yoghurt using *Lactobacillus* strains with probiotic potential as starter adjuncts. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 52-60, 2006.
- MARTINEZ, R. C. R.; AYNAOU, A. E.; ALBRECHT, S.; SCHOLS, H. A, de.; MARTINIS, E. C. P.; ZOETENDAL, E. G.; et al. *In vitro* evaluation of gastrointestinal survival of *Lactobacillus amylovorus* DSM 16698 alone and combined with galactooligosaccharides, milk and/or *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12. *International Journal of Food Microbiology*, v. 149, p. 152-158, 2011.
- MEDEIROS, V. R. *Investigação de enzimas proteolíticas na produção de um leite mais digerível impacto do leite modificado na hipertensão arterial*. 210. 111f. Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia. Universidade dos Açores. Ponta Delgada, 2010.

MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Biofunctional Peptides from Milk Proteins: Mineral Binding and Cytomodulatory Effects. *Current Pharmaceutical Design*, v. 9, p. 1289-1295, 2003.

MEISEL H., BOCKELMANN W. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antoine Van Leeuwenhoek*, v. 76, p. 207–315, 1999.

MENDE, S., ROHM, H., JAROS, D. Influence of exopolysaccharides on the structure, texture, stability and sensory properties of yoghurt and related products. *International Dairy Journal*, v. 52, p. 57-71, 2016.

MICHAELIDOU, A. M. Factors influencing nutritional and health profile of milk and milk products. *Small Ruminant Research*, v. 79, p. 42–50, 2008.

MIZUNO, T.; KUROTANI, T.; KOMATSU, Y.; KAWANOKUCHI, J.; KATO, H.; MITSUMA, N.; SUZUMURA, A. Neuroprotective role of phosphodiesterase inhibitor ibudilast on neuronal cell death induced by activated microglia. *Neuropharmacology*, v. 46, p. 404-11, 2004.

MIZUSHIMA, S.; OHSHIGE, K.; WATANABE, J.; KIMURA, M.; KADOWAKI, T.; NAKAMURA, Y.; et al. Randomized controlled trial of sour milk on blood pressure in borderline hypertensive men. *American Journal of Hypertension*, v. 17, p. 701–706, 2004.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; et al. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, v. 72, p. 145-171, 2001.

MOLLER, N. P.; SCHOLZ-AHRENS, K. E.; ROOS, N.; SCHREZENMEIR, J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, v. 47, p. 171-182, 2008.

MORAIS, S. M. de.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 19, p. 315-320, 2009.

MOZAFFARIAN, D.; HAO, T.; RIMM, E. B.; WILLETT, W. C.; HU, F. B. Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men. *New England Journal of Medicine*, v. 364, p. 2392–2404, 2011.

MUIR, J. G.; O' DEA, K. Measurement of resistant starch: factors affecting the amount of starch escaping digestion *in vitro*. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 56, p. 123-127, 1992.

NUGENT A. Health Properties of Resistant Starch. *Nutrition Bulletin*, v. 30, p. 27-54, 2005.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, v. 32, p. 689-702, 2009.

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

O'SULLIVAN, D. J. Primary Sources of Probiotic Cultures. In: *Probiotics in food safety and human health*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006, 468p.

PATTANI, R.; PALDA, V.A.; HWANG, S.; SHAH, W. S. Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infection among hospitalized patients: systematic review and meta-analysis. *Open Medicine*, v. 7, p. 56-67, 2013.

PEREIRA, K.D. Amido resistente, a última geração no controle de energia e digestão saudável. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.27, p.88-92, 2007.

PEREIRA, A. *Avaliação das atividades cicatrizante e antitumoral de extratos provenientes da casca de banana cultivar Prata Anã (Musa spp)*. 2010. 138f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)–Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, 2010.

PINA, A. S.; ROQUE, A. C. A. Studies on the molecular recognition between bioactive peptides and angiotensin-converting enzyme. *Journal of Molecular Recognition*, v. 22, p. 162–168, 2009

PIHLANTO, A.; VIRTANEN, T.; KORHONEN, H. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *International Dairy Journal*, v. 20, p. 3-10, 2010.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; ROKKA, T.; KORHONEN, H. Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Bovine Milk Proteins. *International Dairy Journal*, v. 8, p. 325-331, 1998.

POURAHMAD, R.; ASSADI, M. M. Yoghurt production by Iranian native starter cultures. *Nutrition & Food Science*, v. 35, p. 410-415, 2005.

QUIRÓS, A.; RAMOS, M.; MUGUERZA, B.; DELGADO, M.A.; MIGUEL, M.; ALEIXANDRE, A.; et al. Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal*, v. 17, p. 33–41, 2007.

RAUD, C. Alimentos funcionais: a nova fronteira da indústria alimentar análise das estratégias da Danone e da Nestlé no mercado brasileiro de iogurtes. *Revista de Sociologia e Política*, v. 16, p. 85-100; 2008.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, v. 29, p. 755-760, 2006.

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

- REBELLO, L. P. G.; RAMOS, A. M.; PERTUZATTI, P. B.; BARCIA, M. T.; CASTILLO-MUÑOZ, N.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Flour of banana (*Musa AAA*) peel as a source of antioxidant phenolic compounds. *Food Research International*, v. 55, p. 97–403, 2014.
- REID, G.; YOUNES, J. A.; VAN DER MEI, H. C.; GLOOR, G. B.; KNIGHT, R.; BUSSCHER, H. J. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, p. 27–38, 2011.
- REIS, J. A.; PAULA, A. T.; CASAROTTI, S. N.; PENNA, A. L. B. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*, v. 4, p. 124-140, 2012.
- RIBEIRO, D. A. *Produção de banana Nanicão (Musa SP AAA) em clima Cwa*. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências-área de concentração Fitotecnia) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- RITCHIE, M. L.; ROMANUK, T. N. A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases. *Plos One*, v. 7, 2012.
- ROBINSON, R.K.; TAMINE, A. Y. Types of fermented milks. In: Tamine, A.Y. *Fermented milks*. Oxford: Blackwell Science, 2006, p. 3-10.
- ROBINSON, R. Therapeutics properties of fermented milks. Essex (England): Elsevier: 1991, 185 p.
- RODRIGUEZ, H.; LANDETE, J. M.; LAS RIVAS, B. de.; MUÑOZ, R. Metabolism of food phenolic acids by *Lactobacillus plantarum* CECT 748. *Food Chemistry*, v. 107, p. 1393-1398, 2008.
- RODAS, M. A. B.; RODRIGUES, R. M. M. S.; SAKUMA, H.; TAVARES, L.Z.; SGARBI, C. R.; LOPES, W. C. C. Caracterização físico-química, histológica e viabilidade de bactérias lácticas em iogurtes com frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 21, p. 304-309, 2001.
- ROSALES, F. E.; SHARROCK, S.; TRIPON, S. *La importancia de las Musaceas en el Mundo*. In: Simposio Internacional Sobre Sigatoca-Negra. Manzanillo. Memórias. Sagar: Inibap, 1998, p. 1-10.
- RUAS-MADIEDO, P.; GUEIMONDE, M.; MARGOLLES, A.; LOS REYES-G de.; CLARA G.; SALMINEN, S. Exopolysaccharides Produced by Probiotic Strains Modify the Adhesion of Probiotics and Enteropathogens to Human Intestinal Mucus. *Journal of Food Protection*, v. 69, p. 1768-2035, 2006.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, p. 1-16, 2006.
- SABO, S. da S.; VITOLO, M.; GONZÁLEZ, J. M. D.; OLIVEIRA, R. P. de S. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, v. 64, p. 527–536, 2014.

- SADAT-MEKMENE L.; JARDIN J.; CORRE C.; MOLLÉ D.; RICHOUX R.; DELAGE M. M.; et al. Simultaneous presence of PrtH and PrtH2 proteinases in *Lactobacillus helveticus* strains improves breakdown of the Pure s1-Casein. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, p. 179–186, 2011.
- SAHIDI, F.; NACZK, M. *Phenolics in food and nutraceuticals*, CRC Press: Boca Raton, 2003, p 135–6.
- SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. New York: Marcel Dekker, 2004, 628 p.
- SARAWONG, C.; SCHOENLECHNER, R.; SEKIGUCHI, K.; BERGHOFER, E.; NG, P. K. W. Effect of extrusion cooking on the physicochemical properties, resistant starch, phenolic content and antioxidant capacities of green banana flour. *Food Chemistry*, v. 143, p. 33–39, 2014.
- SAURA-CALIXTO, F., GOÑI, I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry*, v. 94, p. 442–447, 2006.
- SAVIJOKI, K.; INGMER, H.; VARMANEN, P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 71, p. 394–406, 2006.
- SERKEDJIEVA, J. Antioxidant Effects of Plant Polyphenols: A Case Study of a Polyphenolrich Extract from *Geranium sanguineum L.* In: GUPTA, S. D. *Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants*, Science Publishers: Enfield, 2010, p. 275–293.
- SEPPO L.; JAUHAINEN T.; POUSSA T.; KORPELA R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 77, p. 326–330, 2003.
- SILVA, S. V.; MALCATA, F. X. Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, v. 15, p. 1–15, 2005.
- SINGH, K.; KALLALI, B.; KUMAR, A.; THAKER, V. Probiotics: a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v.1, p. 287-290, 2011
- SISTEMA BRASILEIRO DE RESPOSTAS TÉCNICAS – SBRT. Rio de Janeiro: Ministério da Ciência e Tecnologia, Disponível em: <http://sbrt.ibict.br/upload/sbirt424.pdf>. 2005.
- SOEDAMAH-MUTHU, S. S.; MASSET, G.; VERBERNE, L.; GELEIJNSE, J. M.; BRUNNER, E. J. Consumption of dairy products and associations with incident diabetes, CHD and mortality in the Whitehall II study. *British Journal of Nutrition*, v. 109, p. 718–726, 2013.
- SOUSA, C. M. D. M.; SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R. VIEIRA-JUNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v. 30, p. 351-355, 2007.

SURONO, I. S.; COLLADO, M. C.; SALMINEN, S.; MERILUOTO, J. Effect of glucose and incubation temperature on metabolically active *Lactobacillus plantarum* from dadih in removing microcystin-LR. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p.502-507, 2008.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *Journal of Nutrition*, v. 130, p. 2073-2085, 2000.

SHARMA, A.; YADAV, B. S.; RITIKA. Resistant starch: Physiological roles and food applications. *Food Reviews International*, v. 24, p. 193-234, 2008.

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 45, p. 287-306, 2005.

SHU, G.; YANG, H.; CHEN, H.; ZHANG, Q.; TIAN, Y. Effect of incubation time, inoculum size, temperature, pasteurization time, goat milk powder and whey powder on ace inhibitory activity in fermented milk by *L plantarum LP69*. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, v. 14, p. 107–116, 2015.

SLUIJS, I.; FOROUHI, N. G.; BEULENS, J. W.; VAN DER SCHOUW, Y. T.; AGNOLI, C.; ARRIOLA, L.; et al. The amount and type of dairy product intake and incident type 2 diabetes: results from the EPIC-InterAct Study. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 96, p. 382–390, 2012.

SMUG, L. N.; SALMINEN, S.; SANDERS, M. E.; EBNER, S. Yoghurt and probiotic bacteria in dietary guidelines of the member states of the European Union. *Beneficial Microbes*, v.5, p. 61–66, 2014.

SPYROULIA, G. A.; NIKOLAKOPOULOU, P.; TZAKOS, A.; GEROTHANASSIS, I. P.; MAGAFA, V.; MANESSI-ZOUPA, E.; et al. Comparison of the solution structures of angiotensin I & II. *The FEBS Journal*, v. 270, p. 2163–2173, 2003.

STRUIJK, E. A.; HERACLIDES, A.; WITTE, D.R.; SOEDAMAH-MUTHU, S.S.; GELEIJNSE, J.M.; TOFT, U.; et al. Dairy product intake in relation to glucose regulation indices and risk of type 2 diabetes. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, v. 23, p. 822–828, 2013.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. *Yogurt: science and technology*. Cambridge: Woodhead Publishing, 1999, 619 p.

TONG, X.; DONG, J. Y.; WU, Z. W.; LI, W.; QIN, L. Q. Dairy consumption and risk of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of cohort studies. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 65, p. 1027–1031, 2011.

TORRIANI, S.; VESCOVO, M.; SCOLARI, G. An Overview on *Lactobacillus heveticus* *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, v. 44, p. 163-191, 1994.

TOPPING, D. L.; CLIFTON, P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews*, v. 81, p. 1031-1064, 2001.

TUOMILEHTO, J.; LINDSTRÖM, J.; HYYRYNEN, J.; KORPELA, R.; KARHUNEN, M.L.; MIKKOLA, L.; et al. Effect of ingesting sour milk fermented using *Lactobacillus helveticus* bacteria producing tripeptides on blood pressure in subjects with mild hypertension. *Journal of Human Hypertension*, v. 18, p. 795–802, 2004.

TJWANTAN B.; POOLMAN B.; KONINGS W. Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Research*, v. 60, p. 269-286, 1993.

VAN DOKKUM, W. Propriedades funcionais de fibras alimentares, amido resistente e oligossacarídeos não digeríveis. In: COSTA, N.M.B.; ROSA, C.O.B. *Alimentos funcionais: Benefícios para a saúde*. Viçosa, 2008.

VINDEROLA, G.; CÉSPEDES, M.; MATEOLLI, D.; CÁRDENAS, P.; LESCANO, M.; AIMARETTI, N.; et al. Changes in gastric resistance of *Lactobacillus casei* in flavoured commercial fermented milk during refrigerated storage. *International Journal of Dairy Technology*, v. 64, p. 269-275, 2011.

VINDEROLA, G.; MATAR, C.; PALACIOS, J.; PERDIGON, G. Mucosal immunomodulation by the non-bacterial fraction of milk fermented by *L. helveticus* R389. *International Journal of Food Microbiology*, v. 115, p. 180–186, 2007.

XIAO, Y.; WANG, L.; RUI, X.; LI, W.; CHEN, X.; JIANG, M. Enhancement of the antioxidant capacity of soy whey by fermentation with *Lactobacillus plantarum* B1–6. *Journal of functional foods*, v. 12, p. 33–44, 2015.

ZHANG, P.; WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; HAMAKER, B. R. Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility—a review. *Carbohydrate Polymers*, v. 59, p. 443–45, 2005.

ZIBADI, S.; FARID, R.; MORIGUCHI, S.; LU, Y.; FOO, L. Y.; TEHRANI, P. M.; et al. Oral administration of purple passion fruit peel extract attenuates blood pressure in female spontaneously hypertensive rats and humans. *Nutrition Research*, v. 27, p. 408-416, 2007.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, v. 54, p. 176–186, 2001.

YUE, P.; WARING, S. Resistant starch in food applications. *Cereal Food World*, v. 43, p. 690-695, 1998.

WAKAI, T.; YAMAMOTO, N. Antihypertensive peptides specific to *Lactobacillus helveticus* fermented milk. In: Wakai, T. N. Yamamoto. *Biotechnology-Molecular Studies and Novel Applications for Improved Quality of Human Life*. R. H. Sammour. Europe, Rijeka, Croatia.:InTech, 2012.

WANG, L. Z.; WHITE, P. J. Structure and properties of amylose, amylopectin, and intermediate materials of oat starches. *Cereal Chemistry*, v.71, p.263-271, 1994.

WANG, J.; GUO, Z.; ZHANG, Q.; YAN, L.; CHEN, W.; LIU, X. M.; ZHANG, H. P. Fermentation characteristics and transit tolerance of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang in soymilk and bovine milk during storage. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 2468-2476, 2009.

WANG, Y.; ZHANG, M.; MUJUMDAR, A. S. Influence of green banana flour substitution for cassava starch on the nutrition, color, texture and sensory quality in two types of snacks. *LWT - Food Science and Technology*, v.47, p. 175–182, 2012.

WARNER, F. J.; SMITH, A. I.; HOOPER, N. M.; TURNER, A. J. Angiotensin-converting enzyme-2: a molecular and cellular perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 61, p. 2704-2713, 2004.

WU, J.; DING, X. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Research International*, v. 35, p. 367–375, 2002.

## **CAPÍTULO II – FERMENTATIVE ABILITY OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* BG 112 AND *LACTOBACILLUS HELVETICUS* LH 13 DURING GROWTH IN SKIM MILK WITH ADDED GREEN BANANA FLOUR**

**Abstract:** BACKGROUND: Consumers seek for foods or nutrients that contribute directly to health or to the prevention of diseases and to the promotion of physical and mental welfare, in this context, functional foods with probiotics, prebiotics and resistant starch play an important role. The objective of this study was to optimize the growth of lactic acid bacteria in milk with added green banana flour using surface response methodology (SRM). The optimized milk has been characterized; lactic acid bacteria counts, pH, and acidity were determined, and the survival of microorganisms under simulated gastrointestinal conditions during storage at 4 °C for 28 days was evaluated. RESULTS: The addition of green banana flour (1.08 % w/v) to the fermented milk by *L. plantarum* positively affected probiotic growth ( $P \leq 0.05$ ) yielding  $10.01 \pm 0.09 \log \text{CFU.mL}^{-1}$ . In the simulated gastrointestinal test, *L. helveticus* cells were significantly more robust. CONCLUSION: The addition of sucrose and banana essence to the optimized milks did not impair the cell viability or physicochemical characteristics, providing the fermented milks satisfactory microbiological properties and storage stability.

**Keywords:** functional food; lactic acid bacteria; gastrointestinal simulation; microbiological stability; optimization; resistant starch.

---

<sup>1</sup> Situação: Submetido ao *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Marli Busanello<sup>a\*</sup>; Marsilvio Lima de Moraes Filho<sup>a</sup>; Karla Bigetti Guergoletto<sup>a</sup>; Sandra Garcia<sup>a</sup>; <sup>a</sup> Department of Food Science and Technology, State University of Londrina, Londrina, Parana, Brazil \* Corresponding author: Department of Food Science and Technology, State University of Londrina, Rod Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, University Campus, CP 6001, CEP 86051-990, Londrina, Parana, Brazil. Tel.: +55 43 3371 4565; fax: +55 43 3371 4080.\*E-mail: marlibusanello@gmail.com

## 2.1. INTRODUCTION

The search for more balanced and healthy foods has gained new ground in the lives of consumers looking for foods or nutrients that contribute directly to health or to the prevention of diseases and to the promotion of physical and mental welfare.<sup>1</sup> Therefore, the use of new technologies and ingredients that provide quality and meet this demand are being pursued scientifically. In this context, functional foods with probiotics, prebiotics and resistant starch play an important role.

Resistant starch is present in foods such as green bananas. The banana is one of the most prominent fruits worldwide, and it is the most highly produced fruit with an output of 106.5 million tons. Of these, 7 million tons, which is equivalent to 6.9 % of the total, are produced in Brazil.<sup>2</sup> Bananas are produced in more than 130 countries, with India, whose production accounts for 28.1 % of the total, being the world leader in banana production.<sup>3</sup>

Currently, there is an industrial interest in green banana flour (GBF) production because it is an energy source of high nutritional value and it is rich in resistant starch (40.9 to 58.5 %).<sup>4</sup> The presence of resistant starch in food is interesting as it passes through the small intestine without being degraded and becomes available in the colon as a substrate for the fermentation of anaerobic bacteria, thereby exhibiting prebiotic action.<sup>5</sup>

Fermented milks form a smooth, viscous gel with a sharp characteristic acidic taste and are considered beneficial to health because they are a source of vitamins, minerals, calcium and protein. Additionally, fermented milks provide some relief of lactose intolerance. The effects of fermented milks can be enhanced by the use of probiotic lactic acid bacteria (LAB) in their formulation<sup>6,7</sup>, generally, LAB plays a significant role in the production of probiotic fermented foods and provides improved nutritional value, flavor and conservation.<sup>8</sup>

Probiotics are defined as live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer health benefits to the host.<sup>9</sup> It is estimated that probiotics comprise between 60 % and 70 % of the functional food worldwide market.<sup>10</sup> As a result, several LAB have been studied and can be used in the dairy industry, including *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus helveticus*.

*Lactobacillus plantarum* is known to produce antimicrobial substances, and it is often used in industrial products due to their versatility and metabolic capacity. Some strains of *Lactobacillus plantarum* are increasingly commercialized as starters or probiotic cultures.<sup>11</sup>

*Lactobacillus helveticus* also plays an important role as a starter microorganism for fermenting milks and processed semi-hard cheeses.<sup>12</sup> *Lactobacillus helveticus* generally has a higher proteolytic activity than other lactic acid bacteria.<sup>13</sup>

In view of the potential effects of GBF and the inherent effects of fermented milks, the present study aimed to optimize LAB counts (*Lactobacillus plantarum* BG 112 or *Lactobacillus helveticus* LH 13) in milk with added GBF using SRM. The fermented milk was characterized how much the chemical composition, and the pH, acidity and the survival of microorganisms under simulated gastrointestinal conditions during storage at 4 °C for 28 days were analyzed.

## 2.2 MATERIAL AND METHODS

### 2.2.1 Ingredients and Starter Culture

Skim milk powder (Molico<sup>®</sup>, Brazil) reconstituted to 12% (LDR) was used. The green banana flour (GBF) used in this study was provided by the Rositos company (Brazil). *Lactobacillus plantarum* BG 112 and *Lactobacillus helveticus* LH 13 were provided by Clerici Sacco (Italy).

### 2.2.2 Inoculum Preparation and Culture Maintenance

Each 0.1 g of freeze dried commercial culture of *Lactobacillus plantarum* BG 112 or *Lactobacillus helveticus* LH 13 were aseptically added to 100 mL of LDR (w/v) that was previously sterilized (121 °C/15 minutes). The inoculum was fractionated into aliquots of 10 mL, and 20 % (v/v) sterile glycerol was added under aseptic conditions. The aliquots were kept at -20 °C for further use.

### 2.2.3 Production of Control Fermented Milk and Fermented Milk with the Addition of GBF.

The LDR (w/v) were homogenized and, along with the GBF, pasteurized at 95 °C/5 minutes, and each trial received 1 % (v/v) of an inoculum of *Lactobacillus plantarum* or *Lactobacillus helveticus* that was previously transferred three times in LDR 12 % at 37 °C for 18 hours resulting in an initial count of  $7.04 \pm 0.13$  and  $6.07 \pm 0.03$  log CFU. mL<sup>-1</sup>, respectively. For each assay, the proportion of GBF added and the fermentation temperature

were variable according to the experimental design (Table 1). The control fermented milk treatment followed the same protocol of fermentation (*Lactobacillus plantarum* or *Lactobacillus helveticus*), but without the addition of GBF.

#### 2.2.4 Starch Determination

Available resistant starches present in GBF were determined enzymatically according to AOAC<sup>14</sup> with some modifications. The starch content was estimated by multiplying the end result of glucose by 0.9 to convert free glucose to starch and is presented as the percentage of dry matter.<sup>15</sup>

#### 2.2.5 Experimental Design

The optimum fermentation conditions for *L. helveticus* and *L. plantarum* were determined by SRM, and the experiments were conducted according to the central composite rotational design (CCRD), constituting a 2<sup>2</sup> factorial with three replicates at the midpoint and four axial points totaling eleven trials. The independent variables were  $x_1$  = GBF concentration and  $x_2$  = fermentation temperature, and the dependent variable was  $Y$  = lactic acid bacterial count (log CFU.mL<sup>-1</sup>) (Table 1).

The temperature ranges were chosen according to the characteristics of lactic acid bacteria and were defined in rotational design, with *L. plantarum* ranging from 12 °C to 41 °C and *L. helveticus* ranging from 17 °C to 40 °C. The GBF concentrations used were 0.57 % (w/v) to 1.58 % (w/v) (Table 1), which were defined by the characterization of total starch present in green banana flour and which were aimed at following the recommendation of the Brazilian legislation of the inclusion of up to 1 % (w/v) starch in fermented milk.<sup>16</sup> LAB enumeration was determined at the end of the 48 hour incubation period by pour plate counts (log CFU.mL<sup>-1</sup>). A model of second-order (Eq. 1) was used to fit the experimental data:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 \text{ (Eq. 1)}$$

Where:

$Y$  = response function,  $x_1$  and  $x_2$  = codified independent variables,  $\beta$  = estimated regression coefficients.

### 2.2.6 Study of the Growth Kinetics

To determine the appropriate fermentation time of the milk system with added GBF, experiments were conducted using growth optimized conditions, 1.08 % (w/v) of GBF, and 29 °C for *L. helveticus* and 27 °C for *L. plantarum*.

### 2.2.7 Preparation of Fermented Milk with GBF

The best condition obtained in the CCRD for the response variable Y (lactic acid bacteria counts) was used to prepare the fermented milk for the final experiment. The optimized fermented milk was aseptically supplemented with 16 % (w/v) commercial refined sucrose and 0.06 % (v/v) banana essence according to Burkert et al.<sup>17</sup> with some modifications. After homogenization, the products were stored at 4 °C for 28 days.

### 2.2.8 Proximate Composition and other Determinations

The moisture content of the samples was determined by direct drying in an oven at 105 °C.<sup>18</sup> The ash content of the samples was determined by incineration at 550 °C.<sup>18</sup> The total protein content of the samples was determined using the micro-Kjeldahl method.<sup>18</sup> The lipid content of the samples was determined with prior acid hydrolysis and direct ether extraction in Soxhlet.<sup>18</sup>

The pH values were determined using a digital potentiometer (Hanna HI 223) previously calibrated with pH 4 and pH 7 buffer solutions.<sup>18</sup> The titratable acidity was performed by titration of the samples with 0.1 M NaOH<sup>18</sup>, and the results were expressed as g acid lactic.100 g<sup>-1</sup> product.

The insoluble and soluble fractions of dietary fiber were determined using the enzymatic-gravimetric method<sup>18</sup>, and total fiber was calculated as the sum of the insoluble and soluble fractions.

The total sugar analysis was performed using the phenol-sulfuric method according to the methodology of Dubois et al.<sup>19</sup> with a UV-visible absorption spectrophotometer (Libra S22, Biochrom<sup>®</sup>, UK) at a wavelength of 490 nm.

### 2.2.9 Lactic Acid Bacteria Enumeration

The lactic acid bacteria counts were performed in agar MRS (Man, Rogosa and Sharpe) according to the method described by the American Public Health Association (APHA)<sup>20</sup>. Serial dilutions were seeded in triplicate in MRS agar by pour-plate. Samples fermented by *L. plantarum* were incubated aerobically at 37 °C/48 hours, while samples fermented by *L. helveticus* were incubated anaerobically in jars at 37 °C/48 hours.<sup>21</sup> The visible colonies were counted, and the results were expressed as log CFU.mL<sup>-1</sup> product.

### 2.2.10 Simulated Gastrointestinal Conditions and LAB Resistance within the GBF Fermented Milk Matrix

The survival of microorganisms in the presence of gastric juices and bile salts was determined according to the methodology of Krasaekoopt et al.<sup>22</sup> with some modifications. Glass tubes containing 1 mL of the fermented milk diluted in 9 mL of gastric fluid (0.08 M HCl plus 0.2 % NaCl, pH 1.67) were incubated at 37 °C for 120 minutes. After the incubation period, a 1-mL aliquot was taken at each time point and transferred to tubes containing 9 mL of intestinal fluid (0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> containing 0.6 % bile salts, pH 7.43). The tubes were incubated at 37 °C for 150 minutes. Then, serial dilutions were performed in sterile 0.1 % (w/v) peptone water, poured onto MRS agar plates, and then incubated at 37 °C/48 hours, as described in 2.2.9.

### 2.2.11 Statistical Analysis

Analyses were performed in triplicate, and the results were expressed as the mean ± standard deviation. The data were analyzed by regression and variance analysis (ANOVA) using the Statistica program 8.0 (Statsoft<sup>®</sup> Inc., 2008) to determine the level of significance ( $P \leq 0.05$ ).

## 2.3. RESULTS AND DISCUSSION

### 2.3.1 Starch Determination

Before the optimization experiments, it was necessary to determine the amount of available starch and the concentration of resistant starch in the green banana flour. The GBF used in this study exhibits a resistant starch content of  $10.6 \pm 0.88$  and available starch from  $58.71 \pm 0.52$  % on a dry basis. A similar value was reported by Hung et al.<sup>23</sup> who found a resistant starch content of 11.2 % in unripe banana flour. The total starch value found in this study was 69.31 %, which differs from that found by Borges et al.<sup>24</sup> who reported a value of 75.20 % on a dry basis. The amount of resistant starch present in foods varies according to the food matrix, the processing type, and the grinding, cooking and cooling steps.<sup>25</sup>

### 2.3.2 Optimization

The effects of variables (fermentation temperature and GBF concentration) on the response variable (LAB counts expressed as  $\log \text{CFU.mL}^{-1}$ ) during the fermentation of milk with *L. plantarum* or *L. helveticus* after 48 hours of fermentation are shown in Table 1.

**Table 1.** Experimental design ( $2^2$ ) with the real and coded values for variable  $x_1$  (GBF concentration),  $x_2$  (fermentation temperature) and *L. plantarum* and *L. helveticus* counts on milk with added GBF after 48 hours of fermentation ( $\log \text{CFU.mL}^{-1}$ )<sup>a</sup>.

*EXP	**GBF % (w/v)	T °C <i>L. plantarum</i>	T °C <i>L. helveticus</i>	*** <i>L. plantarum</i>	*** <i>L. helveticus</i>
1	(-1) 0.72	(-1) 17	(-1) 21	$9.00 \pm 0.09$	$8.86 \pm 0.02$
2	(-1) 0.72	(1) 37	(1) 37	$8.91 \pm 0.05$	$8.21 \pm 0.05$
3	(1) 1.44	(-1) 17	(-1) 21	$8.70 \pm 0.04$	$8.78 \pm 0.05$
4	(1) 1.44	(1) 37	(1) 37	$9.05 \pm 0.05$	$8.38 \pm 0.06$
5	(-1.42) 0.57	(0) 27	(0) 29	$9.18 \pm 0.06$	$9.02 \pm 0.10$
6	(1.42) 1.58	(0) 27	(0) 29	$9.71 \pm 0.09$	$9.10 \pm 0.02$
7	(0) 1.08	(-1.42) 12	(-1.42) 17	$8.38 \pm 0.04$	$7.85 \pm 0.08$
8	(0) 1.08	(1.42) 41	(1.42) 40	$9.39 \pm 0.02$	$6.41 \pm 0.05$
9	(0) 1.08	(0) 27	(0) 29	$10.19 \pm 0.11$	$9.31 \pm 0.05$
10	(0) 1.08	(0) 27	(0) 29	$9.67 \pm 0.09$	$9.42 \pm 0.03$
11	(0) 1.08	(0) 27	(0) 29	$10.18 \pm 0.07$	$9.28 \pm 0.04$

<sup>a</sup> CCRD-constituting a  $2^2$  factor with three replicates at the midpoint and four axial points totaling eleven trials.\*Experiment (EXP):In each experiment, we used a 1 % (v/v) inoculum of the respective lactic acid bacteria; \*\* Green banana flour (values on a wet basis);\*\*\* Average of 3 determinations  $\pm$  standard deviation ( $\log \text{CFU. mL}^{-1}$ ).

Mixtures of milks and GBF inoculated with *L. helveticus* or *L. plantarum* showed initial LAB counts of  $7.04 \pm 0.13$  and  $6.07 \pm 0.03$  log CFU.mL<sup>-1</sup>, respectively. After 48 hours of fermentation at 29 or 27 °C with a GBF concentration of 1.08 %, LAB counts reached average values of  $9.33 \pm 0.04$  and  $10.01 \pm 0.09$  log CFU.mL<sup>-1</sup>, respectively (Table 1), demonstrating that the fermentation process significantly favored the development of LAB and supported probiotic *L. plantarum* growth.

The growth conditions for both microorganisms and the estimated effects or the interactions of the variables  $x_1$  = concentration of GBF and  $x_2$  = temperature on the response  $Y = \log \text{CFU.mL}^{-1}$  are shown in Table 2.

**Table 2.** Estimated effects and regression coefficients for the response variable (*L. helveticus* (LH) and *L. plantarum* (LP) counts) <sup>a</sup>.

	Estimated effect		Standard error		p - value		Regression coefficient	
	L. P	L. H	L. P	L.H	L. P	L. H	L. P	L. H
Main effect	10.0196	9.3552	0.1880	0.1060	0.0000*	0.0000*	10.0196	9.3552
Concentration (L)	0.1360	0.0049	0.2315	0.1308	0.5824	0.7191	0.0680	0.0248
Concentration (Q)	-0.7286	-0.1568	0.2282	0.1591	0.0474*	0.3696	-0.3643	-0.0784
Temperature (L)	0.3551	-0.6281	0.2634	0.1241	0.1804	0.0039*	0.1775	-0.3140
Temperature (Q)	-1.2046	-1.7154	0.3260	0.1318	0.0059*	0.0004*	-0.6023	-0.8577
Interaction	0.2200	0.1250	0.6747	0.1842	0.5297	0.5276	0.1100	0.0625

<sup>a</sup>Regression equation coefficients for selected responses; Linear Terms (L); quadratic terms (Q); \* significant ( $P \leq 0.05$ ).

Linear (L) and quadratic (Q) terms of GBF concentration and the interaction of temperature and GBF concentration for the test with *L. helveticus* were not significant ( $P \geq 0.05$ ). However, linear (L) and quadratic (Q) terms for the temperature were negative and significant ( $P \leq 0.05$ ) (Table 2).

However, the optimization of fermented milk with *L. plantarum* exhibited a different behavior (Table 2), and the quadratic terms (Q) of GBF concentration and fermentation temperature were significantly different ( $P \leq 0.05$ ), indicating that, within the range studied, the variables showed a maximal response region with the curvature of the surface facing downwards (Figure 1). The inclusion of green banana flour was significant, which may indicate that the compounds present in GBF contributed to improved metabolic development of probiotic *L. plantarum* in the fermented milk system.

The response variable Y (LAB counts) were significantly different with the addition of GBF in milk fermented by *L. plantarum*, but did not show the same behavior when *L. helveticus* was the fermenter. This is interesting because, when working with strains of the same genus but different species, the observation of different behaviors demonstrates that species adjust differently to the same system. Additionally, the results may be dependent on the food matrix in the study, which suggests the need for further studies.

The results presented in Table 2 were adjusted, and Equations 2 and 3 were obtained for LAB cell growth ( $\log \text{CFU.mL}^{-1}$ ) as a function of variables  $x_1$  and  $x_2$  and subjected to analysis of variance (ANOVA) (Table 3).

**Table 3.** ANOVA for the growth of *Lactobacillus plantarum* (LP) and *Lactobacillus helveticus* (LH) in the milk system with added green banana flour <sup>a</sup>.

Source of variation	Sum of Squares		Degrees of freedom		Mean Squares		F calculated <sup>b</sup>	
	L.P	L.H	L.P	L.H	L.P	L.H	L.P	L.H
Regression	6.6711	3.2922	5	5	1.3342	0.6584	39.2995	6.1933
Residue	0.1697	0.5315	5	5	0.0339	0.1063		
Total	6.8409	3.8238	10	10				

<sup>a</sup> Analysis of variance (ANOVA) for the response variable (LAB counts expressed as  $\log \text{CFU.mL}^{-1}$ ) <sup>b</sup> *L. plantarum*: Coefficient of determination ( $R^2$ ) = 0.83. F 0:05; 5.5 (F tabulated) = 5.05; *L. helveticus*: Coefficient of determination ( $R^2$ ) = 0.97. F 0:05; 5.5 (F tabulated) = 5.05.

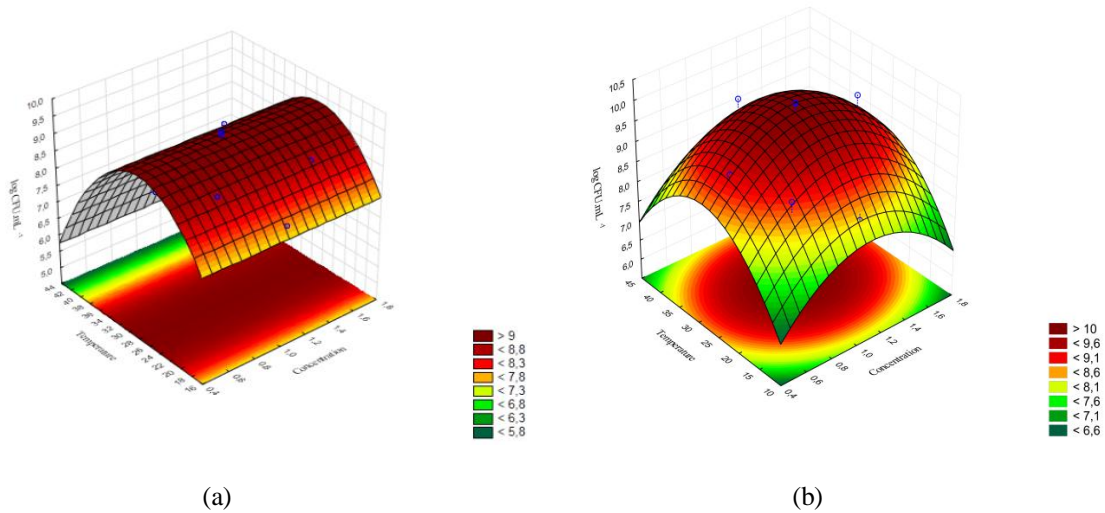
The growth model obtained with *L. helveticus* (Eq. 2) was significant at the 95% confidence level, and the F calculated (6.19) was greater than the F tabulated (5.5). The regression coefficient was 0.97, indicating that the model fits well to the experimental data and can be used as a predictor. Therefore, it was used to generate the response surface (Figure 1a). In the model obtained with the *L. plantarum* (Eq. 3), non-significant terms of GBF concentration ( $x_1$ ) and fermentation temperature ( $x_2$ ) remained in the equation because their removal would result in a decreased determination coefficient, and, consequently, the model would not fit as well to the experimental data. However, the model showed significance at the 95% confidence level, and the value of F calculated (39.29) was greater than the value of F tabulated (5.05). The coefficient of variation for this model was 0.83, and the surface was constructed and is shown in Figure 1b.

$$L. \text{ helveticus } y_H = 9.3552 - 0.3140 x_2 - 0.8577 x_2^2 \text{ (Eq.2)}$$

$$L. \text{ plantarum } y_P = 10.0196 + 0.0680 x_1 - 0.3643 x_1^2 + 0.1775 x_2 - 0.6023 x_2^2 \text{ (Eq.3)}$$

The response surface is designed to understand the interaction of variables and to find the optimum level of each variable in which the maximal response is obtained; in this way,

the response surface represents counts of *L. helveticus* (Figure 1a) that are a function of two factors (GBF concentration and fermentation temperature). The experimental conditions that resulted in the best response were: a fermentation temperature of 29 °C and a GBF concentration at the center point of 1.08%, yielding an average LAB count of  $9.33 \pm 0.04$  log CFU.mL<sup>-1</sup>.



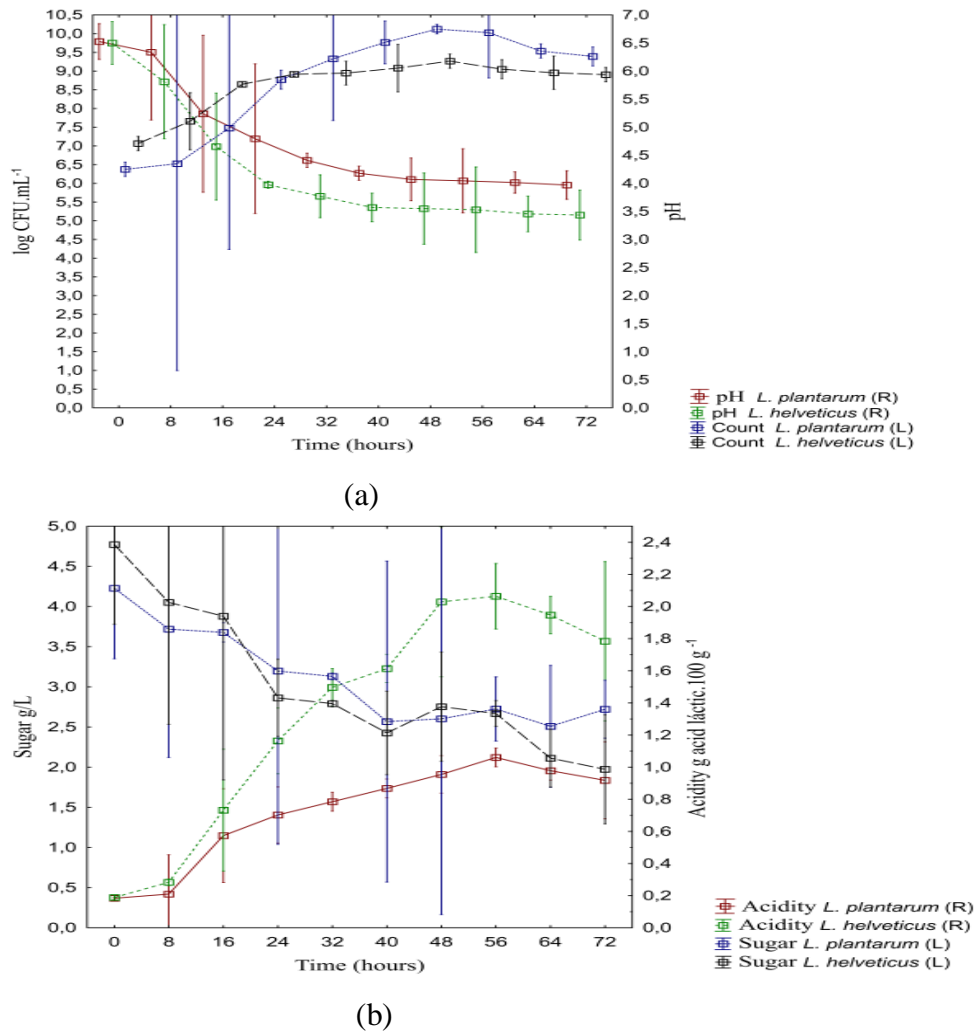
**Figure 1.** Response surfaces for *L. helveticus* (a) and *L. plantarum* (b) as a function of fermentation time and GBF concentration.

The experimental conditions that resulted in the best response to *L. plantarum* were a fermentation temperature of 27 °C, a GBF concentration of 1.08% and an average count of  $10.01 \pm 0.09$  log CFU.mL<sup>-1</sup> (Figure 1b).

### 2.3.3 Growth Curve

Growth curves by both lactic acid bacteria were similar. The pH (Figure 2a), total acidity and sugar (Figure 2b) during the fermentation period of 72 hours are shown in Figure 2.

After 16 hours, *L. helveticus* reached 8 log cycles, while 24 hours were necessary to obtain the same score with *L. plantarum*. This difference can be explained by the initial numbers of  $7.06$  log CFU. mL<sup>-1</sup> for *L. helveticus* and  $6.37$  log CFU. mL<sup>-1</sup> for *L. plantarum*. For both microorganisms, after 48 hours, there was no further growth; therefore, the stationary phase began when the cells were less sensitive to stress than in the logarithmic phase.<sup>26</sup> *L. acidophilus* counts reported by Tsen et al.<sup>27</sup> during banana puree fermentation were similar to those observed in this study.



**Figure 2.** LAB enumeration, pH values (a), total sugar and acidity content (b) during 72 h of fermentation by *L. helveticus* and *L. plantarum*.

Several factors have been reported to affect the viability of lactic acid bacteria during milk fermentation including: lactic acid accumulation<sup>28</sup>; pH<sup>29</sup>; selection of strains; presence of hydrogen peroxide due to microbial metabolism; incubation temperature; organic acid concentration; percentage of the inoculum; and fermentation time.<sup>30</sup>

Lactic acid production leads to a decrease in pH, and stabilization for both fermentations occurred at 40 hours with a pH of 3.5 for *L. helveticus* and a pH of 4.2 for *L. plantarum*. The value reached with *L. helveticus* fermentation is equivalent to that described by Nielsen et al.<sup>13</sup> and Elfahri et al.<sup>28</sup> and *L. plantarum* values decreased as reported by Shu et al.<sup>31</sup>

Acidification by each LAB occurred with a maximum production at 56 hours of fermentation but at 1.06 g of lactic acid.100g<sup>-1</sup> for *L. plantarum* and 2.08 g of lactic

acid.100g<sup>-1</sup> for *L. helveticus*. These results demonstrate the acidifying characteristic of *L. helveticus* with double the production of lactic acid compared to *L. plantarum*. The values of acidity observed in this study are in accordance with regulations established for fermented milks, i.e., an acid value of at least 0.60 % w/w.<sup>32</sup>

Lactic acid affects the sensory properties and acts as a preservative, while the pH is the main determining factor for the stability and safety of the product during storage.<sup>33</sup> The knowledge of the sugar kinetics contributes to a better understanding of the development of the microorganisms because sugars are the main source of energy used by them.<sup>34</sup> *L. plantarum* exhibited an initial value of 4.22 g. L<sup>-1</sup> sugar and a final of 2.72 g. L<sup>-1</sup> after 72 hours of fermentation. Although *L. helveticus* started with a slightly higher sugar level, its kinetics were more accelerated and reached 2.75 g. L<sup>-1</sup> at 48 hours of fermentation.

### 2.3.3 Proximate Composition of GBF and Fermented Milk During Storage

After fermentation for 48 hours (*L. plantarum* or *L. helveticus* under the conditions of 1.08 % green banana flour and 27 °C and 29 °C temperature, respectively), the samples were kept in glass vials at 4 °C for 28 days, and the proximate composition, cell viability, pH, titratable acidity and survival of microorganisms under simulated gastrointestinal conditions were measured every 7 days.

With the exception of the lipid values, the composition of GBF (Table 4) was similar to that described by Bezerra et al.<sup>35</sup> who determined the composition to be 4.68 ± 0.25 of protein, 2.52 ± 0.32 of ashes and 0.51 ± 0.04 of lipids. However, Sarawong et al.<sup>36</sup> reported values of 2.54 ± 0.18, 4.46 ± 0.16 and 7.00 ± 0.01 for soluble fiber, insoluble fiber, and total fiber on a dry basis, respectively. Thus, the GBF used in this study exhibits a higher value of dietary fiber, and regular use of this product may result in positive effects on various physiological functions of the organism.

According to results (Table 4), only moisture was different ( $P \leq 0.05$ ) between the *L. helveticus* and *L. plantarum* treatments (formulated or controls), and this was due to a higher content of total solids present in the formulated treatments.

**Table 4.** Chemical composition the GBF and milk fermented by *L. helveticus* or *L. plantarum*<sup>a</sup>

Chemical composition (g.100 g <sup>-1</sup> )	GBF	Formulated fermented by <i>L. helveticus</i>	Control fermented by <i>L. helveticus</i>	Formulated fermented by <i>L. plantarum</i>	Control fermented by <i>L. plantarum</i>
Moisture	4.09 ± 0.07	81.36 <sup>A</sup> ± 0.60	90.62 <sup>B</sup> ± 0.23	81.53 <sup>A</sup> ± 0.39	90.29 <sup>B</sup> ± 0.19
Ashes	2.75 ± 0.01	1.04 ± 0.14	0.98 ± 0.10	1.13 ± 0.08	1.12 ± 0.12
Protein	4.94 ± 0.08	3.33 ± 0.44	3.24 ± 0.18	3.25 ± 0.18	3.34 ± 0.10
Lipids	1.98 ± 0.03	0.26 ± 0.12	0.26 ± 0.13	0.24 ± 0.18	0.28 ± 0.08
Soluble fiber	2.67 ± 0.07	-	-	-	-
Insoluble fiber	15.67 ± 0.13	-	-	-	-
Total fiber	18.34	-	-	-	-

<sup>a</sup> Mean ± standard deviation between treatments that have different capital letters differ by Tukey test at a significance level of 5 %. <sup>b</sup> Treatments: *L. plantarum* and *L. helveticus* Control: milk fermented with *L. plantarum* or *L. helveticus* with no flour, no sugar or essence; *L. plantarum* and *L. helveticus* Formulated: Fermented milk with *L. plantarum* or *L. helveticus* with added 1.08 % green banana flour, 16 % (w/v) sucrose and 0.06 % banana essence. GBF: green banana flour. (-) Not determined.

### 2.3.4 Storage Stability

It is known that beneficial effects promoted by probiotics are effective only if cells remain viable during the entire food shelf life, and this characteristic may change, among other factors, according to the composition of the food matrix to which they are added.

There are variations between the formulations and reductions ( $P \leq 0.05$ ) in cell viability (CFU log. mL<sup>-1</sup>) during storage (Table 5), a fact that has been reported previously in other studies. 37, 38, 39

In the optimization process, the results indicated that the inclusion of GBF to fermented milk by *L. plantarum* has a positive and significant effect ( $P \leq 0.05$ ), this result was confirmed during the microbiological stability analysis because the LAB counts during fermentations with *L. plantarum* after 28 days of storage at 4 °C were  $9.03 \pm 0.02$  and the LAB counts during fermentations with *L. helveticus* were  $8.14 \pm 0.08$  log CFU.mL<sup>-1</sup> ( $P \leq 0.05$ ). As previously mentioned, lactic acid accumulation can affect the viability of lactic acid bacteria, which may have occurred in this case with a lower count for the *L. helveticus* because more lactic acid was produced in relation to *L. plantarum*.

In the present study, lactic acid bacteria numbers in control milk fermented with *L. helveticus* were  $10^9$  CFU. mL<sup>-1</sup>, which was consistent with that reported by Nielsen et al.<sup>13</sup> in milk fermented by *L. helveticus*.

**Table 5.** LAB enumeration (log CFU.mL<sup>-1</sup>), pH and titratable acidity of milk fermented by *L. plantarum* or *L. helveticus* during 28 days of storage at 4 °C<sup>a</sup>.

Treatments <sup>b</sup>	LAB counts (log CFU.mL <sup>-1</sup> )	pH	Acidity (g of lactic acid.100 g <sup>-1</sup> product)
Time 1 (Days)			
<i>L. plantarum</i> Control	9.67 <sup>aA</sup> ± 0.16	5.06 <sup>aAB</sup> ± 0.02	0.59 <sup>aF</sup> ± 0.01
<i>L. plantarum</i> Formulated	9.72 <sup>aA</sup> ± 0.03	5.12 <sup>aA</sup> ± 0.01	0.59 <sup>aF</sup> ± 0.03
<i>L. helveticus</i> Control	9.16 <sup>aC</sup> ± 0.01	3.80 <sup>aI</sup> ± 0.01	1.66 <sup>aAB</sup> ± 0.04
<i>L. helveticus</i> Formulated	9.57 <sup>aAB</sup> ± 0.01	3.72 <sup>aJL</sup> ± 0.07	1.64 <sup>aABC</sup> ± 0.03
Time 7 (Days)			
<i>L. plantarum</i> Control	9.03 <sup>bCD</sup> ± 0.04	4.98 <sup>abCD</sup> ± 0.01	0.57 <sup>abF</sup> ± 0.06
<i>L. plantarum</i> Formulated	9.56 <sup>bAB</sup> ± 0.02	5.03 <sup>bBC</sup> ± 0.05	0.55 <sup>aF</sup> ± 0.02
<i>L. helveticus</i> Control	9.11 <sup>abCD</sup> ± 0.02	3.75 <sup>aIJ</sup> ± 0.01	1.78 <sup>aAB</sup> ± 0.06
<i>L. helveticus</i> Formulated	9.07 <sup>bCD</sup> ± 0.04	3.68 <sup>bLM</sup> ± 0.04	1.84 <sup>aA</sup> ± 0.06
Time 14 (Days)			
<i>L. plantarum</i> Control	9.03 <sup>bCD</sup> ± 0.01	4.94 <sup>bD</sup> ± 0.06	0.42 <sup>bF</sup> ± 0.01
<i>L. plantarum</i> Formulated	9.18 <sup>bBC</sup> ± 0.01	4.70 <sup>cF</sup> ± 0.01	0.56 <sup>aF</sup> ± 0.03
<i>L. helveticus</i> Control	9.09 <sup>abCD</sup> ± 0.01	3.68 <sup>bLM</sup> ± 0.01	1.32 <sup>abCDE</sup> ± 0.07
<i>L. helveticus</i> Formulated	8.94 <sup>bCD</sup> ± 0.04	3.59 <sup>cN</sup> ± 0.09	1.33 <sup>bCDE</sup> ± 0.03
Time 21 (Days)			
<i>L. plantarum</i> Control	9.02 <sup>bCD</sup> ± 0.02	4.91 <sup>bcD</sup> ± 0.01	0.45 <sup>abF</sup> ± 0.05
<i>L. plantarum</i> Formulated	9.17 <sup>cC</sup> ± 0.01	4.49 <sup>dG</sup> ± 0.01	0.44 <sup>aF</sup> ± 0.06
<i>L. helveticus</i> Control	9.06 <sup>bCD</sup> ± 0.01	3.65 <sup>bMN</sup> ± 0.03	1.46 <sup>abBCD</sup> ± 0.12
<i>L. helveticus</i> Formulated	8.74 <sup>cD</sup> ± 0.01	3.58 <sup>cN</sup> ± 0.08	1.24 <sup>bcDE</sup> ± 0.01
Time 28 (Days)			
<i>L. plantarum</i> Control	8.95 <sup>bCD</sup> ± 0.04	4.83 <sup>cE</sup> ± 0.05	0.41 <sup>bF</sup> ± 0.02
<i>L. plantarum</i> Formulated	9.03 <sup>dCD</sup> ± 0.02	4.29 <sup>eH</sup> ± 0.01	0.49 <sup>aF</sup> ± 0.03
<i>L. helveticus</i> Control	9.06 <sup>bCD</sup> ± 0.02	3.43 <sup>cP</sup> ± 0.02	1.06 <sup>bE</sup> ± 0.09
<i>L. helveticus</i> Formulated	8.14 <sup>dE</sup> ± 0.08	3.36 <sup>dO</sup> ± 0.07	1.04 <sup>cE</sup> ± 0.10

<sup>a</sup> Mean ± standard deviation in storage periods that have different lowercase letters differ by Tukey test at a significance level of 5 %. Mean ± standard deviation between treatments that have different capital letters differ by Tukey test at a significance level of 5 %. <sup>b</sup> Treatments: *L. plantarum* and *L. helveticus* Control: milk fermented with *L. plantarum* or *L. helveticus* with no flour, no sugar or essence; *L. plantarum* and *L. helveticus* Formulated: Fermented milk with *L. plantarum* or *L. helveticus* with added 1.08 % green banana flour, 16 % (w/v) sucrose and 0.06 % banana essence.

Casarotti & Pena<sup>38</sup> studied the inclusion of green banana flour in fermented milk and reported positive effects on maintaining *L. acidophilus* after 28 days of storage. According to Espirito-Santo et al.<sup>40</sup> banana and apple flour are rich in pectin and fructo-oligosaccharides, which can stimulate probiotics present in fermented milk.

During storage, a significant reduction ( $P \leq 0.05$ ) in pH of all formulations was observed, this reduction was due to the production of lactic acid by microbial metabolism. This was characteristic of *L. helveticus*, which was more tolerant and produced acid leading to a decrease in pH.<sup>13</sup> In fact, the milk fermented by *L. helveticus* exhibited lower significant values ( $P \leq 0.05$ ) than the milk fermented by *L. plantarum* (Table 4).

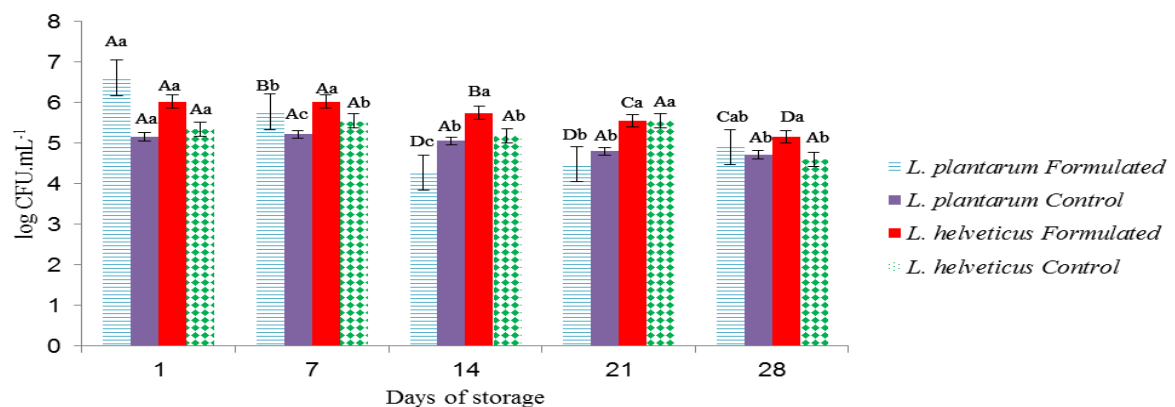
Although the acidity values were different ( $P \leq 0.05$ ), a more stable behavior during storage was observed in the case of *L. helveticus* fermentation ( $P \leq 0.05$ ) compared to *L.*

*plantarum* fermentation (Table 4). *L. helveticus* has the ability to produce higher concentrations of lactic acid and to express a complex proteolytic system.<sup>41</sup> Depending on technological interest, the high acidifying power of *L. helveticus* may be an advantage and may be a desirable feature for its use.

### 2.3.5 Mean Counts of Lactic Acid Bacteria after Incubation in Simulated Gastrointestinal Conditions

The probiotic lactic acid bacteria would be able to survive the adverse conditions present in the gastrointestinal tract, such as gastric juices or bile salts, and be able to maintain viability and metabolic activity in the intestine to exert its beneficial effects on the host.

Thus, the survival of LAB under simulated gastrointestinal conditions in control and formulated fermented milk was verified at 7 day intervals during a period of 28 days of storage at 4 °C. The treatment conditions were incubation at 37 °C for 120 minutes in simulated gastric juice (pH 1.67) and sequential incubation at 37 °C for 150 minutes in simulated intestinal juice with bile salts (0.6 % and pH 7.43) (Figure 3).



**Figure 3.** Mean counts of lactic acid bacteria after incubation in simulated gastrointestinal conditions. Mean  $\pm$  standard deviation followed by the same uppercase letters did not differ between the time points (1, 7, 14, 21 and 28 days) of storage. Mean  $\pm$  standard deviation followed by the same lowercase letters did not differ between treatments for the same storage period by Tukey test at a significance level of 5 %. *L. plantarum* and *L. helveticus* Control: milk fermented with *L. plantarum* or *L. helveticus* with no flour, no sugar and no essence; *L. plantarum* and *L. helveticus* Formulated: Fermented milk with *L. plantarum* or *L. helveticus* with added 1.08 % (w/v) green banana flour, 16 % (w/v) sucrose and 0.06 % (w/v) banana essence.

The *L. plantarum* probiotic counts in the formulated fermented milk at 1 day of storage was  $6.61 \pm 0.03 \log \text{CFU.mL}^{-1}$ , which was reduced ( $P \leq 0.05$ ) to  $4.91 \pm 0.05 \log \text{CFU.mL}^{-1}$  after 28 days of storage. Formulated fermented milk by *L. helveticus* maintained

constant cell viability ( $P \geq 0.05$ ) in the first 7 days of storage ( $6.02 \pm 0.13 \log \text{CFU.mL}^{-1}$ ), and, at the end of the 28 days of storage, exhibited a score of  $5.16 \pm 0.04 \log \text{CFU.mL}^{-1}$ .

Control samples fermented with *L. plantarum* and *L. helveticus* had mean counts of  $4.99 \pm 0.07 \log \text{CFU.mL}^{-1}$  and  $5.24 \pm 0.11 \log \text{CFU.mL}^{-1}$ , respectively, and there was no change ( $P \geq 0.05$ ) during the 28 days of storage.

At 1 day of storage there was no difference ( $P \geq 0.05$ ) in the LAB counts regarding simulated gastrointestinal conditions; however, at 7 and 14 days of storage, the formulated milk fermented by *L. helveticus* more effectively resisted ( $P \leq 0.05$ ) the simulated gastrointestinal conditions than the other treatments, exhibiting counts of  $6.02 \pm 0.03 \log \text{CFU.mL}^{-1}$  and  $5.74 \pm 0.03 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ , respectively. After 21 days of storage, the formulated milk fermented by *L. helveticus* showed better results ( $P \leq 0.05$ ) than the other treatments, with a count of  $5.16 \pm 0.04 \log \text{CFU.mL}^{-1}$ , which was significantly different ( $P \leq 0.05$ ) than the *L. plantarum* controls.

Generally, milk fermented with *L. helveticus* was more resistant to simulated gastrointestinal conditions, and these results can be attributed to the metabolism of *L. helveticus* that can acidify more efficiently than *L. plantarum*. The inclusion of rich green banana flour may also have contributed, mainly via starch and fibers, to the improved resistance to simulated gastrointestinal conditions.

Ahire et al.<sup>42</sup> reported in a study with *L. helveticus* CD6 a cell viability of 90 % under acidic gastric juice conditions (pH 2.5). Similarly, Casarotti & Pena<sup>38</sup>, studied milk fermented with *L. acidophilus* and *B. animalis* with added banana, grape or apple flours and reported the presence the flours protected for the probiotic microorganisms under simulated gastrointestinal conditions.

The food matrix in this study, which was milk with added green banana flour to which the lactic acid bacteria *L. helveticus* or *L. plantarum* were inoculated, produces microenvironments in the gut, which may protect the exposure of microorganisms to bile once the food constituents can bind to bile acids, preventing them from exerting their toxic effects on probiotics.<sup>43</sup>

According to Begley et al.<sup>43</sup>, bile exerts its effects primarily on the cell membrane phospholipids and proteins, affecting and changing cellular homeostasis. Thus, Gram-negative bacteria appear to be more resistant to the deleterious effects of bile than Gram-positive bacteria, but the bile tolerance is variable for each strain. This variability was observed in the present study in which the lactic acid bacteria *L. plantarum* or *L. helveticus* exhibited different behaviors in response to the simulated gastrointestinal conditions.

## 2.4. CONCLUSION

The addition of the green banana flour was significant in the optimization of milk fermented with *L. plantarum* 112 BG that reached mean counts of  $10.01 \pm 0.09 \log \text{CFU.mL}^{-1}$ , which is an alternative to the inclusion of plantain flour as a source of resistant starch that may act as a prebiotic. The addition of sucrose 16 % (w/v) and 0.06 % (v/v) of banana essence to optimized milks did not adversely affect the cell viability or the physicochemical characteristics, conferring to the formulated fermented milks satisfactory microbiological properties and storage stability. In the simulated gastrointestinal test, *L. helveticus* cells in formulated milks were significantly more robust.

## Acknowledgments

We would like to thank the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), Brazil for financial in the form of scholarship for M.B.

## 2.5. REFERENCES

- 1 Siró I, Kápolna E, Kápolna B, Lugasi A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - A review. *Appetite* 51: 456–467 (2008).
- 2 Brazilian Institute of Geography and Statistics - IBGE. *Survey Systematic of Agricultural Production* 29:1-83 (2015).
- 3 Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAOSTAT. (2011). *Statistics Division* 2010. <http://www.faostat.fao.org/>>. Accessed on 07 May 2015.
- 4 Tribess TB, Hernández-Uribe JP, Méndez-Montevalvo MGC, Menezes EW, Bello-Perez LA, Tadini CC. Thermal properties and resistant starch content of green banana flour (*Musa cavendishii*) produced at different drying conditions. *LWT* 42: 1022–1025 (2009).
- 5 Badolato GG, Almeida, CP de Moura, Lima U de Almeida. Development of a formulation fish hamburger with banana flour. *Food hyg* 20: 45-49 (2006).
- 6 Cheng H. Volatile flavor compounds in yogurt: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50: 938-50 (2010).
- 7 Ashraf R, Shah N P. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt--a review. *Int. J. Food Microbiol* 149: 194-208 (2011).

- 8 Liu CJ, Wang R, Gong FM, Liu XF, Zheng HJ, LuoYY, Li XR. Complete genome sequences and comparative genome analysis of *Lactobacillus plantarum* strain 5–2 isolated from fermented soybean, *Genomics* (2015).
- 9 Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization. *Guideline for the evaluation of probiotics and food*. London Ontario, Canada, (2002). [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf). Accessed on 07 May 2015.
- 10 Tripathi MK, Giri SK. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *J. Funct. Foods* 9: 225–241 (2014).
- 11 Luxananil P, Promchai R, Wanasen S, Kamdee S, Thepkasikul P, Plengvidhya V, et al. Monitoring *Lactobacillus plantarum* BCC 9546 starter culture during fermentation of Nham, a traditional Thai pork sausage. *Int. J. Food Microbiol* 129: 312–315 (2009).
- 12 Vinderola G, Matar C, Palacios J, Perdigon G. Mucosal immunomodulation by the non-bacterial fraction of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389. *Int. J. Food Microbiol* 115: 180–186 (2007).
- 13 Nielsen MS, Martinussen T, Flambard B, Sørensen KI, Otte J. Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *Int. Dairy J* 19: 155–165 (2009).
- 14 Association of Official Analytical Chemists - AOAC. *Official methods of analysis*. (16<sup>th</sup> ed). AOAC. Washington, (1995).
- 15 Rodríguez-Ambriz SL, Islas-Hernández JJ, Agama-Acevedo E, Tovar J, Bello-Pérez, L.A. Characterization of a fibre-rich powder prepared by liquefaction of unripe banana flour. *Food Chem* 107: 1515–1521 (2008).
- 16 Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Department of Agricultural Defense. Department of Animal Products Inspection – *DIPOA*. Resolution N°. 5 of 13 NOVEMBER, 2000 (\*) DOU of 11.27.00.
- 17 Burkert JFM, Fonseca RA dos S, Moraes JO, Sganzerla J, Kalil SJ, Burkert CAV. Sensory acceptance of dairy drinks potentially symbiotic. *Braz. J. Food Technol* 15: 325–332 (2012).
- 18 Association of Official Analytical Chemists - AOAC. *Official methods of analysis of the AOAC International* (19<sup>th</sup> ed). Arlington, (2012).
- 19 Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem* 28: 350–356 (1956).
- 20 American Public Health Association – APHA. *Standard methods for the examination of water and wastewater* (18<sup>th</sup> ed). American Public Health Association, Washington, (1992) 46.
- 21 Silva N, Junqueira VCA, Silveira NF de A, Taniwaki MH, Santos RFS dos, Gomes RAR, et al. *Manual of Methods of Analysis Microbiological of Food* (3<sup>th</sup> ed) São Paulo: Varela; (2007) 544.

- 22 Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int. Dairy J* 14: 737–743 (2004).
- 23 Hung PV, Cham NTM, Truc PTT. Characterization of Vietnamese banana starch and its resistant starch improvement. *Int Food Res J* 20: 205-211 (2013).
- 24 Borges AM, Perreira J, Lucena EMP de. Characterization of green banana flour. *Food Sci. Technol* 29: 333-339 (2009).
- 25 Muir JG, O’Dea K. Validation of an *in vitro* assay for predicting the amount of starch that escapes digestion in the small intestine of humans. *Am J Clin Nutr* 57: 540-546 (1993).
- 26 Azerêdo GA, Oliveira FLN. de, Faro ZP de. Electrical pulses in food preservation: critical factors in microbial inactivation and effects on food constituents. *Bulletin CEPPA* 26:171-178 (2008).
- 27 Tsen JH, Lin YP, King E. Fermentation of banana media by using k-carrageenan immobilized *Lactobacillus acidophilus*. *Int J Microbiol.* 91: 215-220 (2004).
- 28 Elfahri KR, Donkor ON, Vasiljevic T. Potential of novel *Lactobacillus helveticus* strains and their cell wall bound proteases to release physiologically active peptides from milk proteins. *Int. Dairy J* 38: 37-46 (2014).
- 29 Donkor ON, Henriksson A, Vasiljevic T, Shah NP. Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and *in vitro* angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Lait* 87: 21-38 (2007).
- 30 Mccomas KA, Gilliland SE. Growth of probiotic and traditional yogurt cultures in milk supplemented with whey protein hydrolysate. *J. Food Sci* 68: 2090-2095 (2003).
- 31 Shu G, Yang H, Chen H, Zhang Q, Tian Y. Effect of incubation time, inoculum size, temperature, pasteurization time, goat milk powder and whey powder on ACE inhibitory activity in fermented milk by *L. plantarum* LP69. *Acta Sci Pol Technol Aliment* 14: 107–116 (2015).
- 32 Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Department of Agricultural Defense. Department of Animal Products Inspection. Normative Instruction n°. 46. *Regulation Technical Identity and Quality of Fermented Milk*. Brasília, (2007). Published in the Federal Official Gazette of 24/10/2007, Section 1, Page 5.
- 33 Kedia G, Vázquez JA, Pandiella SS. Fermentability of whole oat flour, PeriTec flour and bran by *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Food Eng* 89: 246-249 (2008).
- 34 Madigan M, Martinko JM and Parker J. *Biología de los Microorganismos*. (10<sup>th</sup>ed). Madrid: Prentice Hall (2003).
- 35 Bezerra CV, Amante ER, Oliveira DC. de, Rodrigues AMC, Silva LHM. da. Green banana (*Musa cavendishii*) flour obtained in spouted bed – Effect of drying on physico-chemical,

- functional and morphological characteristics of the starch. *Ind Crops Prod* 41: 241– 249 (2013).
- 36 Sarawong C, Schoenlechner R, Sekiguchi K, Berghofer E, Perry KWN. Effect of extrusion cooking on the physicochemical properties, resistant starch, phenolic content and antioxidant capacities of green banana flour. *Food Chem* 143: 33–39 (2014).
- 37 Mani-López E, Palou E, López-Malo A. Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 97: 2578-90 (2014).
- 38 Casarotti SN, Penna ALB. Acidification profile, probiotic *in vitro* gastrointestinal tolerance and viability in fermented milk with fruit flours. *Int Dairy J Sci* 41: 1-6 (2015).
- 39 Senaka RC, Evans CA, Adams MC, Baines SK. Probiotic viability and physico-chemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. *Food Chem* 135: 1411-1418 (2012).
- 40 Espirito-Santo AP do, Cartolano NS, Silva TF, Soares FA, Gioielli LA, Perego P, *et al.* Fibers from fruit by-products enhance probiotic viability and fatty acid profile and increase CLA content in yoghurts. *Int. J. Food Microbiol* 154: 135–144.41 (2012).
- 41 Borgo F, Ricci G, Manachini PL, Fortina MG. Multilocus restriction typing: A tool for studying molecular diversity within *Lactobacillus helveticus* of dairy origin. *Int. Dairy J* 17: 336-342 (2007).
- 42 Ahire JJ, Mokashe NU, Patil HJ, Chaudhari BL. Antioxidative potential of folate producing probiotic *Lactobacillus helveticus* CD6. *Int. J. Food Sci. Technol* 50: 26-34 (2013).
- 43 Begley M, Gahan CG, Hill C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiological Reviews* 29: 625–651 (2005).

### **CAPÍTULO III - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM FARINHA DE BANANA VERDE E CAPACIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA E ATIVIDADE PROTETORA DO DNA EM LEITE FERMENTADO COM *L. PLANTARUM* BG 112 E *L. HELVETICUS* LH 13**

**RESUMO:** A ingestão frequente e regular de produtos lácteos fermentados por bactérias ácido lácticas (BAL) confere inúmeros benefícios nutricionais e funcionais, assim como a farinha de banana verde (FBV) que é rica em nutrientes auxilia na promoção do bem estar e saúde do consumidor. De tal modo, o objetivo deste trabalho foi analisar leites adicionados de FBV durante o processo fermentativo com *L. plantarum* ou *L. helveticus* e determinar a atividade antioxidante, capacidade de proteção do DNA plasmidial, atividade proteolítica e atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina (ACE) dos fermentados. A FBV apresentou conteúdo de compostos fenólicos de  $21,26 \pm 0,58$  mg EAG.g<sup>-1</sup>, atividade antioxidante DPPH de  $25,97 \pm 0,73$   $\mu$ mol ETrolox. g<sup>-1</sup> e ABTS de  $39,97 \pm 0,69$   $\mu$ mol ETrolox. g<sup>-1</sup> ambos em base seca. A atividade antioxidante foi maior nos fermentados adicionados de FBV em relação aos fermentados controle, e manteve-se estável durante o armazenamento (28 dias a 4 °C). O processo fermentativo teve influência positiva na atividade antioxidante, na proteção do DNA plasmidial, na atividade proteolítica e na inibição da atividade de ACE nos fermentados por *L. plantarum* ou *L. helveticus*.

Palavras chave: Atividade anti-hipertensiva, bactéria ácido láctica, compostos fenólicos, fermentação, probiótico, proteólise.

---

<sup>2</sup> Situação: Será submetido ao *Dairy Science & Technology*. Marli Busanello<sup>a\*</sup>; Marsilvio Lima de Moraes Filho<sup>a</sup>; Karla Bigetti Guergoletto<sup>a</sup>; Natália Harumi Niguma<sup>a</sup>, Sandra Garcia<sup>a</sup>.  
<sup>a</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. \*Autor correspondente: Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Rod Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, Campus Universitário, C. P. 6001, CEP 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil. Tel.: +55 43 3371 4565; fax: +55 43 3371 4080. E-mail: marlibusanello@gmail.com

### 3.1. INTRODUÇÃO

A banana encontra-se entre os frutos mais produzidos e consumidos mundialmente sendo economicamente acessível a todos, e com possibilidades de diversos tipos de preparo. Pesquisas, sobretudo estudando matéria-prima banana verde, vêm aumentando assim como o interesse por parte do mercado consumidor, e entre os produtos a FBV é a principal alternativa para a utilização dos frutos verdes pela indústria de alimentos (Sarawong et al., 2014).

Dentre os efeitos benéficos à saúde do consumidor a banana verde proporciona um aporte nutricional e funcional com a presença de vitaminas, sais minerais, carboidratos (Asmar et al., 2013; Aurore et al. 2009; Vernaza et al. 2011), conteúdo de amido resistente (Alkarkhi et al., 2011; Sarawong et al., 2014), compostos fenólicos (Sarawong et al., 2014; Rebello et al., 2014), capacidade antioxidante (Wang et al., 2012; Sarawong et al., 2014) entre outros.

Além disso, estudos sugerem que o consumo regular de frutas, legumes e ervas medicinais ricos em antioxidantes podem ajudar a reduzir o efeito deletério de radicais livres, e equilibrar o estresse oxidativo, uma vez que a geração de espécies oxidantes no metabolismo aeróbico do corpo humano é inevitável (Marazza et al., 2012).

BAL desempenham um papel significativo na produção de alimentos fermentados, melhorando o valor nutricional, o sabor, contribuindo na conservação e agregando valor aos alimentos fermentados. Além disso, estudos apontam que a ingestão frequente e regular de produtos lácteos fermentados por BAL confere inúmeros benefícios nutricionais e funcionais à saúde do consumidor (Ewe et al., 2010).

Contudo, BAL, que incluem linhagens probióticas, são de crescimento fastidioso exigindo fatores de crescimento essenciais, e o leite, embora seja um meio de crescimento rico, contém baixa concentração de aminoácidos livres e peptídeos para proporcionar um crescimento eficiente (Shihata e Shah., 2000; Vasiljevic et al., 2005). Em resposta a esta limitação algumas BAL desenvolveram um sistema complexo de proteinases e peptidases, que as permite utilizar a caseína como uma fonte adicional de nitrogênio (Smid et al., 1991). Assim, peptídeos biologicamente ativos são gerados durante o processo fermentativo do leite por enzimas proteolíticas produzidas por diversas BAL (Donkor et al., 2007) tais como linhagens de *L. helveticus* e *L. plantarum*. Esses peptídeos biologicamente ativos incluem peptídeos hipotensores com capacidade de inibir a atividade de ACE, impedindo assim a

conversão da angiotensina I em angiotensina II, que representa um potente vasoconstritor (Chen et al., 2009), responsável pelo aumento da pressão arterial.

Estudos descrevem em *L. helveticus* a existência de eficiente sistema proteolítico capaz de produzir peptídeos e liberar os aminoácidos da matriz da caseína (Griffiths e Tellez, 2013), reportado também por hidrolisar mais caseína em relação a outras cepas de *Lactobacillus spp* (Savijoki et al., 2006). Assim, por sua elevada atividade proteolítica (Ramesh et al., 2012; Beganovic et al., 2013) *L. helveticus* é considerado uma potencial espécie para a produção de leites fermentados com alta atividade inibitória de ACE (Donkor et al., 2007; Elfahri et al., 2014).

Entre a gama de bioatividades, linhagens de *L. helveticus* e de *L. plantarum* têm sido reportadas por suas propriedades antioxidantes (Ramesh et al., 2102; Elfahri et al., 2014). Cepas de *L. plantarum* também apresentam atividade proteolítica e atividade anti-hipertensiva (Shu et al., 2015; Gonzalez-Gonzalez et al., 2011), no entanto de maneira menos acentuada que as cepas de *L. helveticus*.

Em contrapartida *L. plantarum* é encontrado em uma grande variedade de alimentos incluindo vegetais fermentados, leite e produtos cárneos (Wang et al., 2015), isto em função de sua capacidade de fermentar uma ampla gama de carboidratos (Bringel et al., 2001); utilizar outras fontes de energia e de metabolizar vários compostos fenólicos, bem como apresentar um amplo espectro de atividade antimicrobiana (Cagno et al., 2009).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar leite adicionado de FBV durante o processo fermentativo por *L. plantarum* ou *L. helveticus* e determinar a atividade antioxidante, capacidade de proteção do DNA plasmidial, atividade proteolítica e atividade inibitória de ACE dos produtos.

## 3.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Matérias Primas e Cultura Starter

Para o preparo dos leites foi utilizado leite em pó desnatado Molico<sup>®</sup> (Brasil) reconstituído (LDR) a 12% (m/v) com fermentações em condições pré-determinadas (1 % (v/v) de inóculo, previamente repicado três vezes em LDR 12 % a 37 °C por 18 horas, 1,08 % (m/v) de FBV, pasteurização a 95 °C por 5 min, e fermentação a 27 °C para *L. plantarum* e 29 °C para *L. helveticus* durante 48 h). Foram utilizadas as culturas comerciais liofilizadas *L. plantarum* BG 112 e *L. helveticus* LH 13 ambas fornecidas pela Clerici Sacco (Brasil).

Para o preparo do inóculo, utilizou-se 0,1g da cultura comercial liofilizada de *Lactobacillus plantarum* ou *Lactobacillus helveticus* adicionados assepticamente a 100 mL de LDR (m/v) previamente esterilizado (121°C /15 min). Decorrida a homogeneização, o inóculo foi fracionado em alíquotas de 10 mL e 20% (v/v) de glicerol estéril foi adicionado sob condições assépticas às porções. As alíquotas foram mantidas a -20°C até o momento do uso.

A FBV utilizada neste estudo foi cedida pela empresa Rositos (Cambé-PR/ Brasil) e apresentava composição média de:  $4,09 \pm 0,07$  g.100 g<sup>-1</sup> de umidade,  $2,75 \pm 0,01$  g.100 g<sup>-1</sup> de cinzas,  $4,94 \pm 0,08$  g.100 g<sup>-1</sup> de proteínas,  $1,98 \pm 0,03$  g.100 g<sup>-1</sup> de lipídios,  $18,34$  g.100 g<sup>-1</sup> de fibra total e  $67,90$  de carboidratos g.100 g<sup>-1</sup>.

### 3.2.2 Determinação de Compostos Fenólicos Totais e Taninos Condensados

Os compostos fenólicos totais foram extraídos com etanol 80 % (v/v) de acordo com a metodologia de Hung et al. (2009). A determinação dos compostos fenólicos totais foi realizada segundo o método Folin-Ciocalteu (Swain e Hills, 1959), com leitura a 760 nm. Para quantificação foi utilizada uma curva de calibração com o padrão de ácido gálico (Sigma-Aldrich, Alemanha) e os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico/ g amostra em base seca (mg EAG.g<sup>-1</sup>). Os taninos foram analisados pela metodologia de Magalhães et al. (1997) com extração das amostras em metanol-HCL 1 % (v/v) e determinação pelo método Vanilina-HCL. Os resultados expressos em mg.g<sup>-1</sup> de amostra em base seca.

### 3.2.3 Determinação da Atividade Antioxidante: Sequestro de Radicais DPPH\*

A atividade antioxidante foi determinada pela redução do radical DPPH\* (2,2 difenil-1-picrilhidrazil) pelos compostos antioxidantes presentes na amostra, de acordo com o método descrito por Brand-Williams, et al. (1995), com leitura a 517 nm. Para a quantificação da atividade antioxidante foi utilizada a curva de calibração com o padrão de Trolox (Sigma-Aldrich, Alemanha) e os resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox por g e/ou mL de amostra em base seca ( $\mu\text{mol ETrolox.g}^{-1}$ ).

### 3.2.4 Determinação da Atividade Antioxidante: Sequestro de Radicais ABTS\*\*

A atividade antioxidante foi determinada pelo sequestro do radical cátion ABTS<sup>+</sup> [2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] conforme método descrito por Sánchez-Gonzalez, et al. (2005), com leitura a 734 nm. Para a quantificação da atividade antioxidante foi utilizada a curva de calibração com o padrão de Trolox (Sigma-Aldrich, Alemanha) e os resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox por g e/ou mL de amostra em base seca ( $\mu\text{mol ETrolox.g}^{-1}$ ).

### 3.2.5 Análise de Proteção Contra Oxidação do DNA Plasmidial

A análise de proteção ao DNA plasmidial foi realizada de acordo com a metodologia de Lee et al. (2002). Utilizou-se 10  $\mu\text{L}$  de amostra, com 2,0  $\mu\text{L}$  de DNA plasmidial (Sigma-Aldrich, Alemanha) em tampão (10 mM Tris-HCl e 1 mM de EDTA) homogeneizados e seguido da adição de 10  $\mu\text{L}$  do reagente de Fenton ( $\text{H}_2\text{O}_2$  100 mM, ácido acético 0,1 mM e  $\text{FeCl}_3$  1,6 mM). As amostras foram incubadas a 30 °C durante 60 min. O plasmídeo nativo e o plasmídeo tratado com reagente de Fenton foram utilizados como plasmídeo controle e de controle da reação de oxidação, respectivamente. Após a incubação, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) seguida de uma separação a 65V/20 mA durante 45 min. Após a eletroforese, o gel foi exposto à luz ultravioleta.

### 3.2.6 Determinação da Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica nas amostras foi avaliada pela liberação de grupos amino livres, utilizando o método orto-ftaldialdeído (OPA) (Church et al., 1983) e seguindo o procedimento descrito por Elfahri et al. (2014). Para a extração utilizou-se 10 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1% (v/v) adicionados a 10 mL de cada amostra, a mistura foi centrifugada a  $4000 \times g$  a 4 °C durante 30 min (Centrífuga 5804R – Alemanha) e o sobrenadante filtrado utilizando membrana filtrante 0,45  $\mu\text{m}$  (Millex, Irlanda). Ao sobrenadante (150  $\mu\text{L}$ ) foi misturado 3 mL de reagente OPA, a temperatura ambiente (~25 °C) durante 2 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro e a atividade proteolítica foi expressa como a absorvância de derivados de OPA a 340 nm.

### 3.2.7 Inibição *in vitro* da Enzima Conversora da Angiotensina (atividade inibidora- ACE)

A atividade inibitória de ACE foi realizada de acordo com a metodologia de Donkor et al. (2007) e Elfahri et al. (2014). Uma alíquota de 20g de amostra foi misturada a 5 mL de TCA 0,75% (v/v) e submetida a centrifugação de 4000 x g a 4 °C durante 30 min, o pH do sobrenadante foi ajustado para 8,3. Uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi adicionada a 200 µL de Hipuril-Histidil-Leucina (HHL, Sigma) dissolvido em tampão borato de sódio pH 8,5. A reação foi iniciada pela adição de 20 µL da solução ACE (Sigma) e as amostras foram incubadas a 37 °C por 30 min. A reação foi interrompida com a adição de 250 µL de ácido clorídrico (HCL) 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e 1,7 mL de acetato de etila. A camada de acetato de etila foi evaporada e o resíduo contendo ácido hipúrico foi redissolvido em 1 mL de água deionizada. A absorvância das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 228 nm usando água como branco. A taxa de inibição foi calculada como se segue:

$$\text{Atividade inibitória de ACE (\%)} = 1 - (C - D / A - B) \cdot 100$$

Onde A: absorvância na solução de ACE em tampão; B: absorvância da solução tampão; C: absorvância da solução de ACE com amostra no tampão; D: absorvância da amostra no tampão sem a presença de ACE.

### 3.2.8 Análise Estatística

As análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias ao nível de 5 % de significância utilizando o programa Statistica 8.0 (StatSoft<sup>®</sup> Inc, 2008).

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.3.1 Compostos Fenólicos Totais e Taninos Condensados Presentes na FBV

O conteúdo de compostos fenólicos presentes na FBV em estudo foi de  $21,26 \pm 0,58$  mg EAG.g<sup>-1</sup> em base seca, similar ao reportado por Rebello et al. (2014) em farinha da casca de banana que foi de  $29,2 \pm 0,8$  mg EAG.g<sup>-1</sup>, diferindo do relatado por Sarawong et al. (2014) de  $2,20 \pm 0,59$  mg EAG.g<sup>-1</sup> e Wang et al. (2012) de  $15,28 \pm 0,56$  mg EAG.g<sup>-1</sup> em FBV. O conteúdo de taninos presente na FBV foi de  $5,08 \pm 0,25$  mg. g<sup>-1</sup> similar ao relatado por Maina et al. (2012) de  $5,86$  mg. g<sup>-1</sup>.

Considerando o conteúdo de compostos fenólicos descritos na literatura, pode-se inferir que o teor encontrado no presente estudo foi satisfatório. Estes compostos são importantes, pois além de utilizações terapêuticas, eles estão associados à fibra, que além de contribuir para atividade antioxidante são também substratos fermentáveis para a microbiota humana (Goñi et al., 2009).

### 3.3.2 Atividade Antioxidante pelo Sequestro dos Radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup> Presente na FBV

Estudos relatam que em muitos produtos a adição de FBV tem proporcionado melhorias das propriedades funcionais, entre estas, a atividade antioxidante (Ovando-Martinez et al., 2009; Wang et al., 2012).

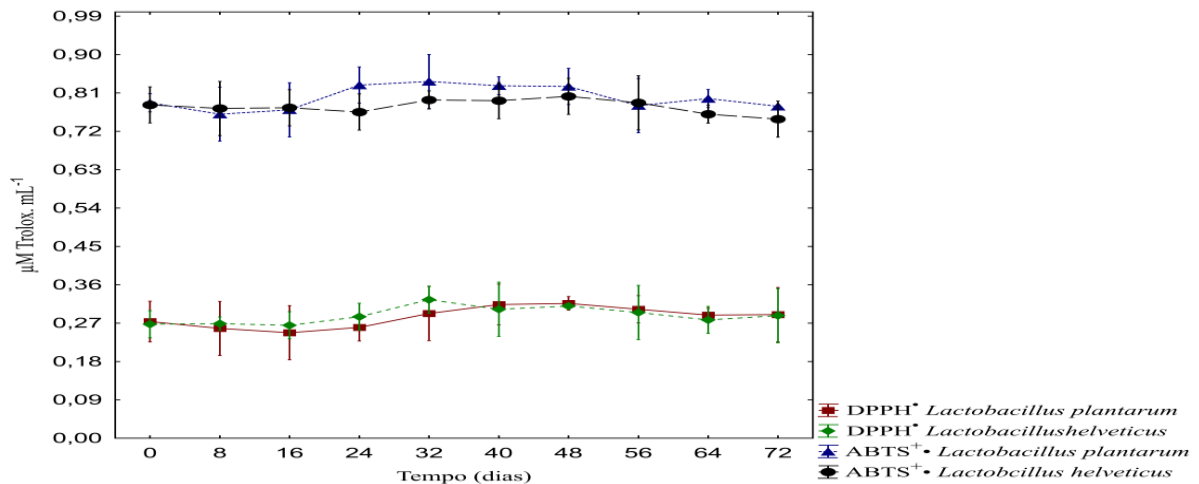
Na FBV em estudo a atividade antioxidante determinada por sequestro dos radicais DPPH<sup>•</sup> foi de  $25,97 \pm 0,73 \mu\text{mol ETrolox. g}^{-1}$  em base seca, o que está de acordo com o relatado por Sarawong et al. (2014) que foi de  $24,8 \pm 0,88 \mu\text{mol ETrolox. g}^{-1}$  e superior ao relatado por Dan. (2011) de  $7,91 \pm 0,56 \mu\text{mol ETrolox. g}^{-1}$  em FBV. Por outro lado a atividade antioxidante determinada por sequestro dos radicais ABTS<sup>•+</sup> foi de  $39,97 \pm 0,69 \mu\text{mol ETrolox. g}^{-1}$  em base seca, valor similar ao descrito por Sarawong et al. (2014) que foi de  $34,10 \pm 1,09 \mu\text{mol ETrolox. g}^{-1}$ .

De acordo com Ovando-Martinez et al. (2009) e Jittawan e Sirithon, (2008) os taninos condensados e a alta concentração de compostos fenólicos presentes na farinha de banana verde contribuem para a atividade antioxidante, o que corrobora com os resultados do presente estudo.

A diferença na atividade antioxidante encontrada neste estudo com os relatos da literatura pode estar relacionada com diferentes variedades, condições de cultivo (Sulaiman et al. 2011), ao solvente utilizado para a extração durante a análise; ao tempo e temperatura utilizados na extração (González-Montelongo et al., 2010) que podem influenciar o teor de compostos bioativos e, portanto, na atividade antioxidante.

#### 3.3.2.1 Atividade antioxidante dos extratos de leites fermentados durante crescimento

Amostras extraídas de leites fermentados por *L. helveticus* ou *L. plantarum* apresentaram comportamentos semelhantes quanto à atividade antioxidante avaliada por DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup> durante 72 h de fermentação, e é possível observar a influência significativa ( $P \leq 0,05$ ) do processo fermentativo para esse parâmetro (Figura 1).



**Figura 1.** Atividade antioxidante pelo sequestro de radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup> em leite fermentado por *L. plantarum* (27 °C) ou *L. helveticus* (29 °C) adicionado de 1,08 % (m/v) de FBV durante 72 h.

A atividade antioxidante pelo sequestro de radicais DPPH<sup>•</sup> para o leite fermentado por *L. plantarum* aumentou significativamente e com 40 h obteve-se o maior valor com  $0,31 \pm 0,05$   $\mu\text{M Trolox. mL}^{-1}$  ( $P \leq 0,05$ ). Resultados semelhantes foram observados para o leite fermentado por *L. helveticus* onde a maior atividade ocorreu no tempo 32 h de  $0,32 \pm 0,03$   $\mu\text{M Trolox. mL}^{-1}$  ( $P \leq 0,05$ ).

Para a atividade antioxidante por sequestro de radicais ABTS<sup>•+</sup>, o leite fermentado por *L. plantarum* apresentou aumento significativo com a máxima atividade em 24 h com  $0,83 \pm 0,04$   $\mu\text{M Trolox. mL}^{-1}$ . Para o fermentado por *L. helveticus* a maior atividade ocorreu no tempo 32 h com  $0,79 \pm 0,02$   $\mu\text{M Trolox. mL}^{-1}$ .

Pelos resultados obtidos no presente estudo pode-se inferir que o processo fermentativo contribuiu positivamente ( $P \leq 0,05$ ) para a atividade antioxidante analisada pelo sequestro dos radicais ABTS<sup>•+</sup> e DPPH<sup>•</sup> em ambos os fermentados, sendo possível observar o melhor tempo de fermentação para a máxima atividade antioxidante.

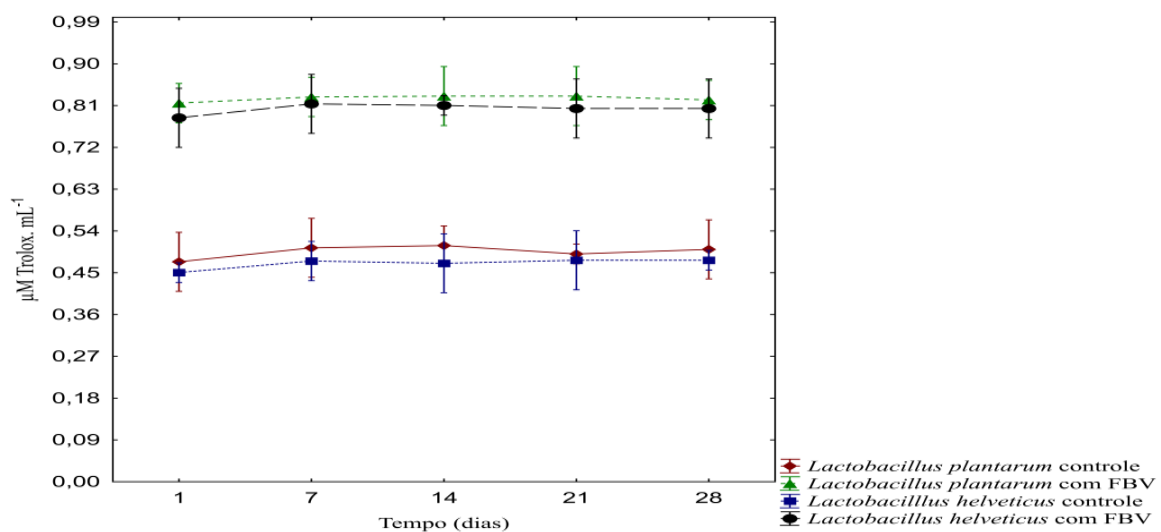
Liu et al. (2005) relataram em extrato de soja fermentado com Kefir alta atividade antioxidante DPPH<sup>•</sup> e segundo os autores essa atividade pode ser atribuída a peptídeos liberados durante a fermentação do extrato e da proteína da soja. Neste estudo uma das razões do aumento da atividade antioxidante pode ser por liberação de peptídeos através de degradação de compostos presentes na FBV e peptídeos bioativos derivados da proteína do leite, que de acordo com o tamanho e o conteúdo de aminoácidos podem apresentar propriedade antioxidante (Park, 2009; Qian et al., 2011).

Nossos resultados estão de acordo com o relatado com Elfahri et al. (2014) que verificaram aumento da capacidade antioxidante DPPH<sup>•</sup> com a fermentação de leite por *L.*

*helveticus*, e por Ahire et al. (2013) que também relataram atividade antioxidante em *L. helveticus* CD6, assim como no relatado por Osuntoki & Korie (2010) em fermentado com *L. plantarum* OK6.

### 3.3.2.2 Atividade antioxidante de leites fermentados durante o armazenamento

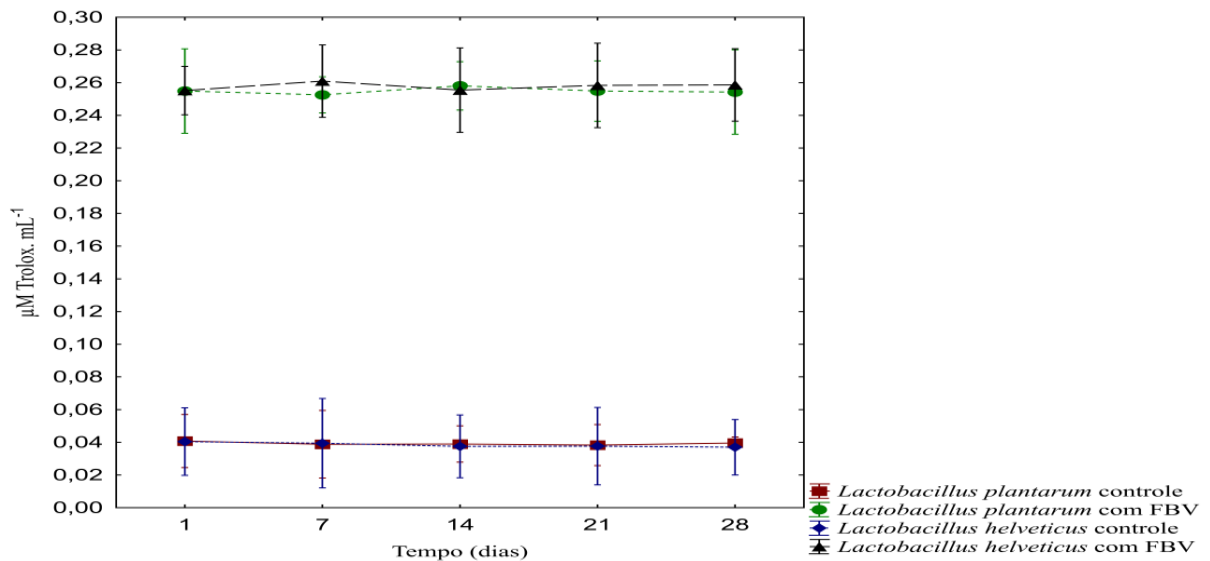
Os resultados ao longo do armazenamento utilizando metodologia de sequestro dos radicais ABTS<sup>++</sup> estão apresentados na Figura 2. A atividade antioxidante para o fermentado controle *L. plantarum* sem FBV apresentou valores constantes ( $P \geq 0,05$ ) do 7º dia ao 28º dia de armazenamento ( $0,50 \pm 0,07 \mu\text{M Trolox. mL}^{-1}$ ) dia de armazenamento. O mesmo comportamento foi observado para o controle fermentado por *L. helveticus* com atividade antioxidante de  $0,48 \pm 0,04 \mu\text{M Trolox. mL}^{-1}$  no 7º dia sem diferir significativamente até o 28º dia de armazenamento.



**Figura 2.** Análise da atividade antioxidante pelo sequestro dos radicais ABTS<sup>++</sup> em leites fermentados durante 28 dias de armazenamento a 4 °C. *L. plantarum* ou *L. helveticus* controle: leite fermentado por *L. plantarum* ou *L. helveticus* sem adição de FBV, sacarose e essência de banana; *L. plantarum* ou *L. helveticus* formulado: leite fermentado por *L. plantarum* ou *L. helveticus* adicionado de 1,08% (m/v) de FBV, 16% (m/v) de sacarose e 0,06% (v/v) de essência de banana.

Para o leite formulado fermentado por *L. plantarum* não houve diferença significativa ( $P \geq 0,05$ ) durante o armazenamento e a média da atividade antioxidante ABTS<sup>++</sup> foi de  $0,82 \pm 0,07 \mu\text{M Trolox. mL}^{-1}$ . O fermentado formulado por *L. helveticus* apresentou atividade antioxidante constante ( $P \geq 0,05$ ) a partir do 7º dia de armazenamento, com valor médio de  $0,80 \pm 0,05 \mu\text{M Trolox. mL}^{-1}$ .

A atividade antioxidante pelo sequestro de radicais DPPH<sup>•</sup> (Figura 3) manteve-se constante durante todo o armazenamento (28 dias/4 °C) em todos os tratamentos ( $P \geq 0,05$ ).



**Figura 3.** Análise da atividade antioxidante pelo sequestro dos radicais DPPH<sup>•</sup> em leites fermentados durante 28 dias de armazenamento a 4 °C. *L. plantarum* ou *L. helveticus* controle: leite fermentado por *L. plantarum* ou *L. helveticus* sem adição de FBV, sacarose e essência de banana; *L. plantarum* ou *L. helveticus* formulado: leite fermentado por *L. plantarum* ou *L. helveticus* adicionado de 1,08% (m/v) de FBV, 16% (m/v) de sacarose e 0,06% (v/v) de essência de banana.

Os valores médios para a atividade antioxidante DPPH<sup>•</sup> para o controle fermentado por *L. plantarum* foram de  $0,040 \pm 0,03 \mu\text{M Trolox. mL}^{-1}$  e para o controle fermentado por *L. helveticus* foi de  $0,039 \pm 0,09 \mu\text{M Trolox. mL}^{-1}$ . Maior atividade foi observada para o leite formulado fermentado por *L. plantarum* que foi de  $0,254 \pm 0,02 \mu\text{M Trolox. mL}^{-1}$  e para o leite formulado fermentado por *L. helveticus* que foi de  $0,257 \pm 0,06 \mu\text{M Trolox. mL}^{-1}$ .

Durante o período de armazenamento (28 dias/4 °C) os fermentados mantiveram a atividade antioxidante constante e os tratamentos formulados com adição de FBV apresentaram atividade antioxidante nos testes de DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup> mais elevadas ( $P \leq 0,05$ ) em relação aos tratamentos controle.

Corroborando com este estudo, Ovando-Martinez et al. (2009), ao estudarem espaguete e Wang et al. (2012) em biscoitos tipo *Snacks* relataram aumento da atividade antioxidante com a adição de FBV, devido ao elevado conteúdo de compostos fenólicos, fato este também ressaltado no presente estudo possivelmente pelo conteúdo de compostos fenólicos ( $21,26 \pm 0,58 \text{ mg EAG.g}^{-1}$  em base seca) presente em FBV.

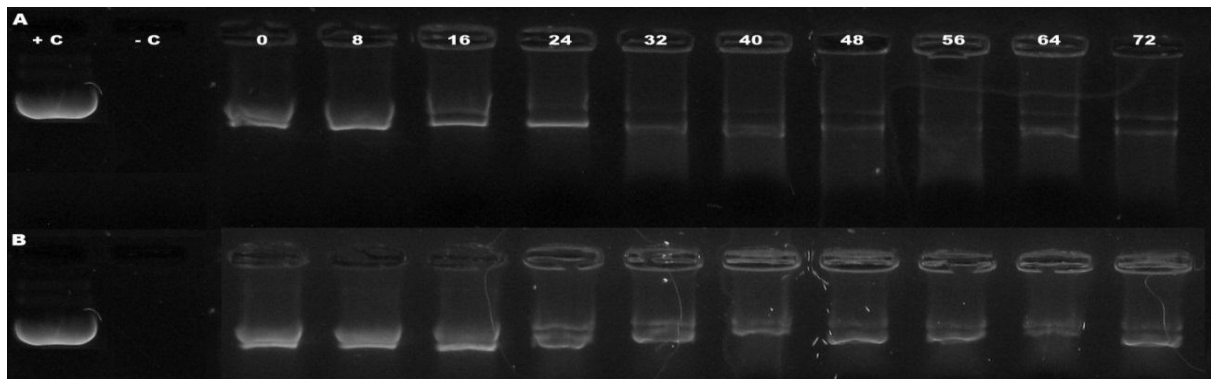
Segundo Kullisaar et al. (2003) a formação de radicais livres, tais como o ânion radical superóxido e o radical hidroxila são partes integrantes do metabolismo humano, sendo estes muito instáveis e reagindo rapidamente com outros grupos ou substâncias danificando tecidos e células. No entanto, o corpo tem seu próprio sistema de defesa, que utiliza compostos antioxidantes e enzimas, porém se não houver um equilíbrio estes não serão eficazes para

impedir totalmente os danos, daí a importância de produtos alimentícios como por exemplo o fermentado em estudo, no aporte de antioxidantes para o metabolismo e redução de efeitos oxidativos danosos.

### 3.3.3 Habilidade Protetora Contra a Oxidação do DNA Plasmidial

O radical hidroxila é o radical livre mais reativo, reage facilmente com moléculas, como aminoácidos, proteínas e DNA (Cacciuttolo et al.1993). Os radicais hidroxilas gerados pela reação de Fenton são conhecidos por causar quebras por oxidação nas cadeias de DNA e assim produzir as formas fragmentadas (Abbas et al., 2014).

Na Figura 4 a coluna (C<sup>+</sup>) contendo o plasmídeo não tratado (DNA plasmidial) mostrou o plasmídeo totalmente preservado, enquanto na coluna (C<sup>-</sup>) com o DNA plasmidial incubado com o reagente de Fenton, resultou na degradação completa das bandas de DNA. As linhas A e B correspondem aos extratos dos fermentados por *L. plantarum* (A) e *L. helveticus* (B) respectivamente, adicionados de FBV e amostrados ao longo de 72 h, e estes foram capazes de inibir a oxidação do DNA plasmidial induzida pelo reagente de Fenton.



**Figura 4.** Padrão de eletroforese em gel de agarose (1 %); coluna (C<sup>+</sup>): controle com DNA nativo; coluna (C<sup>-</sup>): DNA incubado com reagente de Fenton; linhas (A e B): leite fermentado com *L. plantarum* (27 °C) e *L. helveticus* (29 °C) respectivamente, adicionados de 1,08 % (m/v) de FBV durante 72 h.

Embora a análise tenha sido qualitativa, é possível notar pela intensidade das bandas que há uma maior capacidade de proteção do DNA no extrato fermentado por *L. helveticus* (Figura 4B) em relação ao fermentado por *L. plantarum* (Figura 4A) ambos contendo FBV.

A capacidade de proteção do DNA plasmidial contra oxidação no extrato fermentado por *L. helveticus* manteve-se praticamente constante durante as 72 h, ressaltando-se uma acentuada proteção nas primeiras 16 h de fermentação. *L. helveticus* tem a capacidade de produzir durante o processo fermentativo peptídeos bioativos antioxidantes (Ahire et al.,

2013; Elfahri et al., 2014) além de possuir um desenvolvido e eficiente sistema proteolítico (Nielsen et al., 2009). Li et al. (2014) observaram que exopolissacarídeos (EPS) produzidos por *L. helveticus* foram eficazes sequestrantes de radicais hidroxila, e assim a capacidade de produzir EPS aliada aos fatores acima citados podem ter contribuído para a maior proteção do DNA plasmidial. Embora neste estudo não tenham sido identificados ou determinados EPS, o valor médio da viscosidade aparente foi maior no fermentado por *L. helveticus* ( $2054,3 \pm 0,33$ ) em relação ao fermentado por *L. plantarum* ( $1878,6 \pm 0,47$ ), o que possivelmente é um indicativo correlacionado à produção de EPS (Li et al., 2014).

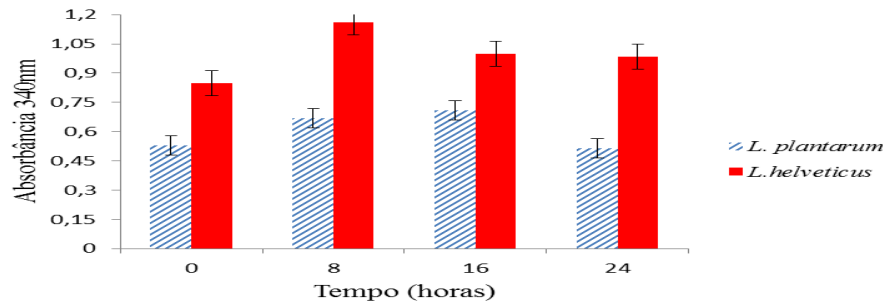
O extrato do fermentado por *L. plantarum* (Figura 4A) apresentou capacidade protetora mais efetiva no período até 24 h e a partir desse período até o final de 72 h de fermentação a capacidade de inibir a oxidação do DNA plasmidial foi mantida, porém de maneira menos acentuada.

Xiao et al. (2015) relataram efeitos positivos na proteção de DNA ao analisarem leite de soja fermentado por *L. plantarum* e segundo os autores a inibição da oxidação foi devida ao elevado conteúdo de compostos fenólicos e flavonóides. Estes compostos também presentes na FBV podem ter auxiliado em ambos os formulados na proteção contra os danos ao DNA plasmidial no presente estudo.

Verma et al. (2010) ao estudarem frutos verdes de *Ficus glomerata*; Singh et al. (2009) em extrato das folhas, frutos e sementes de Moringa e Marazza et al. (2012) ao avaliarem leite de soja com *L. rhamnosus* CRL981 relataram proteção contra oxidação do DNA plasmidial. No entanto é a primeira vez que um estudo com leite fermentado por *L. plantarum* ou *L. helveticus* adicionado de FBV para inibir a oxidação do DNA plasmidial é reportado.

#### 3.3.4 Avaliação da Atividade Proteolítica Durante o Processo Fermentativo

Além da formação de ácido lático e compostos aromáticos, a proteólise é um dos processos bioquímicos mais importantes que ocorrem em leites fermentados durante a fermentação e o armazenamento (Tamine e Deeth, 1980; Wohlrab e Bockelmann, 1992). A proteólise foi avaliada pela liberação de grupos  $\text{NH}_3$  livres e desta forma verifica-se que o processo fermentativo influenciou ( $P \leq 0,05$ ) a hidrólise das proteínas por BAL resultando no aumento da quantidade de grupos  $\text{NH}_3$  livres e houve diferença significativa na atividade proteolítica entre os fermentados *L. helveticus* e *L. plantarum* (Figura 5).



**Figura 5.** Atividade proteolítica avaliada pelo método OPA (orto-ftaldialdeído) em leites fermentados por *L. helveticus* (24 h /29 °C) e *L. plantarum* (24 h/27 °C) adicionados de 1,08 % (m/v) de FBV.

No fermentado por *L. helveticus* observou-se o valor máximo da proteólise ( $P \leq 0,05$ ) com 8 h de fermentação e no período de 16 a 24 h de fermentação a extensão da proteólise manteve-se estável ( $P \geq 0,05$ ). Já para o fermentado por *L. plantarum* a extensão proteolítica ocorreu de forma mais tênue, porém com aumento gradativo ( $P \leq 0,05$ ) até 16 h de fermentação onde foi observada a maior taxa ( $P \leq 0,05$ ) da proteólise.

Os resultados do presente estudo corroboram os citados por Elfahri et al. (2014) ao determinarem a atividade proteolítica de cepas de *L. helveticus* e verificarem aumento significativo da proteólise até 12 h de fermentação e por Pihlanto et al. (2010) que relataram aumento gradativo em fermentado por *L. helveticus* CNRZ32.

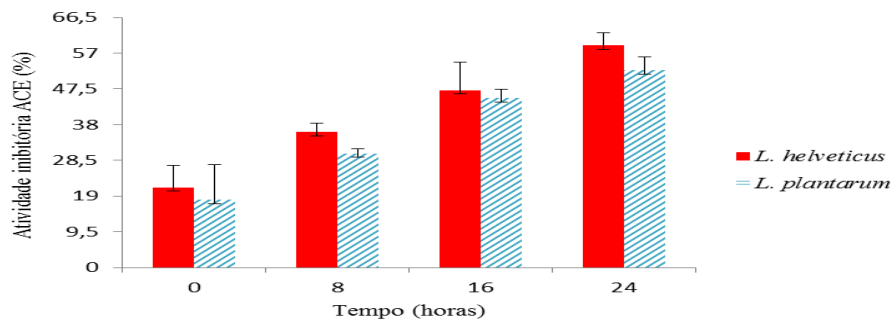
A extensão da proteólise diferiu significativamente entre as BAL estudadas, e o fermentado por *L. helveticus* apresentou a capacidade de utilizar as proteínas do leite mais eficientemente em relação ao fermentado *L. plantarum* ( $P \leq 0,05$ ), o que está de acordo com o estudo de Beganovic' et al. (2013) que relataram maior atividade proteolítica de *L. helveticus* M92 em relação ao *L. plantarum* L4, o que também foi relatado por Ramesh et al. (2012) ao analisarem *L. helveticus* NCDC288 em relação a *L. plantarum* NCDC25.

Os resultados deste estudo coincidem com os de Griffiths e Tellez, (2013); Wakai e Yamamoto, (2012) cujos relatos enfatizam que entre as bactérias ácido lácticas, *L. helveticus* é considerado como o mais proteolítico e com o sistema proteolítico mais eficiente. Segundo Genay et al. (2009) e Smeianov et al. (2007) isso ocorre provavelmente pelo fato de *L. helveticus* poder apresentar um ou mais genes em que as proteinases extracelulares estão envolvidas, obtendo-se assim um grande número de oligopeptídeos.

Os eventuais peptídeos bioativos são inativos dentro da sequência da matriz proteica, mas ao serem liberados durante a fermentação por microrganismos com atividade proteolítica podem promover varios efeitos fisiológicos (Ong et al., 2007), reforçando a importância da inclusão de BAL proteolíticas como o *L. helveticus* em produtos alimentares.

### 3.3.5 Inibição *in vitro* da Enzima Conversora da Angiotensina (atividade inibidora de ACE)

Observaram-se vários níveis de atividade inibitória de ACE durante o período avaliado (Figura 6) em que ambos os fermentados, por *L. helveticus* ou *L. plantarum*, mostraram produzir *in vitro* ação anti-ACE, e a atividade aumentou ( $P \leq 0,05$ ) com o tempo de fermentação em ambos os casos.



**Figura 6.** Atividade inibitória de ACE *in vitro* durante o crescimento dos fermentados com *L. helveticus* (24 h /29 °C) e *L. plantarum* (24 h/27 °C) adicionados de 1,08 % (m/v) de FBV.

Para o leite fermentado por *L. helveticus* a atividade inibitória de ACE aumentou significativamente do tempo 0 h em relação a 24 h (de  $21,31 \pm 9,27$  a  $59,01 \pm 3,47\%$  respectivamente). O fermentado por *L. plantarum* apresentou valores similares ao fermentado com *L. helveticus* e a média no tempo 0 h foi  $18,03 \pm 5,79\%$  e ao final de 24 h de fermentação foi de  $54,45 \pm 3,45\%$ .

Os resultados obtidos estão de acordo com o relatado por Elfahri et al. (2014) em leite fermentado por *L. helveticus* Lh 1315 que ao final de 14 h de fermentação relataram média de 48,69 % de inibição de ACE e Gonzalez-Gonzalez et al. (2011) observaram em leite fermentado por *L. helveticus* DSM 13137, aumento ( $P \leq 0,05$ ) na taxa de inibição no tempo 0 ( $\approx 27\%$ ) para 24 h ( $\approx 30\%$ ) de fermentação, e no fermentado com *L. plantarum* NCIMB 8826, aumento ( $P \leq 0,05$ ) no tempo 0 ( $\approx 10\%$ ) para 24 h ( $\approx 40\%$ ) de fermentação.

Observa-se no tempo 0 h de fermentação, que os valores da atividade inibitória de ACE para ambos os fermentados, foram altos (Figura 6), assim como no relatado por Gonzalez-Gonzalez et al. (2011) e segundo os autores, isso pode ser devido à produção de peptídeos inibidores de ACE durante a fermentação para a produção do inóculo que indica que as enzimas em seu sistema proteolítico possuem uma elevada especificidade para a produção de peptídeos inibidores de ACE.

Também conforme já discutido, o leite fermentado por *L. helveticus*, apresentou maior atividade proteolítica em relação ao fermentado por *L. plantarum* (Figura 5) o que poderia

estar correlacionado com maior atividade de ACE (Figura 6), isso pode ser explicado pelas diferenças nos sistemas proteolíticos entre as diferentes bactérias em estudo, que codificam proteases e peptidases com maior especificidade para as sequências de peptídeos no leite com atividade ACE (Gonzalez-Gonzalez et al., 2011).

*L. helveticus* é conhecido por possuir excelente atividade de proteinase extracelular e capacidade de liberação de peptídeos específicos com capacidade anti-hipertensiva durante a fermentação de leite (Wakai e Yamamoto, 2012). De acordo com Yamamoto et al. (1994) alguns peptídeos anti-hipertensivos são produzidos exclusivamente por proteases extracelulares, tal como grandes fragmentos de  $\beta$ -caseína produzidos pelas proteases extracelulares de *L. helveticus* CP790, ao passo que outros são possivelmente o resultado de uma ação combinada de proteases e peptidases (Yamamoto et al., 1999). Ainda segundo Chen et al. (2014) linhagens de *L. helveticus* foram capazes de produzir os dois principais peptídeos lácteos que inibem a ACE, os tripeptídeos VPP (Valina-Prolina-Prolina) e IPP (Isoleucina-Prolina-Prolina, no entanto, segundo os autores, em algumas linhagens não houve a produção de nenhum dos tripeptídeos e portanto nesses casos a inibição de ACE deveu-se a outros fatores.

Existem diversos mecanismos (acidez, números de bactérias lácticas, sequência de aminoácidos) pelos quais as BAL podem apresentar atividade inibitória de ACE, além disso, possuem sistema proteolítico diferenciado e neste trabalho não foi determinado o mecanismo para a liberação dos peptídeos anti-hipertensivos, mas pode-se inferir que o processo fermentativo, assim como os nutrientes presentes no leite, e na FBV, forneceram substratos disponíveis para a hidrólise enzimática e promoveram a produção de peptídeos inibidores de ACE.

### 3.4 CONCLUSÃO

A FBV apresentou alta concentração de compostos fenólicos e alta atividade antioxidante, contribuindo para a atividade antioxidante dos fermentados, justificando assim a importância da sua adição. O processo fermentativo influenciou positivamente todas as variáveis analisadas em ambos os fermentados por *L. helveticus* LH 13 ou *L. plantarum* BG 112. Além disso, o fermentado por *L. helveticus* apresentou elevada atividade proteolítica e atividade inibitória de ACE, assim como proteção ao DNA plasmidial. Esses resultados são de grande valia, pois o desenvolvimento de leites fermentados contendo elevada atividade

antioxidante e peptídeos com atividades biológicas são potencialmente interessantes para contribuir com uma alimentação saudável e proporcionar efeitos benéficos aos consumidores.

#### Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela ajuda sob a forma de bolsa de estudos à M.B.

#### 3.5 REFERÊNCIAS

- Abbas SR, Sabir SM, Ahmad SD, Boligon AA, Athayde ML (2014). Phenolic profile, antioxidant potential and DNA damage protecting activity of sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Food Chemistry*, 147, 10–16.
- Alkarkhi AFM, Ramli SB, Yong YS, Easa AM (2011). Comparing physicochemical properties of banana pulp and peel flour prepared from green and ripe fruits. *Food Chemistry*, 129, 312-318.
- Ahire JJ, Mokashe NU, Patil HJ, Chaudhari BL (2013). Antioxidative potential of folate producing probiotic *Lactobacillus helveticus* CD6. *Journal of Food Science and Technology*, 50, 26-34.
- Asmar AS, Castro EM, Pasqual M, Pereira FJ, Soares JDR (2013). Changes in leaf anatomy and photosynthesis of micropropagated banana plantlets under silicon sources. *Scientia Horticulture*, 161, 328-332.
- Aurore G, Parfait B, Fahrasmane L (2009). Bananas, raw materials for making processed food products. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 78-91.
- Beganovic J, Kos B, Pavunc AL, Uroic K, Dzidara P, Suskovic J (2013). Proteolytic activity of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Anaerobe*, 20, 58- 64.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28, 25-30.
- Bringel F, Quénee P, Tailliez P (2001). Polyphasic investigation of the diversity within *Lactobacillus plantarum* related strains revealed two *L. plantarum* subgroups. *Systematic and Applied Microbiology*, 24, 561–571.
- Cagno R, Angelis M, Coda R, Minervini F, Gobbetti M (2009). Molecular adaptation of *sourdough Lactobacillus plantarum* DC400 under co-cultivation with other lactobacilli. *Research in Microbiology*, 160, 358-366.
- Cacciuttolo MA, Trinh L, Lumpkin JÁ, Rao G (1993). Hyperoxia induces DNA damage in mammalian cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 14, 267-276.

Chen, Z. Y.; Peng, C.; Jiao, R.; Wong, Y. M.; Yang, N.; & Huang, Y. (2009). Anti-hypertensive nutraceuticals and functional foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4485-4499.

Chen Y, Liu W, Xue J, Yang J, Chen X, Shao Y, et al (2014). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of *Lactobacillus helveticus* strains from traditional fermented dairy foods and antihypertensive effect of fermented milk of strain H9. *Journal of Dairy Science*, 97, 6680-6692.

Church FC, Swaisgood HE, Porter DH, Catignani GL (1983). Spectrophotometric assay using *o*-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 66, 1219-1227.

Donkor ON, Henriksson A, Singh TK, Vasiljevic T, Shah NP (2007). ACE inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*, 17, 1321-1331.

Elfahri KR, Donkor ON, Vasiljevic T (2014). Potential of novel *Lactobacillus helveticus* strains and their cell wall bound proteases to release physiologically active peptides from milk proteins. *International Dairy Journal*, 38, 37-46.

Ewe JA, Wan-Abdullah WN, Karim AA, Bhat R, Liong MT (2010). ACE inhibitory activity and bioconversion of isoflavones by *Lactobacillus* in soymilk. *British Food Journal*, 113, 1127–1146.

Genay M, Sadat L, Gagnaire V, Lortal S (2009). prtH2, not prtH, is the ubiquitous cell wall proteinase gene in *Lactobacillus helveticus*. *Applied Environmental Microbiology*, 75, 38-49.

Goñi I, Díaz-Rubio MH, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F (2009). Towards an updated methodology for measurement of dietary fiber, including associated polyphenols, in food and beverages. *Food Research International*, 42, 840–846.

Gonzalez-Gonzalez CR, Tuohy KM, Jauregi P (2011). Production of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with probiotic strains: Effects of calcium, pH and peptides on the ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, 21, 615-622.

González-Montelongo R, Lobo MG, González M (2010). Antioxidant activity in banana peel extracts: testing extraction condition and related bioactive compounds. *Food chemistry*, 119, 1030-1-39.

Griffiths MW, Tellez AM (2013). *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system. *Frontiers in Microbiology*, 5, 4-30.

Hung PV, Maeda T, Miyatake K, Morita N (2009). Total phenolic compounds and antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method. *Food Research International*, 42, 185-190.

Jittawan K, Sirithon S (2008). Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem, and fruit fraction extracts in vitro. *Food Chemistry*, 110, 881-890.

- Kullisaar T, Songisepp E, Mikelsaar M, Zilmer K, Vihalemm T, Zilmer M (2003). Antioxidative probiotic fermented goats milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 90, 449–456.
- Lee JC, Kim HR, Kim J, Jang YS (2002). Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6490–6496.
- Li W, Ji J, Rui X, Yu J, Tang W, Chen X (2014). Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and its functional characteristics *in vitro*. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 732–739.
- Liu JR, Chen MJ, Lin CW (2005). Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2467–2474.
- Maina HM, Heide ES, Shagal MN (2012). Analytical screening of nutritional and non-essential components in unripe and ripe fruits of banana (*Musa sapientum*). *International Journal of Medicinal Plant Research*, 1, 20-25.
- Magalhães PC, Rodrigues WA, Durães FOM (1997). Tanino no grão de sorgo bases fisiológicas e métodos de determinação. *Embrapa*, 27, 13-16.
- Marazza JA, Nazareno MA, Giori GS, Garro MS (2012). Enhancement of the antioxidant capacity of soymilk by fermentation with *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of functional foods*, 4, 594-601.
- Nielsen MS, Martinussen T, Flambard B, Sørensen KI, Otte J (2009). Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *International Dairy Journal*, 19, 155–165.
- Ong L, Henriksson A, Shah NP (2007). Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium sp.* *International Dairy Journal*, 17, 67-78.
- Osuntoki A, Korie I (2010). Antioxidant Activity of Whey from Fermented Milk with *Lactobacillus* Species Isolated from Nigerian Fermented Foods. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 505–511.
- Ovando-Martinez M, Sáyago-Ayerdi S, Agama-Acevedo E, Goñi I, Bello-Pérez LA (2009). Unripe banana flour as an ingredient to increase the indigestible carbohydrates of pasta. *Food Chemistry*, 113, 121–126.
- Park YW (2009). *Overview of bioactive components in milk and dairy products*. London, UK: Wiley-Blackwell,
- Pihlanto A, Virtanen T, Korhonen H (2010). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *International Dairy Journal*, 20, 3-10.

- Qian B, Xing M, Cui L, Deng Y, Xu Y, Huang M, et al (2011). Antioxidant, antihypertensive, and immunomodulatory activities of peptide fractions from fermented skim milk with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB340. *Journal of Dairy Research*, 78, 72-79.
- Ramesh V, Kumar R, Singh RRB, Kaushik JK, Mann B (2012). Comparative evaluation of selected strains of lactobacilli for the development of antioxidant activity in milk. *Dairy Science and Technology*, 92, 179-188.
- Rebello LPG, Ramos AM, Pertuzatti PB, Barcia MT, Castillo-Muñoz N, Herмосín-Gutiérrez I (2014). Flour of banana (*Musa* AAA) peel as a source of antioxidant phenolic compounds. *Food Research International*, 55, 97–403.
- Sánchez-Gonzalez I, Jiménez-Escrig A, Saura-Calixto F (2005). In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chemistry*, 90, 133-139.
- Savijoki K, Ingmer H, Varmanen P (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 394–406.
- Sarawong C, Schoenlechner R, Sekiguchi K, Berghofer E, Ng PKW (2014). Effect of extrusion cooking on the physicochemical properties, resistant starch, phenolic content and antioxidant capacities of green banana flour. *Food Chemistry*, 143, 33–39.
- Swain T, Hills WE (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolics constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 19, 63-68.
- Singh BN, Singh BR, Singh R.L, Prakash D, Dhakarey R, Upadhyay G (2009). Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. *Food Chemical Toxicology*, 47, 109–116.
- Sulaiman SFS, Yusoff NAM, Eldeen IM, Seow EM, Sajak AAB, Ooi KL (2011). Correlation between total phenolic and mineral contents with antioxidant activity of eight Malaysian bananas (*Musa* sp.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 1-10.
- Shihata A, Shah NP (2000). Proteolytic profile of yoghurt and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 10, 401–408.
- Shu G, Yang H, Chen H, Zhang Q, Tian Y (2015). Effect of incubation time, inoculum size, temperature, pasteurization time, goat milk powder and whey powder on ACE inhibitory activity in fermented milk by *L. plantarum* LP 69. *Acta scientiarum Polonorum / Technologia alimentaria*, 14, 107–116.
- Smid EJ, Poolmann B, Konings WN (1991). Casein utilization by lactococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2447–2452.
- Smeianov VV, Wechter P, Broadbent JR, Hughes JE, Rodríguez BT, Christensen TK, et al (2007). Comparative high-density microarray analysis of gene expression during growth of *Lactobacillus helveticus* in milk versus rich culture medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 2661-2672.

Tamine AY, Deeth HC (1980). Yoghurt: Technology and biochemistry. *Journal of Food Protection*, 43, 939–977.

Vasiljevic T, Shah NP, Jelen P (2005). Growth characteristics of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 as affected by different neutralizers. *Australian Journal of Dairy Technology*, 60, 3-9.

Verma AR, Vijayakumar M, Rao CV, Mathela CS (2010). In vitro and in vivo antioxidant properties and DNA damage protective activity of green fruit of *Ficus glomerata*. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 704–709.

Vernaza MG, Gularte MA, Chang YK (2011). Addition of green banana flour to instant noodles: Rheological and technological properties. *Ciências e Agrotecnologia*, 35, 1157-1165.

Xiao Y, Wang L, Rui X, Li W, Chen X, Jiang M (2015). Enhancement of the antioxidant capacity of soy whey by fermentation with *Lactobacillus plantarum* B1–6. *Journal of functional foods*, 12, 33–44.

Yamamoto N, Akino A, Takano T (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 77, 917–922.

Yamamoto N, Maeno M, Takano T (1999). Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *Journal of Dairy Science*, 82, 1388–1393.

Wakai T, Yamamoto N (2012). Antihypertensive peptides specific to *Lactobacillus helveticus* fermented milk. In: Wakai, T. N. Yamamoto. *Biotechnology—Molecular Studies and Novel Applications for Improved Quality of Human Life*. R. H. Sammour. Europe, Rijeka, Croatia.: InTech,

Wang Y, Zhang M, Mujumdar AS (2012). Influence of green banana flour substitution for cassava starch on the nutrition, color, texture and sensory quality in two types of snacks. *LWT - Food Science and Technology*, 47, 175–182.

Wang J, Zhao X, Yang Y, Zhao A, Yang Z (2015). Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 119–126.

Wohlrab Y, Bockelmann W (1992). Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *International Dairy Journal*, 2, 345–361.

#### **CAPÍTULO IV - INFLUÊNCIA DE BACTÉRIAS LÁTICAS E ADIÇÃO DE FARINHA DE BANANA VERDE NA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E ACEITAÇÃO SENSORIAL DE LEITES FERMENTADOS.**

**RESUMO:** Durante o processo fermentativo as características tecnológicas de leites fermentados provavelmente apresentam comportamentos diferenciados, dependendo das linhagens utilizadas. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar os parâmetros de cor, viscosidade e capacidade de retenção de água (CRA) durante o armazenamento (28 dias a 4 °C), bem como a produção de ácidos orgânicos, a análise sensorial e microscopia eletrônica de varredura para avaliar a concentração celular. Observou-se em relação à cor que os formulados fermentados por *L. helveticus* ou *L. plantarum* foram mais amarelos, mais vermelhos e mais escuros em relação aos fermentados controle, assim como os fermentados formulados apresentaram maior viscosidade e CRA. Com a análise de microscopia eletrônica de varredura foi possível observar nos fermentados a presença dos microrganismos *L. helveticus* ou *L. plantarum*. A produção de ácido lático foi maior no fermentado por *L. helveticus* (17,17 mg. mL<sup>-1</sup>), *L. plantarum* (13,09 mg. mL<sup>-1</sup>), enquanto a de ácido acético foi maior no fermentado por *L. plantarum* (0,74 mg. mL<sup>-1</sup>), *L. helveticus* (0,15 mg. mL<sup>-1</sup>). Os formulados fermentados não diferiram nos atributos sensoriais e proporcionaram uma adequada aceitação global, *L. helveticus* (7,79 ± 0,88) e *L. plantarum* (7,58 ± 0,95), assim pode-se inferir que ambos os fermentados possuem perfis tecnológicos e sensoriais satisfatórios.

**Palavras chave:** ácido acético, *L. helveticus*, *L. plantarum*, microscopia eletrônica varredura, sensorial, viscosidade.

---

<sup>3</sup> Situação: Será submetido ao *Journal of Food Composition and Analysis*. Marli Busanello<sup>a\*</sup>; Marsilvio Lima de Moraes Filho<sup>a</sup>; Fernanda Farinazzo<sup>a</sup>; Karla Bigetti Guergoletto<sup>a</sup>; Sandra Garcia<sup>a</sup>. <sup>a</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. \*Autor correspondente: Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Rod Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, *Campus* Universitário, C. P. 6001, CEP 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil. Tel.: +55 43 3371 4565; fax: +55 43 3371 4080. E-mail: marlibusanello@gmail.com

#### 4.1 INTRODUÇÃO

O leite fermentado é obtido pela acidificação de leite por meio do metabolismo de bactérias ácido lácticas (BAL), ocorrendo assim importantes alterações físico-químicas, microbiológicas e sensoriais no produto (Casarotti et al., 2014). Ao ingerir regularmente leites fermentados com bactérias probióticas em quantidades adequadas diversas propriedades funcionais e benéficas são conferidas.

Entre os efeitos benéficos à saúde do consumidor, estudos relatam em leite fermentado com linhagens de *L. plantarum* e *L. helveticus* propriedades multifuncionais entre elas, atividade anti-hipertensiva (Ahtesh et al., 2016; Shu et al., 2015) atividade anticâncer do cólon (Elfahri et al., 2016; Li et al., 2015), atividade antioxidante (Bhardwaj e Singh, 2014; Ulyatu et al., 2015), antimutagênicas (Jeong et al., 2015), entre outras.

No entanto, durante o processo fermentativo as características tecnológicas dos fermentados apresentam comportamentos diferenciados a depender das linhagens utilizadas. As espécies de *L. plantarum* e *L. helveticus* possuem metabolismo diferentes e a interação desses microrganismos com os componentes do meio convertem substratos em metabólitos ácidos (Serra et al., 2009) que provavelmente terão influência nos atributos sensoriais, além de que, a degradação das proteínas do leite, desempenha um papel expressivo no desenvolvimento de sabor e textura dos produtos fermentados (Kilpi et al., 2007).

Os atributos sensoriais dos produtos exercem grande influência na aceitação pelo mercado consumidor, que encontra-se cada vez mais seletivo por produtos saudáveis e inovadores. Dessa maneira, ao desenvolver novos produtos é essencial que se realize a análise sensorial, que é definida pela ISO (*International Standard Organization*) como “o exame das propriedades sensoriais de um produto através dos órgãos dos sentidos”, um instrumento fundamental para determinar o grau de aceitação do produto pelo consumidor (Piana et al., 2004).

Para atender a necessidade desse mercado consumidor por produtos inovadores, encontram-se as farinhas de frutas que podem ser utilizadas na produção de leites fermentados (Casarotti e Penna, 2015). Entre as possibilidades de frutas a serem utilizadas encontra-se a banana que é rica em fibras, minerais, vitaminas (Choo e Aziz, 2010), compostos bioativos, contém propriedades nutricionais e atributos sensoriais (Rebello et al., 2014; Wang et al., 2012) entre outros benefícios.

Além dos efeitos benéficos à saúde, a farinha de banana verde (FBV) é relevante também do ponto de vista econômico, pois contribui para a redução de perdas pós-colheita, no

aumento do tempo de vida de prateleira e na agregação de valor ao fruto (Bezerra et al., 2013), com aplicações na indústria alimentícia, sobretudo na elaboração de produtos de panificação, dietéticos e infantis (Vernaza et al., 2011). Assim com a incorporação de FBV em novos produtos como em leite fermentado incentiva-se o consumo de banana, contribuindo para a saúde.

Diante disso, o objetivo deste estudo foi analisar em leites adicionados de FBV fermentados por *L. plantarum* ou *L. helveticus*, os atributos sensoriais, microscópicos e tecnológicos de cor, viscosidade e CRA durante o período de armazenamento de 28 dias a 4 °C, bem como a produção de ácidos orgânicos.

## 4.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Matérias Primas e Cultura Starter

Para o preparo dos leites foi utilizado leite em pó desnatado Molico<sup>®</sup> (Brasil) reconstituído (LDR) a 12% (m/v) com fermentações em condições pré-determinadas (1 % (v/v) de inóculo, previamente repicado três vezes em LDR 12 % a 37 °C por 18 horas, 1,08 % (m/v) de FBV, pasteurização a 95 °C por 5 min, e fermentação a 27 °C para *L. plantarum* e 29 °C para *L. helveticus* durante 48 h). Foram utilizadas as culturas comerciais liofilizadas *L. plantarum* BG 112 e *L. helveticus* LH 13 ambas fornecidas pela Clerici Sacco (Brasil).

Para o preparo do inóculo utilizou-se 0,1g da cultura comercial liofilizada de *Lactobacillus plantarum* ou *Lactobacillus helveticus* adicionados assepticamente a 100 mL de LDR (m/v) previamente esterilizado (121°C /15 min). Decorrida a homogeneização, o inóculo foi fracionado em alíquotas de 10 mL e 20% (v/v) de glicerol estéril foi adicionado sob condições assépticas às porções. As alíquotas foram mantidas a -20°C até o momento do uso.

A FBV utilizada neste estudo, foi cedida pela empresa Rositos (Brasil) e apresentava composição centesimal média de:  $4,09 \pm 0,07$  g.100 g<sup>-1</sup> de umidade,  $2,75 \pm 0,01$  g.100 g<sup>-1</sup> de cinzas,  $4,94 \pm 0,08$  g.100 g<sup>-1</sup> de proteínas,  $1,98 \pm 0,03$  g.100 g<sup>-1</sup> de lipídios,  $18,34$  g.100 g<sup>-1</sup> de fibra total e  $67,90$  de carboidratos g.100 g<sup>-1</sup>.

### 4.2.2 Análise da Viscosidade Aparente, CRA e Cor

Para acompanhar a viscosidade dos leites fermentados durante o período de armazenamento de 28 dias a 4 °C, utilizou-se um viscosímetro digital *Brookfield*, com *spindle*

5, velocidade 12 rpm (Baú et al., 2012) e os resultados foram expressos em *centipoise*. Para a determinação da CRA utilizou-se a metodologia de Harte et al. (2003) com algumas modificações. Uma alíquota de 20g de amostra foi centrifugada a 15000 x g por 30 min a 10 °C. A CRA é expressa como: (%) = [1- peso do sobrenadante / peso da amostra]. 100.

A análise de cor foi realizada utilizando o colorímetro Minolta CR-400 (Konica Minolta Sensing, Inc.) com iluminante D65 devidamente calibrado. Os valores de L\* (luminosidade), a\* (componente vermelho-verde) e b\* (componente amarelo-azul) foram expressos no sistema CIELAB (Caldeira et al., 2010).

#### 4.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise de microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina. As amostras foram primeiramente fixadas em glutaraldeído 3 % e paraformaldeído 3 % e aderidas em lamínula preparada com polidextrina, e mantidas overnight em temperatura refrigerada. Em seguida realizou-se 3 banhos de 15 minutos com tampão fosfato 0,1M, e fixação em ósmio 1 % durante 1 hora seguido de banho de 15 minutos em tampão fosfato 0,1M e mais 3 banhos seriados em álcool 70 %, 80 %, 90 % e 100 %. Posteriormente as amostras foram montadas em *stubs* de alumínio usando fitas de carbono e cobertas com ouro (Sputter coater- Baltec SCD 050). As imagens foram obtidas utilizando o microscópio eletrônico de varredura FEI-Quanta 200.

#### 4.2.4 Ácidos Orgânicos

As amostras foram extraídas de acordo com a metodologia de Donkor et al. (2007). Uma alíquota de 3 mL de amostra foi misturada a 50 µL de ácido nítrico 15.5 mol.L<sup>-1</sup> e com 1mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.01 mol.L<sup>-1</sup>. A mistura foi centrifugada a 14.000 x g por 30 min (Centrífuga 5804R – Alemanha) para precipitar a proteína. O sobrenadante foi filtrado em membrana filtrante 0.22-µm (Millipore Corporation, MA, EUA). Os ácidos orgânicos foram determinados em cromatógrafo líquido de alta eficiência, sistema instrumental Shimadzu LC 20 A (Kyoto, Japão), constituído por Bomba de alta pressão LC- 20AT, Injetor automático SIL-20AC HT, detector de índice de Refração RID-10A, detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A, forno de coluna CTO-20A e módulo de controle CBM-20A. Para as análises utilizou-se coluna cromatográfica Shiseido CapCell Pak 5µ C18 MG 250 x 4,6mm. A fase

móvel consistiu em solução tampão fosfato de sódio 25 mM, com pH ajustado para 2,4 na vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , a temperatura da coluna foi mantida a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e o volume de injeção em  $20 \text{ } \mu\text{L}$ . A detecção foi realizada simultaneamente nos detectores de Índice de Refração (RID-10A) e Arranjo de Fotodiodos (SPD-M20A), programado em comprimento de onda fixo de  $215 \text{ nm}$  e no modo de varredura de  $200$  a  $400 \text{ nm}$ . A aquisição e processamento dos dados foram realizados com o auxílio do Software Shimadzu LCsolution (Kyoto, Japão) (Reuter, 2015).

#### 4.2.5 Análise Sensorial

A análise sensorial foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina (Anexo 1), sendo a análise realizada no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da UEL (Anexos 2, 3 e 4). As amostras estavam de acordo com o critério higiênico-sanitário exigido pela legislação vigente (Brasil, 2001).

O teste de aceitação foi realizado para avaliar a formulação final dos leites fermentados (48 h) utilizando uma escala hedônica estruturada de nove pontos (Stone e Sidel, 2004) os atributos cor, aroma, textura, sabor e aceitação global foram determinados a partir da participação de 76 provadores não treinados que receberam as amostras codificadas, destes 61,84 % tinham até 25 anos, 27,63 % de 26 a 35 anos e 10,53 % acima de 35 anos.

As amostras foram constituídas de leite fermentado por *L. plantarum* ou *L. helveticus* adicionado de FBV, e por se tratar de um produto diferenciado para o qual a população não tem o hábito de consumo, e com o intuito de melhorar o sabor após o processo fermentativo (48 h) adicionou-se assepticamente 16 % (m/v) de sacarose comercial refinada e 0,06 % (v/v) de essência de banana de acordo com Burkert et al, (2012) com modificações. As amostras foram servidas refrigeradas a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  em quantidades padronizadas (30 mL).

#### 4.2.6 Análise Estatística

As análises foram realizadas em duplicata e os resultados médios expressos com o desvio padrão. Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias ao nível de 5 % de significância utilizando o programa Statistica 8.0 (StatSoft<sup>®</sup> Inc, 2008).

### 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Análise de Cor

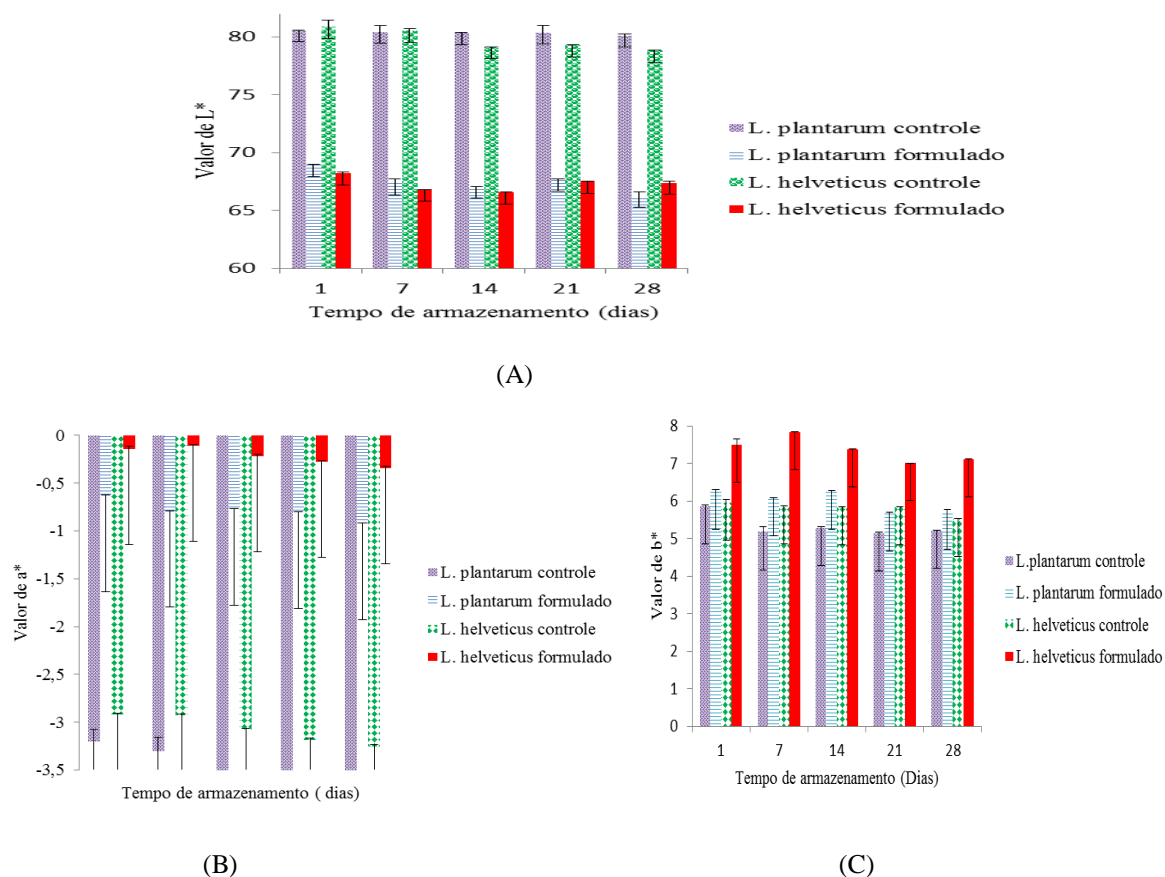
A cor nos alimentos é um atributo importantíssimo, é o primeiro atributo percebido pelos consumidores e assim, pode ter influência direta na preferência no momento da compra (Mani-López et al., 2014). Ao analisar os parâmetros de cor (Figura 1) as diferenças eram esperadas uma vez que cada fermentado poderia gerar um perfil diferenciado, assim como apresentar variação durante o período de armazenamento.

Na Figura 1A observa-se para o componente luminosidade ( $L^*$ ) que os maiores valores médios ( $P \leq 0,05$ ) foram obtidos para os tratamentos controle por *L. plantarum* ( $80,36 \pm 0,17$ ) e para o fermentado por *L. helveticus* ( $79,71 \pm 0,27$ ) seguido pelos tratamentos formulados e fermentados por *L. plantarum* ( $67,46 \pm 0,15$ ) e por *L. helveticus* ( $67,28 \pm 0,06$ ), resultados esses relacionados principalmente à adição de FBV, que torna os fermentados formulados mais escuros.

Ao considerar a influência do período de armazenamento observa-se que, com exceção do controle fermentado por *L. plantarum* que manteve-se constante, os demais tratamentos diminuíram ( $P \leq 0,05$ ) a luminosidade em relação ao tempo inicial. Os leites fermentados foram acondicionados em embalagens de vidro transparente, e assim pode ter ocorrido passagem de luz que interfere na coloração por ação do processo de escurecimento oxidativo, pois a presença de compostos fenólicos na FBV, a torna suscetível à reação de escurecimento causada pelas enzimas peroxidase e polifenoloxidase (Rolim et al., 2010).

Com relação ao valor do parâmetro  $a^*$  (Figura 1B), o formulado fermentado por *L. plantarum* ( $-0,79 \pm 0,71$ ) e por *L. helveticus* ( $-0,21 \pm 0,14$ ) são mais vermelhos seguidos pelos controles fermentados por *L. helveticus* ( $-3,08 \pm 0,35$ ) ou por *L. plantarum* ( $-3,53 \pm 0,30$ ) respectivamente.

Observa-se pelo parâmetro  $b^*$  (Figura 1C) que o formulado fermentado por *L. helveticus* ( $7,38 \pm 0,70$ ) é mais amarelo ( $P \leq 0,05$ ) em relação demais tratamentos, seguido em ordem decrescente pelo formulado fermentado por *L. plantarum* ( $6,07 \pm 0,20$ ) e os controles fermentados por *L. helveticus* ( $5,83 \pm 0,35$ ) e por *L. plantarum* ( $5,21 \pm 0,30$ ) respectivamente.



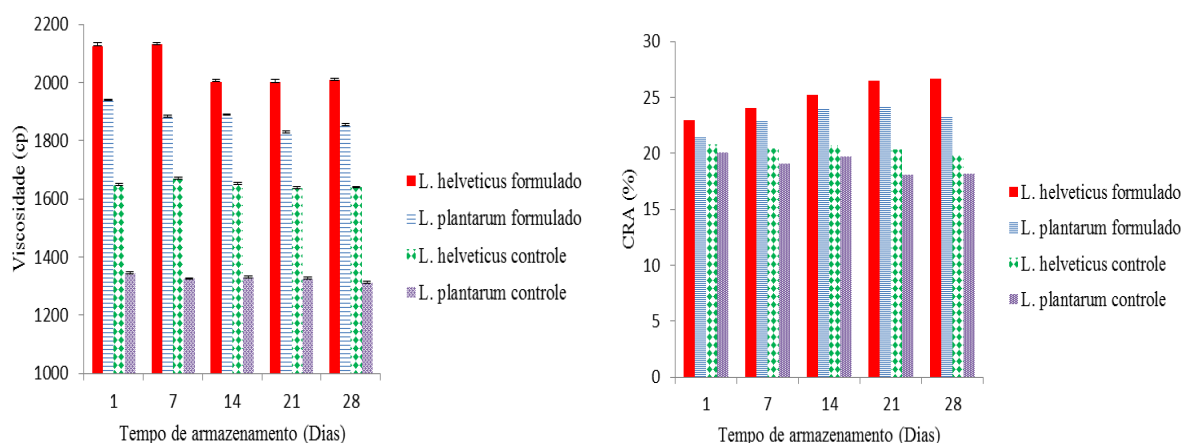
**Figura 1.** Análise do efeito do armazenamento de 28 dias a 4 °C sobre os parâmetros de cor em leites fermentados. Leite fermentado controle: *L. plantarum* ou *L. helveticus* sem adição de FBV, açúcar e essência; Leite formulado fermentado por *L. plantarum* ou *L. helveticus* adicionado de 1,08% (m/v) FBV, 16 % (m/v) de sacarose e 0,06 % (v/v) de essência de banana. Valor de L\* (Figura A), valor de a\* (Figura B) e valor de b\* (Figura C). L\* = Luminosidade (0- preto 100-branco); a\* (+a indica vermelho e -a indica verde); b\* (+b indica amarelo e -b indica azul).

De maneira geral, os formulados fermentados por *L. helveticus* e *L. plantarum* foram mais amarelos, mais vermelhos e mais escuros em relação aos controles fermentados ( $P \leq 0,05$ ). Estes resultados corroboram com o relatado por Wang et al., (2012) que observaram diferenças após a adição de FBV em snacks, e Kumar et al. (2013) que relataram alterações significativas nos parâmetros de cor de *Nuggets* de frango com a adição de FBV em relação ao controle.

Ao avaliarem os parâmetros de cor durante o armazenamento em iogurte probiótico Mani-López et al. (2014) não observaram diferenças. Poucos são os estudos que descrevem a cor de leites fermentados e se as diferenças de cor podem estar presentes ou não durante a fermentação e armazenamento, assim este estudo é importante por ser o primeiro relato de leite fermentado adicionado de FBV analisando os parâmetros de cor.

#### 4.3.2 Análise de Viscosidade Aparente e CRA

A viscosidade aparente de um produto é uma propriedade reológica que influencia de forma significativa a aceitação e a intenção de compra dos consumidores (Lucatto, 2013). Assim por sua importância foram feitas determinações de viscosidade aparente nos fermentados durante o período de armazenamento de 28 dias a 4 °C (Figura 2 a), assim como a análise de CRA (Figura 2b).



**Figura 2.** Análise de viscosidade aparente (a) e CRA (b) em leites fermentados controle: Leite fermentado com *L. plantarum* ou *L. helveticus* sem adição de FBV, açúcar e essência; Formulado: Leite fermentado com *L. plantarum* ou *L. helveticus* adicionado de 1,08 % (m/v) FBV, 16 % (m/v) de sacarose e 0,06 % (v/v) de essência de banana.

As maiores médias ( $P \leq 0,05$ ) para viscosidade em cP foram observadas para o formulado fermentado por *L. helveticus* ( $2054,3 \pm 0,33$ ) seguido do fermentado por *L. plantarum* ( $1878,6 \pm 0,47$ ) e na sequência o fermentado controle por *L. helveticus* ( $1647,9 \pm 0,73$ ) apresentou-se mais viscoso ( $P \leq 0,05$ ) em relação ao fermentado controle por *L. plantarum* ( $1326,9 \pm 0,81$ ).

Esse mesmo comportamento foi observado em relação à CRA, onde os formulados fermentados por *L. helveticus* ( $25,22 \pm 0,26$ ) ou por *L. plantarum* ( $23,26 \pm 0,41$ ) apresentaram maior CRA ( $P \leq 0,05$ ) seguidos por fermentados controle *L. helveticus* ( $20,44 \pm 0,47$ ) e *L. plantarum* ( $19,05 \pm 0,69$ ).

Esses resultados podem estar relacionados ao maior teor de sólidos totais presentes nos tratamentos formulados, que foram compostos do leite fermentado com FBV adicionados de sacarose e essência de banana, pois segundo (Walde et al., 2005) a farinha, que contém amido, interfere diretamente na textura, nas características sensoriais, na CRA e na viscosidade.

Entre os tratamentos, o fermentado por *L. helveticus* apresentou a maior viscosidade aparente e maior CRA, e isso pode estar relacionado ao fato do *L. helveticus* ter a capacidade de produzir exopolissacarídeos (EPS) (Li et al., 2014) que tem ação em diversas propriedades tecnológicas, entres estas, a viscosidade (Silva et al., 2012; Mende et al., 2016), além do que, os EPS podem interagir com a água, com as redes proteicas, os minerais entre outros compostos presentes nos leites fermentados (Purohit et al., 2009; Mende et al., 2016).

Adicionalmente a viscosidade, pode estar relacionado à produção de ácido láctico, que em pH baixo colabora para que haja agregação das proteínas do soro e desestabilização das micelas de caseína, e, portanto, acréscimo na viscosidade (Sodini et al., 2005). Isso também esclarece a diferença de viscosidade entre os tratamentos já que os valores médios de pH durante o armazenamento foram menores nos formulado e controle fermentados por *L. helveticus* com  $3,59 \pm 0,07$  e  $3,64 \pm 0,03$  respectivamente em relação ao formulado e controle fermentados por *L. plantarum* com  $4,73 \pm 0,02$  e  $4,94 \pm 0,05$ , e a produção de ácido láctico foi maior no fermentado por *L. helveticus* (Figura 4).

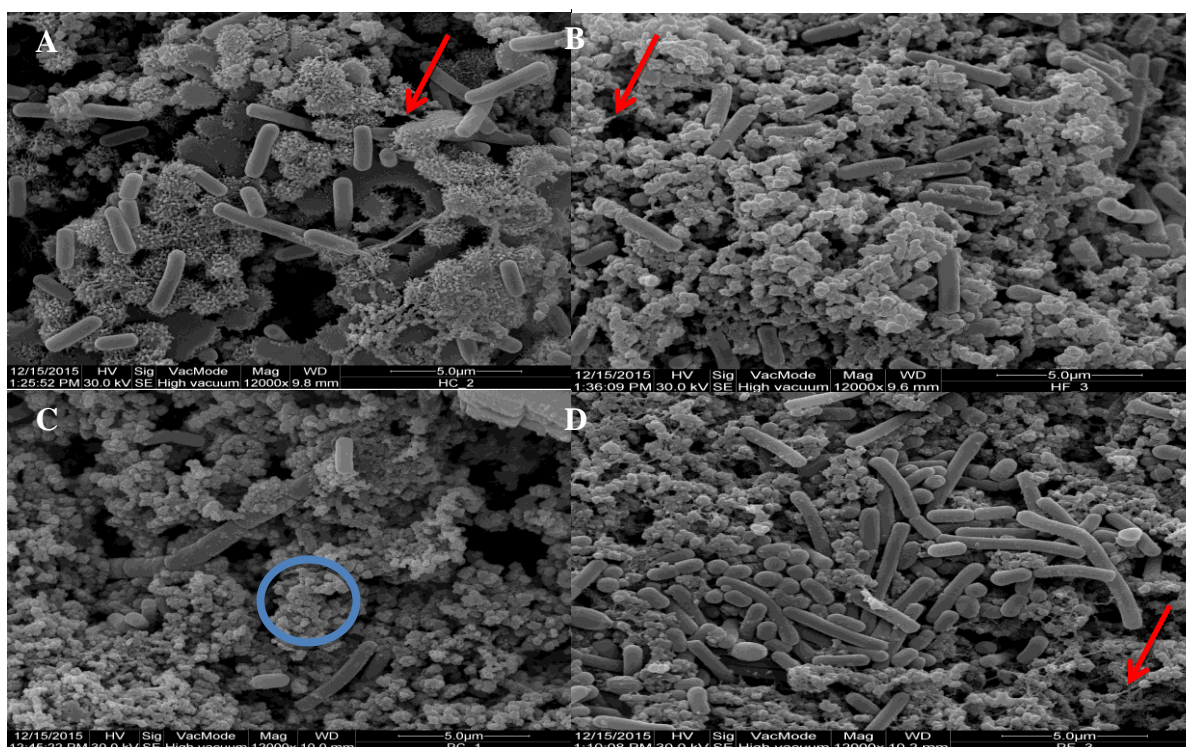
O tempo de armazenamento (dias) exerceu influência na viscosidade aparente de todos os tratamentos. Os formulados fermentados por *L. helveticus* e controle apresentaram aumento na viscosidade ( $P \leq 0,05$ ) no início do armazenamento (1-7 dias) seguido de posterior diminuição ( $P \leq 0,05$ ) e estabilidade (14-28 dias). Para o formulado fermentado por *L. plantarum* a viscosidade diminuiu ( $P \leq 0,05$ ) com os dias de armazenamento, e o fermentado controle por *L. plantarum* manteve-se estável do 7º até o 28º dia de armazenamento ( $P \geq 0,05$ ). O aumento na viscosidade no início do armazenamento seguido de uma redução, está de acordo com o relatado em bebidas lácteas por Gomes et al. (2013) e em iogurte probiótico relatado por Wang et al. (2012).

De acordo com Raimundo et al. (2007) durante o armazenamento pode ocorrer diminuição da viscosidade, em decorrência do consumo de açúcares pelos microrganismos, pela ruptura das interações existentes e diminuição de interação entre as moléculas, o que esclarece a diminuição da viscosidade no decorrer do armazenamento no presente estudo.

Em relação à CRA, o controle fermentado por *L. plantarum* manteve o valor constante até o 14º dia ( $P \geq 0,05$ ), e no fermentado por *L. helveticus* o parâmetro teve alteração até o 21º dia ( $P \leq 0,05$ ). No formulado fermentado por *L. plantarum* a CRA manteve-se constante do 14º ao 28º dia ( $P \geq 0,05$ ) de armazenamento. Em formulado fermentado por *L. helveticus*, porém, o comportamento foi diferente dos demais tratamentos, com aumento na CRA ( $P \leq 0,05$ ) com o tempo de armazenamento.

### 4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise de microscopia eletrônica de varredura permitiu visualizar a concentração de células de bactérias *L. plantarum* e *L. helveticus* em leites fermentados com e sem adição de farinha de FBV durante 48 h (Figura 3, 12,000x).



**Figura 3.** Microscopia eletrônica de varredura em leites fermentados durante 48h; Controle: leite fermentado com *L. helveticus* (A) e *L. plantarum* (C) sem adição de FBV; Formulado: leite fermentado com *L. helveticus* (B) e *L. plantarum* (D) com adição de 1,08 % (m/v) de FBV. Setas: EPS; Círculo: Micelas de caseína.

É possível observar a presença de bactérias lácticas *L. helveticus* e *L. plantarum* em todos os fermentados (Figura 3 A, B, C e D), indicando que os compostos presentes na matriz alimentar e o processo fermentativo contribuíram positivamente para o crescimento celular.

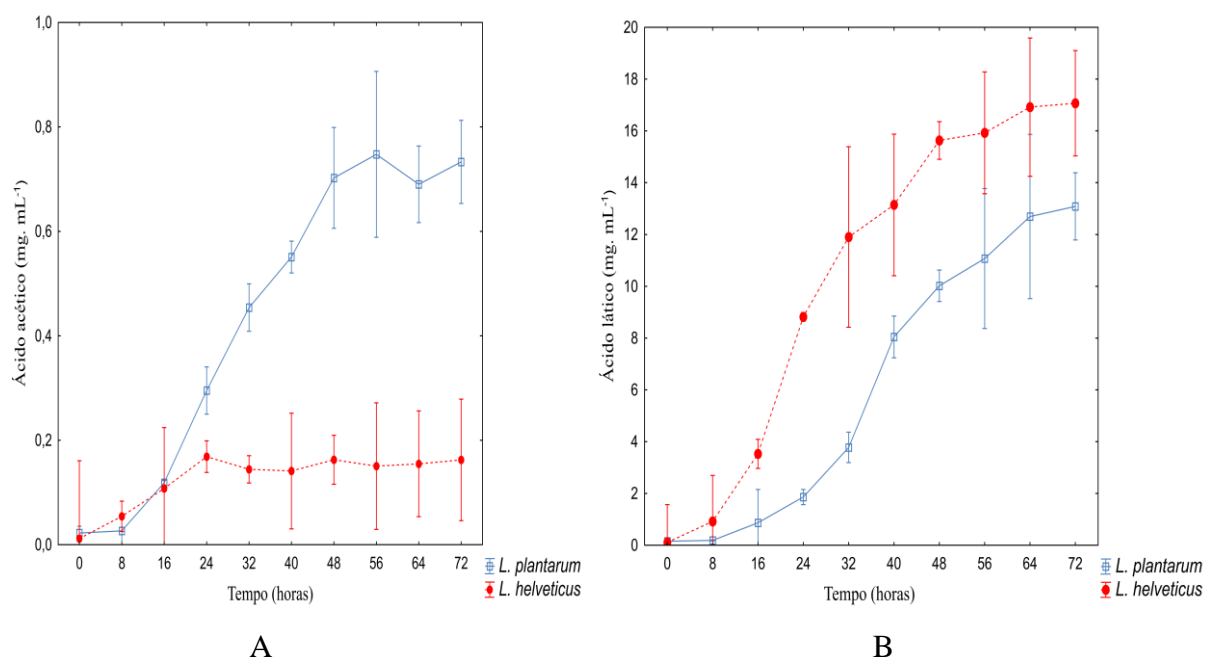
As BAL tem a capacidade de produzir polissacarídeos, os EPS, e embora neste estudo não tenham sido quantificados, observa-se a presença destes (Figura 3 A, B e D), assim como observado por Guergoletto et al. (2010). A produção de EPS é muito importante e benéfica, pois apresenta entre outras funcionalidades a de proteção celular contra desidratação, fagocitose, ataque de bacteriófagos, antibióticos ou compostos tóxicos e estresse osmótico (Ruas-Madiedo et al., 2002).

Costa et al. (2014) e Pang et al. (2016) reportam que para cada grânulo de diferente tamanho é possível atribuir a existência de milhares de partículas coloidais aglomeradas e

fundidas entre si formando uma estrutura maior, esses grânulos, de acordo com Fox e McSeeney (1998), são as micelas de caseínas aglomeradas e constituídas por submicelas e cada submicela apresenta em sua estrutura as proteínas do leite ( $\alpha$ s 1-caseína,  $\alpha$ s 2- caseína,  $\kappa$ -caseína e  $\beta$ -caseína), corroborando com o visualizado no presente estudo (Figura 3).

#### 4.3.4 Ácidos Orgânicos

Os ácidos orgânicos estão entre os produtos finais do metabolismo de carboidratos produzidos por BAL, e observa-se os perfis de produção dos ácidos acético (Figura 4a) e láctico (Figura 4b) nos fermentados durante 72 h. A produção de ácido láctico aumentou gradual e significativamente ( $P \leq 0,05$ ) em ambos os fermentados, sendo maior ( $P \leq 0,05$ ) no fermentado por *L. helveticus* com  $17,17 \text{ mg. mL}^{-1}$  em relação ao fermentado por *L. plantarum* que foi de  $13,09 \text{ mg. mL}^{-1}$ .



**Figura 4.** Produção de ácido acético (a) e láctico (b) em leites fermentados por *L. helveticus* e por *L. plantarum* com adição de 1,08 % (m/v) de FBV durante a fermentação de 72 h.

Maior concentração de ácido acético foi observada no fermentado por *L. plantarum* em 56 h que foi de  $0,74 \text{ mg. mL}^{-1}$ , diferindo significativamente do fermentado por *L. helveticus* que alcançou em 24 h de fermentação o maior valor com  $0,15 \text{ mg. mL}^{-1}$  mantendo-se constante ( $P \geq 0,05$ ) até o final da fermentação.

A diferença observada na produção dos ácidos láctico e acético pelos microrganismos está provavelmente relacionada ao metabolismo diferenciado, pois o *L. plantarum* é considerado heterofermentativo facultativo e assim tem como principais produtos finais a

produção de ácido láctico, acético, dióxido de carbono e etanol (Ouweland e Salminen, 1998), já o *L. helveticus* é classificado como homofermentativo obrigatório (Kandler, 1983) o que o torna eficiente em metabolizar carboidratos gerando energia que é subsequentemente utilizada para a biossíntese de ácido láctico.

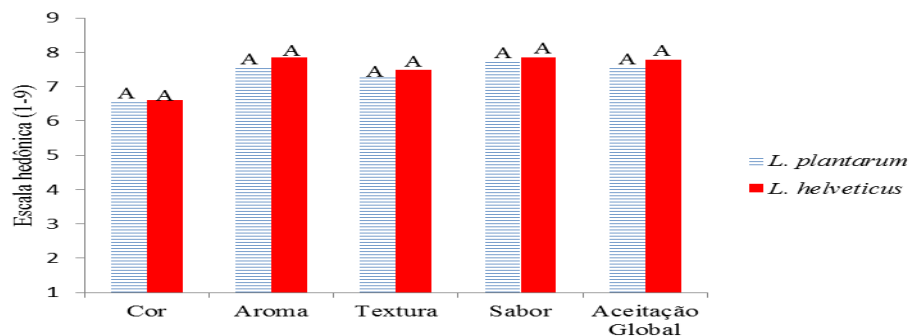
A produção dos ácidos em especial o láctico é essencial em leites fermentados, pois confere o sabor acentuado ácido e refrescante característico dos fermentados, no entanto, a concentração de ácidos orgânicos nos fermentados depende de algumas variáveis como: cultura starter, tipo de leite, tempo e temperatura de incubação (Akalin et al., 1997) e neste estudo também devido aos demais ingredientes da formulação.

Nossos resultados diferem dos relatados por Bian et al., (2016) em extrato de soja fermentado por *L. helveticus* KLDS1.8701 onde ao final de 24 h de fermentação os valores foram de 11,08 mg. mL<sup>-1</sup> de ácido láctico e 2,16 mg. mL<sup>-1</sup> de ácido acético e do estudo de Poppi et al., (2015) com *L. plantarum* 22c cultivado em meio MRS, relataram valores de 18,5 mg. mL<sup>-1</sup> e 4,2 mg. mL<sup>-1</sup> respectivamente, mas como citado anteriormente, a concentração dos ácidos é dependente de diversos fatores o que esclarece essas diferenças.

#### 4.3.5 Análise Sensorial

O objetivo da análise sensorial neste estudo foi verificar a aceitação dos leites formulados fermentados por *L. plantarum* ou *L. helveticus* e, portanto utilizou-se a escala hedônica estruturada de nove pontos que de acordo com Stone e Sidel, (1993) é possivelmente o método afetivo mais utilizado devido à confiabilidade e validade de seus resultados, assim como a simplicidade para ser utilizada pelos provadores.

O leite fermentado é caracterizado como um gel viscoso e suave, com gosto ligeiramente ácido e refrescante, e, portanto, deve ser avaliado em termos de aparência, sabor, textura e aceitação global (Hekmat e Reid, 2006). Os escores médios da avaliação sensorial do leite fermentado estão apresentados na Figura 5.



**Figura 5.** Avaliação dos atributos sensoriais (escala de 1-9). Médias (n= 76) seguidas de letras iguais não diferem entre os tratamentos pelo teste T a 5 % de significância. Leite fermentado por *L. plantarum* ou *L. helveticus* adicionado de 1,08 % (m/v) de FBV, 16 % (m/v) de sacarose e 0,06 % (v/v) de essência de banana.

Entre os julgadores, 98,68 % afirmaram consumir leite fermentado e apenas 1,32 % declaram não consumi-lo. No entanto, quando questionados quanto ao consumo de produtos contendo FBV 11,84 % afirmaram consumir ocasionalmente e 88,16 % afirmaram não consumir.

Os provadores não encontraram diferença ( $P \geq 0,05$ ) entre os leites formulados fermentados por *L. plantarum* ou *L. helveticus* para nenhum dos atributos avaliados. Em ambas as formulações, os atributos sabor e aroma obtiveram as maiores médias. Os escores para o sabor foram  $7,79 \pm 1,23$  para o fermentado por *L. plantarum* e  $7,87 \pm 1,19$  para o fermentado por *L. helveticus*; para o aroma foram de  $7,60 \pm 1,38$  para o fermentado por *L. plantarum* e  $7,85 \pm 1,18$  para o *L. helveticus*, o que corresponde na escala hedônica a gostei regularmente.

De acordo com o reportado pelos provadores o sabor mais acidificado presente no leite fermentado por *L. helveticus* (pH de  $3,55 \pm 0,07$ ) em relação ao fermentado por *L. plantarum* (pH de  $4,07 \pm 0,04$ ) lembrava os leites fermentados comerciais, sendo que o sabor é uma das propriedades mais importantes na aceitabilidade e preferência dos alimentos pelo consumidor (Cheng, 2010).

Entre os atributos avaliados a cor foi a que obteve a menor média que foi de  $6,6 \pm 1,65$  isso pode ser devido ao fato do consumidor estar habituado aos leites fermentados comerciais. No entanto, ambos os fermentados obtiveram altos índices de aceitação, média de 88 %, não fazendo-se necessária a eventual adição de corantes.

Os fermentados formulados tiveram os parâmetros de cor influenciados principalmente pela adição da FBV, no entanto na análise sensorial, a cor obteve média de  $6,6 \pm 1,65$  o que corresponde a gostei ligeiramente, sendo considerado um bom resultado por ser um leite fermentado ao qual o consumidor não está habituado a consumir.

Os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com os relatados por Alencar et al., (2014) ao avaliarem a aceitabilidade de brigadeiro com biomassa de banana verde e por Oloyede et al., (2013) que ao avaliarem a aceitabilidade de pães com diferentes níveis de inclusão de farinha de banana não encontraram diferença significativa.

Os resultados obtidos na análise sensorial dos leites fermentados foram satisfatórios, com boa aceitação principalmente por ser um produto adicionado de FBV que não são consumidos habitualmente. A média de aceitação global para o fermentado por *L. helveticus* foi de  $7,79 \pm 0,88$  e para o fermentado por *L. plantarum*  $7,58 \pm 0,95$ , superior à relatada por Silva e Araújo, (2009) ao avaliarem suco enriquecido com polpa de banana verde relataram valor médio de 6,80 e também superior ao reportado por Lucatto (2013) que ao avaliar iogurte simbiótico adicionado de polpa de banana relataram aceitação global inferior a 70 %.

#### 4.4 CONCLUSÃO

A fermentação por *L. helveticus* promoveu elevada produção de ácido lático enquanto que a concentração de ácido acético foi maior no fermentado por *L. plantarum*, essa produção é muito importante, pois contribui diretamente com atributos sensoriais do produto. Com a análise de microscopia eletrônica foi possível visualizar a concentração de bactérias ácido lácticas em ambos os fermentados. No teste sensorial os provadores não encontraram diferenças entre os leites fermentados por *L. plantarum* ou *L. helveticus* para nenhum dos atributos avaliados e a aceitação global foi positiva, superior a 70%, indicando que ambos os fermentados possuem perfis tecnológicos e sensoriais satisfatórios.

#### Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela ajuda sob a forma de bolsa de estudos.

#### 4.5 REFERÊNCIAS

Alencar, LO., Santos, EDS., Fernandes, ACCF (2014). Desenvolvimento, aceitabilidade e valor nutricional de brigadeiro com biomassa de banana verde. *Revista Interdisciplinar*, 7, 91-98.

Akalin, AS., Kinik, O., Gonc, S (1997). Determination of organic acids in commercial cheeses by high-performance liquid chromatography. *Milchwissenschaft*, 54, 260–62.

Ahtesh, F., Stojanovska, L., Shah, N., Mishra, VK (2016). Effect of Flavourzyme® on Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Formed in Skim Milk and Whey Protein Concentrate during Fermentation by *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Food Science*, 81, 135-143.

Baú, TR., Silva, LC. Da., Garcia, S., Ida. EI (2012). Propriedades funcionais tecnológicas das fibras de soja, aveia e trigo e produtos de soja com adição de fibras e fermentados com cultura de kefir. *Semina: Ciências Agrárias*, 33, 3093-3102.

Bian, X., Muhammad, Z., Evivie, SE., Luo, GW., Xu, M., Huo, GC (2016). Screening of antifungal potentials of *Lactobacillus helveticus* KLDS 1.8701 against spoilage microorganism and their effects on physicochemical properties and shelf life of fermented soybean milk during preservation. *Food Control*, 66, 183-189.

Burkert, JFM., Fonseca, RAS., Moraes, JO., Sganzerla, J., Kalil, SJ., Burkert, CAV (2012). Sensory acceptance of dairy drinks potentially symbiotic. *Brazilian Journal Food Technology*, 15, 325-332.

Bhardwaj, G., Singh, B (2014). Anti-oxidative potential of bioactive peptides released during fermentation of bovine milk with Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Cell Science and Biotechnology*, 3.

Brasil. Ministério da saúde Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial Republica Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília, DF, 10 jan 2001.

Caldeira, LA. Ferrão, SPB., Fernandes, SAD., Magnavita, APA., Santos, TDR (2010). Desenvolvimento de bebida láctea sabor morango utilizando diferentes níveis de iogurte e soro de lácteo obtidos com leite de búfala. *Ciência Rural*, 40, 2193-2198.

Casarotti, SN., Monteiro, DA., Moretti, MMS., Penna, ALB (2014). Influence of the combination of probiotic cultures during fermentation and storage of fermented milk. *Food Research International*, 59, 67–75.

Casarotti, SN., Penna, ALB (2015). Acidification profile, probiotic in vitro gastrointestinal tolerance and viability in fermented milk with fruit flours. *International Dairy Journal*, 41, 1-6.

Costa, FF., Resende, JV. de., Abreu, LR. De (2014). Investigação microscópica da estrutura do leite adicionado de polissacarídeos. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 32, 145-150.

Cheng, H (2010). Volatile flavor compounds in yogurt: A review. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 938–950.

Choo, L. C., Aziz, NAA (2010). Effects of banana flour and b-glucan on the nutritional and sensory evaluation of noodles. *Food Chemistry*, 119, 34-40.

Elfahri, KR., Vasiljevic, T. Yeager, T., Donkor, ON (2016). Anti-colon cancer and antioxidant activities of bovine skim milk fermented by selected *Lactobacillus helveticus* strains. *Journal of Dairy Science*, 99, 31–40.

Fox, PF., Mcsweeney, PLH (1998). Dairy chemistry and biochemistry. (487 p) London: Blackie Academic & Professional.

Gomes, JLL., Duarte, AM., Batista, ASM., Figueiredo, RMF., Sousa, EP., Souza, EL., et al (2013). Physicochemical and sensory properties of fermented dairy beverages made with goat's milk, cow's milk and a mixture of the two milks. *LWT - Food Science and Technology*, 54, 18–24.

Guergoletto, KB., Magnani, M.; San Martin, J.; Andrade, CGT. de J., Garcia, S. (2010). Survival of *Lactobacillus casei* (LC-01) adhered to prebiotic vegetal fibers. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 415–421.

Hekmat, S., Reid, G (2006). Sensory properties of probiotic yogurt is comparable to standard yogurt. *Nutrition Research*, 26, 163–166.

Jeong, J-U., Song, M., Kim, Y., Kim, K-H., Kang, J., Oh, S (2015). Characterisation and partial purification of an antimutagenic peptide produced by *Lactobacillus plantarum* JNU 2116. *International Journal of Dairy Technology*, 68, 582-588.

Kilpi, ER., Kahalaa, MM., Steeleb, JL., Pihlantoa, AM., Joutsjokia, VV (2007). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in milk fermented by wild-type and peptidase-deletion derivatives of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32E. *International Dairy Journal*, 17, 976–984.

Kumar, V., Biswas, AK., Sahoo, J., Chatli, MK., Sivakumar, S (2013). Quality and storability of chicken nuggets formulated with Green and soybean hulls flours. *Journal Food Science Technology*, 50, 123-134.

Kandler, O (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49, 209-224.

Li, W., Tang, W., Ji, J., Xia, X., Ruj, X., Chen, X., et al (2015). Characterization of a novel polysaccharide with anti-colon cancer activity from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Carbohydrate Research*, 411, 6–14.

Lucatto, JN (2013). *Produção e caracterização de iogurte simbiótico sabor banana, obtido a partir de leite de vaca e de cabra, cultura probiótica e polpa de banana verde* (112p). Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Mani-López, E, Palou, E., López-Malo, A (2014). Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 97, 2578-2590.

Mende, S., Rohm, H., Jaros, D (2016). Influence of exopolysaccharides on the structure, texture, stability and sensory properties of yoghurt and related products. *International Dairy Journal*, 52, 57-71.

Oloyede, OO., Ocheme, OB., Nurudeen, LM (2013). Physical, sensory and microbiological properties of wheat-fermented unripe plantain flour. *Nigerian Food Journal*, 31, 123-129.

Ouwehand, AC., Salminen, SJ (1998). The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *International Dairy Journal*, 8, 749-758.

Pang, Z., Deeth, H., Prakash, S., Bansal, N (2016). Development of rheological and sensory properties of combinations of milk proteins and gelling polysaccharides as potential gelatin replacements in the manufacture of stirred acid milk gels and yogurt. *Journal of Food Engineering*, 169, 27-37.

Piana, ML., Persano, LO., Bentabol, A., Bruneau, E., Bogdanov, S., Guyot, CD (2004). Sensory analysis applied to honey: state of the art. *Apidologie*, 35, 26-37.

Poppi, LB., Rivaldi, JD., Coutinho, TS., Astolfi-Ferreira, CS., Ferreira, AJP., Mancilha, IM (2015). Effect of *Lactobacillus* sp. isolates supernatant on *Escherichia coli* O157:H7 enhances the role of organic acids production as a factor for pathogen control. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35, 353-359.

Purohit, DH., Hassan, AN., Bhatia, E., Zhang, X., Dwivedi, C (2009). Rheological, sensorial, and chemopreventive properties of milk fermented with exopolysaccharide-producing lactic cultures. *Journal of Dairy Science*, 92, 847-856.

Raimundo, E., Krüger, R.L., Di Luccio, M., Cichoski, A.J (2007). Cor, viscosidade e bactérias lácticas em suco de laranja pasteurizado e submetido ao efeito da luz durante o armazenamento. *Alimentos e Nutrição*, 18, 449-456.

Rebello, LPG., Ramos, AM., Pertuzatti, PB., Barcia, MT., Castillo-Muñoz, N., Hermosín-Gutiérrez, I (2014). Flour of banana (*Musa* AAA) peel as a source of antioxidant phenolic compounds. *Food Research International*, 55, 397-403.

Rolim, PM.; Salgado, SM.; Padilha, VM.; Livera, AVS.; Guerra, NB.; Andrade, SAC. (2010). Análise de componentes principais de pães de forma formulados com farinha de yacon. *Revista Ceres*, 57, 12-17.

Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., Zoon, P (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12, 163-171.

Serra, M., Trujillo, AJ., Guamis, B., Ferragut, V (2009). Flavour profiles and survival of starter cultures of yoghurt produced from high-pressure homogenized milk. *International Dairy Journal*, 19, 100–106.

Silva, ARA., Araújo, DG (2009). Suco tropical enriquecido com polpa de banana (*Musa spp.*) verde tropical. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 3, 47-55.

Sodini, I., Mattas, J., Tong, PS (2006). Influence of pH and heat treatment of whey on the functional properties of whey protein concentrates in yoghurt. *International Dairy Journal*, v.16, .1464-1469.

- Stone, HS.; Sidel, JL (1993). Sensory evaluation practices (308p). San Diego: Academic Press.
- Stone, H., Sidel, JL (2004). Descriptive Analysis. In: STONE, H.; SIDEL, J. L. Sensory evaluation practices (p. 215-235). San Diego: Elsevier Academic Press.
- Ulyatu, F., Pudji, H., Tyas, U., Umar, S. (2015). The changes of sesaminol triglucoside and antioxidant properties during fermentation of sesame milk by *Lactobacillus plantarum* Dad 13. *International Food Research Journal*, 22, 1945-1952.
- Vernaza, GM., Gularte, MA., Chang, YK (2011). Addition of green banana flour to instant noodles: Rheological and technological properties. *Ciências e Agrotecnologia*, 35, 1157-1165.
- Wang, Y., Zhang, M., Mujumdar, AS (2012). Influence of green banana flour substitution for cassava starch on the nutrition, color, texture and sensory quality in two types of snacks. *LWT - Food Science and Technology*, 47, 175–182.
- Wang, W., Bao, Y., Hendricks, GM., Guo, M (2012). Consistency, microstructure and probiotic survivability of goats' milk yoghurt using polymerized whey protein as a co thickening agent. *International Dairy Journal*, 24, 113-119.
- Walde, SG., Tummala, J., Lakshminarayan, SM., Balaramn, M (2005). The effect of rice flour on pasting and particle size distribution of green gram (*Phaseolus radiate*) dried batter. *International Journal of Food Science and Technology*, 40, 935-942.

## CONCLUSÃO GERAL

Os valores da composição química da FBV foram adequados, com conteúdo de fibra total de 18,24 g.100 g<sup>-1</sup> e amido resistente de 10,6 % ± 0,88. O processo fermentativo por *L. helveticus* e *L. plantarum* foi eficaz e contribuiu significativamente em todas as variáveis analisadas. A adição de FBV ao processo fermentativo como fonte de AR, fibras e compostos fenólicos foi positiva e favoreceu de maneira significativa o desenvolvimento celular, cujas condições para o máximo crescimento foram temperatura de 29 °C para o fermentado por *L. helveticus* e de 27 °C para o fermentado por *L. plantarum*, adição de 1,08 % de FBV e fermentação por 48 h, com contagem média de bactérias lácticas totais no fermentado por *L. plantarum* de 10,01 ± 0,09 log UFC. mL<sup>-1</sup> e no fermentado por *L. helveticus* de 9,33 ± 0,04 log UFC. mL<sup>-1</sup>.

Aos fermentados otimizados foram adicionados 16 % (m/v) de sacarose e 0,06 % (v/v) de essência de banana, que não interferiu nas características físico-químicas, durante o período de estocagem de 28 dias a 4 °C, assim como as contagens mantiveram-se adequadas apresentando ao final do armazenamento, sendo de 8 ciclos log para o fermentado por *L. helveticus* e 9 ciclos log para o fermentado por *L. plantarum*, e na análise de sobrevivência sob condições gastrointestinais o fermentado formulado por *L. helveticus* foi mais resistente com 5,16 ± 0,04 log UFC mL<sup>-1</sup> e o fermentado formulado por *L. plantarum* com 4,91 ± 0,05 log UFC. mL<sup>-1</sup>.

A FBV apresentou conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante que incidiu em maior atividade antioxidante nos fermentados adicionados de FBV em relação ao controle, sendo esta mantida durante o armazenamento em ambos os fermentados.

O fermentado por *L. helveticus* foi mais eficiente em relação ao fermentado por *L. plantarum* na atividade proteolítica, na atividade inibitória de ACE, assim como apresentou melhor capacidade de proteção ao DNA plasmidial. Em relação à produção de ácidos orgânicos, o fermentado por *L. helveticus* apresentou alta concentração de ácido lático enquanto que o fermentado por *L. plantarum* produziu mais ácido acético, a geração destes ácidos é muito positiva, pois influencia diretamente no aroma e sabor dos fermentados. Os resultados da análise sensorial de aceitação foram satisfatórios com elevada aceitação global indicando que ambos os fermentados possuem perfis tecnológicos e sensoriais satisfatórios.

Portanto, conclui-se que o desenvolvimento de leites fermentados adicionados de FBV é de grande valia no aporte de antioxidantes e peptídeos com atividades biológicas que podem proporcionar efeitos benéficos para a saúde dos consumidores.

ANEXOS

## ANEXO 1: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - UEL



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**  
**Universidade Estadual de Londrina**  
 Registro CONEP 5231

<b>Parecer CEP/UEL:</b>	139/2014
<b>CAAE:</b>	33897714.6.0000.5231
<b>Data da Relatoria:</b>	06/08/2014
<b>Pesquisador(a):</b>	Sandra Garcia
<b>Unidade/Órgão:</b>	CCA - Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos

Prezado(a) Senhor(a):

O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 5231) – de acordo com as orientações da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

**"Estudo de bactérias lácticas em sistema leite-amido de banana verde."**

Situação do Projeto: **Aprovado**

Informamos que deverá ser comunicada por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL, via Plataforma Brasil, relatório final da pesquisa.

Londrina, 11 de agosto de 2014.

  
**Prof. Dra. Paula Mariza Zedu Alliprandini**  
 Vice-coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos  
 Universidade Estadual de Londrina



**ANEXO 2: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO NA FORMA DE CONVITE PARA OS PROVADORES DO LEITE FERMENTADO NO TESTE DE ACEITAÇÃO**

Prezado (a) Senhor (a):

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa **“Desenvolvimento, otimização e estabilidade de leite fermentado com bactérias lácticas e farinha de banana verde”** realizada no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/UEL, Londrina/PR. O objetivo da pesquisa é desenvolver um produto fermentado com adição de farinha de banana verde e bactérias ácido lácticas, que apresente boa aceitação sensorial. A sua participação é muito importante, você participará como provador e irá consumir leites fermentados formulados e será solicitado a dar sua opinião sobre o quanto gostou dos produtos apresentados, avaliando os atributos cor, aroma, textura, sabor e aceitação global. Será realizada uma sessão e você poderá fazê-la no horário que tiver maior disponibilidade. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar (Prof<sup>a</sup> Sandra Garcia, DCTA/UEL, [sgarcia@uel.br](mailto:sgarcia@uel.br)), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid-PR 445, Km 380 - *Campus Universitário*, ou no telefone 3371-5455. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada e entregue a você.

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2015

**Pesquisador Responsável**

Sandra Garcia  
Prof<sup>a</sup> Orientadora

Marli Busanello  
Aluna de doutorado

Eu, \_\_\_\_\_, tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar voluntariamente da pesquisa descrita acima

Assinatura: \_\_\_\_\_

**ANEXO 3: COLETA DE DADOS DO PROVADOR**

Desejamos avaliar sensorialmente a aceitação de leites fermentados com adição de farinha de banana verde e bactérias lácticas (*Lactobacillus plantarum* BG 112 e *Lactobacillus helveticus* LH 3). Ser um julgador não tomará muito seu tempo e não envolverá nenhuma tarefa difícil. A prova será realizada no Laboratório de Análise Sensorial do DCTA, leva em torno de 10 minutos. Se você deseja participar do teste, por favor, preencha este formulário.

**Dados Pessoais:**

Nome

E-mail:

**1. Faixa etária:**

- 15-25  
 25-35  
 35-50  
 acima de 50 anos

**3. Ocupação:**

- Aluno  
 Funcionário  
 Professor  
 Outro

**5. Gosta/consome bebida fermentada?** ( ) Sim ( ) Não

**6. Gosta/consome produtos com farinha de banana verde?** ( ) Sim ( ) Não

**7. Frequência de consumo de produtos contendo farinha de banana verde:**

- Nunca  
 Ocasionalmente - \_\_\_\_\_ vezes por ano  
 Moderadamente - \_\_\_\_\_ vezes por mês  
 Frequentemente - \_\_\_\_\_ vezes por semana

**8. Frequência de consumo de produtos fermentados contendo probióticos:**

- Nunca  
 Ocasionalmente - \_\_\_\_\_ vezes por ano  
 Moderadamente - \_\_\_\_\_ vezes por mês  
 Frequentemente - \_\_\_\_\_ vezes por semana

**9. Produtos que costuma consumir (7, 8).**

---

---

**ANEXO 4: FICHA PARA AVALIAÇÃO SENSORIAL: TESTE DE ACEITAÇÃO****TESTE DE ACEITAÇÃO**

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Você está recebendo uma amostra de leite fermentado com adição de farinha de banana verde, sacarose e essência de banana. Por favor, avalie as amostras com relação aos atributos cor, aroma, textura, sabor e aceitação global, segundo o grau de gostar ou desgostar, utilizando a escala abaixo:

- ( 9 ) gostei extremamente
- ( 8 ) gostei moderadamente
- ( 7 ) goste regularmente
- ( 6 ) gostei ligeiramente
- ( 5 ) não gostei, nem desgostei
- ( 4 ) desgostei ligeiramente
- ( 3 ) desgostei regularmente
- ( 2 ) desgostei moderadamente
- ( 1 ) desgostei extremamente

AMOSTRA	COR	AROMA	TEXTURA	SABOR	ACEITAÇÃO GLOBAL

Comentários:

---



---



---