



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

**KARLA BIGETTI GUERGOLETTO**

**DESENVOLVIMENTO DE SIMBIÓTICO À BASE DE  
*Lactobacillus casei* ADERIDO A FIBRAS VEGETAIS  
DESIDRATADAS**

---

Londrina  
2009

**KARLA BIGETTI GUERGOLETTO**

**DESENVOLVIMENTO DE SIMBIÓTICO À BASE DE  
*Lactobacillus casei* ADERIDO A FIBRAS VEGETAIS  
DESIDRATADAS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Garcia

Londrina  
2009

**KARLA BIGETTI GUERGOLETTTO**

**DESENVOLVIMENTO DE SIMBIÓTICO À BASE DE  
*Lactobacillus casei* ADERIDO A FIBRAS VEGETAIS  
DESIDRATADAS**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa Dra Sandra Garcia (orientadora)  
Universidade Estadual de Londrina

---

Dra. Kátia Sivieri  
Unopar

---

Dra. Luciana de Souza Neves Ellendersen  
Convidada

Londrina, 08 de julho de 2009.

*À minha família,  
meus pais Hélio e Cleuza  
e meu irmão Gustavo, pelo amor,  
confiança, estímulo e carinho incondicional  
transmitidos por toda minha vida.*

*Ao meu noivo Waleyd, pelo amor,  
carinho e por sempre me apoiar  
em minhas decisões.*

*“Bom mesmo é ir à luta com determinação,  
abraçar a vida com paixão,  
perder com classe e  
vencer com ousadia,  
porque o mundo pertence a quem se atreve,  
e a vida é muito para ser insignificante”*

(Charles Chaplin)

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, e por se fazer presente em todos os momentos, sempre guiando a mim e a todos que estiveram envolvidos neste trabalho.

À Prof. Dra. Sandra Garcia, pela valiosa orientação, amizade, pelos ensinamentos que proporcionaram meu crescimento pessoal e profissional e pela confiança que despertou meu profundo respeito e admiração.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina pelos ensinamentos.

À Christian Hansen, na pessoa de Lucio Alberto Forti Antunes, pela cultura probiótica de *Lactobacillus casei* (LC-1), que foi de primordial importância para a realização da pesquisa.

À SL Alimentos, na pessoa de Melícia Galdeano, por gentilmente ter cedido o farelo de aveia.

À Clariant, na pessoa de Aylton Hideki Sueta, pela inulina e pela fibra de maçã utilizada no estudo.

À empresa Tovani Benzaquen com. Imp. Exp. e representações Ltda, na pessoa de Leandro Tovani pela trealose fornecida ao estudo.

À Prof. Dra. Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade, ao Juca e ao Osvaldo do Laboratório de Microscopia e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina (LMEM), pelo auxílio e ensinamentos durante as análises de microscopia eletrônica de varredura.

Às estagiárias Natália e Lívia pela amizade, colaboração e incentivo na execução dos experimentos.

À Marciane Magnani, pela grande amizade, por sempre dispor-se a ajudar e pela imensurável contribuição neste trabalho, partilhando seus conhecimentos científicos, que foram de suma importância no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos amigos da turma de Mestrado, Fran, Romi, Lílian, Dani, Cássia, Elis e Leo, que transformaram esses dois anos de convivência em verdadeira amizade.

Às amigas Gislaine e Giselle pela amizade, apoio, conselhos e pelas inesquecíveis e infalíveis “terapias” em grupo.

Aos companheiros de laboratório, em especial aos de Microbiologia pelos momentos, sempre alegres, de trabalho.

À minha amiga Daniela, pela amizade, conselhos e apoio em todos os momentos de insegurança.

À minha avó, primos e tios que sempre torceram para que as “bactérias sobrevivessem”.

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

GUERGOLETTTO, Karla Bigetti. **Desenvolvimento de simbiótico à base de *Lactobacillus casei* aderido a fibras vegetais desidratadas.** 2009. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

## RESUMO

O aumento na procura por alimentos diversificados e que apresentem benefícios à saúde, tem levado a indústria de alimentos funcionais a explorar novos produtos e processos. Assim, este trabalho objetivou desenvolver um produto vegetal simbiótico. A biomassa de *Lactobacillus casei* (LC-1) foi centrifugada e ressuspendida em solução salina estéril 0,85% (p/v) para a homogeneização de 10g de farelo de aveia com aproximadamente 9% de  $\beta$ - glucana, farinha de banana verde, fibra de maçã ou inulina. As amostras foram submetidas a secagem à 45°C sob vácuo até a umidade de  $5,6 \pm 1\%$ . A viabilidade do LC-1 foi determinada utilizando Agar MRS e as análises de umidade, pH e atividade de água foram realizadas segundo métodos oficiais. Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada em cada uma das fibras adicionadas de LC-1 para verificar as possíveis diferenças morfológicas ocorridas no microrganismo antes e após o processo de desidratação. No farelo de aveia e na farinha de banana verde, fibras que obtiveram maior sobrevivência celular, foram avaliados os efeitos da sacarose como estressor e da trealose como protetor. A estabilidade do simbiótico foi avaliada em 28 dias. As amostras foram armazenadas em sachês de BOPP metalizado e estocadas nas temperaturas de 10, 25 e 40°C e as análises microbiológicas e físico-químicas foram realizadas a cada 7 dias. A resistência do LC-1 aderido ao farelo de aveia foi verificada simulando condições gastrintestinais. Testes sensoriais de aceitação e triangular foram conduzidos adicionando farelo de aveia e simbiótico a uma vitamina comercial. Os resultados mostraram que os valores de atividade de água variaram entre 0,25 e 0,35, conforme propriedades de cada fibra. O farelo de aveia e a farinha de banana verde, cujos pHs finais foram 5,7 e 5,4, apresentaram as maiores recuperações celulares, 82 e 79% respectivamente, sendo que as imagens de MEV mostraram células com poucas alterações morfológicas. A inulina e a fibra de maçã apresentaram as menores sobrevivências, 45% e 66% e, valores de pH de 4,0 e 4,2 respectivamente. Na farinha de banana verde e no farelo de aveia, a adição de sacarose e trealose apresentou efeito positivo na sobrevivência do LC-1. Por se tratar de um produto desidratado, onde a estabilidade à temperatura ambiente é desejada, a maior viabilidade celular no teste de armazenamento foi obtida com farelo de aveia sem adição dos açúcares, chegando ao final do período com 7,4 ciclos log/g. Após simulação do suco gástrico e intestinal (120 minutos em pH 1,55 e 150 minutos em pH 7,4), a viabilidade do microrganismo aderido ao farelo de aveia foi mantida em 107UFC/g, mostrando que o farelo de aveia oferece proteção ao microrganismo em relação às células livres ( $10^2$ UFC/g). No teste triangular, foi verificado que o farelo de aveia na presença e ausência do probiótico apresentaram diferenças sensoriais perceptíveis pelos provadores, mas ambos foram considerados bem aceitos pelos consumidores, com índices de aceitação 77 e 76% respectivamente. Portanto, o simbiótico desidratado utilizando farelo de aveia é uma alternativa para a diversificação de produtos com propriedades funcionais.

**Palavras-chave:** Probiótico.  $\beta$ -glucana. Farinha de banana verde. Fibra alimentar. Desidratação.

GUERGOLETTTO, Karla Bigetti. **Development of a symbiotic based on *Lactobacillus casei* adhered to dehydrated vegetal fibers.** 2009. 86p. Dissertation (Master`s degree in food science) – Londrina State University, Londrina, 2009.

## ABSTRACT

Increases in consumers demand for food variety showing benefit to health, has led the functional food industry to explore new products and processes. Based on this, the study aimed to develop a dehydrated vegetable synbiotic product. The *Lactobacillus casei* (LC-1) biomass was centrifuged and resuspended in sterile saline solution 0,85% (w/v) to homogenize 10g of oat bran with 9% of  $\beta$ -glucan, unripe banana flour, apple fiber or inulin. The samples were subjected to vacuum drying at 45°C until the moisture content of  $5,6 \pm 1\%$ . The viability of LC-1 was determined by counting on MRS agar plates and analysis of moisture, pH and water activity was performed by official methods. Analysis of scanning electron microscopy (SEM) was carried out on each fiber to determine the possible morphological differences occurred in cells before and after the dehydration process. The effect of sucrose and trehalose as stressor and protectant was studied on fibers which presented the highest cell survival. The stability of the dehydrated products was performed during 28 days. The samples were packaged in metalized BOPP sachets and stored at 10, 25 and 40°C temperatures and the microbiological and chemical analysis conducted every 7 days. The viability of LC-1 cells entrapped in oat bran was determined simulating gastrointestinal conditions. Sensory triangular and acceptance tests were conducted adding the probiotic with oat bran to a commercial vitamin. The results showed that the values of water activity ranged between 0,25 and 0,35, depended on each fiber properties. Oat bran and green banana flour, whose final pHs were 5,7 and 5,4, showed the highest cell recovery, 82 and 79% respectively, and SEM images showed cells with few morphological changes. The inulin and apple fiber showed the lowest viability, 45% and 66% and, pH values 4,0 and 4,2. In green banana flour and oat bran, the addition of sucrose and trehalose before drying had a positive effect on LC-1 survival. In the case of a dehydrated product, where environmental temperature stability is desired, the best results were obtained with oat bran without sugars, reaching 7,4 log cycles g<sup>-1</sup> at the end of storage time. After gastric and intestinal simulation (120 minutes at pH 1.55 and 150 minutes at pH 7,4) the viability of the microorganism on oat bran was maintained at 10<sup>7</sup>UFC g<sup>-1</sup> in contrast with 10<sup>2</sup>UFC ml<sup>-1</sup> of free cells, showing protection by oat fiber. Triangular test, showed differences between oat bran in presence or absence of probiotic, perceived by sensory panelists, but both were accepted by consumers with acceptance rates of 77 and 76% respectively. Therefore, the synbiotic is an alternative for diversification of products with functional properties.

**Keywords:** Probiotic.  $\beta$ -glucan. Unripe banana flour. Dietary fiber. Dehydration.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estrutura química da inulina .....	24
<b>Figura 2</b> – Ficha teste triangular .....	40
<b>Figura 3</b> – Ficha teste aceitação utilizando escala hedônica .....	41
<b>Figura 4</b> – Curva de crescimento do <i>Lactobacillus casei</i> cultivado por 48 horas em Caldo MRS a 37°C .....	42
<b>Figura 5</b> – Médias percentuais de duas determinações com análises realizadas em duplicatas de células de <i>L. casei</i> recuperadas após a secagem a vácuo a 45°C. A: Farelo de aveia, B: Farinha de banana verde, C: Fibra de maçã e D: Inulina .....	44
<b>Figura 6</b> – Farinha de banana verde antes (A) e após (B) aderência do <i>L. casei</i> e secagem a vácuo à 45°C .....	45
<b>Figura 7</b> – Farelo de aveia antes (A) e após (B) aderência do <i>L. casei</i> e secagem a vácuo à 45°C .....	45
<b>Figura 8</b> – Fibra de maçã antes (A) e após (B) aderência do <i>L. casei</i> e secagem a vácuo à 45°C .....	46
<b>Figura 9</b> – Inulina antes (A) e após (B) aderência do <i>L. casei</i> e secagem a vácuo à 45°C .....	46
<b>Figura 10</b> – Microscopia eletrônica de varredura do farelo de aveia (A e B) e farinha de banana verde sem adição de <i>L. casei</i> (C e D) com aumentos de 700 e 2500 vezes .....	47
<b>Figura 11</b> – Microscopia eletrônica de varredura de fibra de maçã (A e B) e inulina (C) sem adição de <i>L. casei</i> , com aumentos de 700 e 2500 vezes .....	48
<b>Figura 12</b> – Microscopia eletrônica de varredura do farelo de aveia após adição de <i>L. casei</i> , antes (A e B) e após secagem à 45°C sob vácuo (C e D) com aumentos de 5.000 e 20.000 vezes .....	50
<b>Figura 13</b> – Microscopia eletrônica de varredura da farinha de banana verde após adição de <i>L. casei</i> antes (A e B) e após secagem à 45°C sob vácuo (C e D) com aumentos de 5.000 e 20.000 vezes .....	51

- Figura 14** – Microscopia eletrônica de varredura de: fibra de maçã após adição de *L. casei* antes (A e B) e após secagem à 45°C sob vácuo (C e D) e de inulina antes (E) e após processo de secagem (F e G) com aumentos de 2.500 e 20.000 vezes .....53
- Figura 15** – Gráfico de superfície de resposta obtido após secagem de farinha de banana verde com *L. casei* aderido, para as variáveis codificadas sacarose e trealose, tendo como resposta a viabilidade do LC-1 em log de UFC/g.....55
- Figura 16** – Gráfico de superfície de resposta obtido após secagem de farinha de banana verde com *L. casei* aderido, para as variáveis codificadas sacarose e trealose, tendo como resposta a viabilidade do LC-1 em log de UFC/g.....58
- Figura 17** – Comportamento de *Lactobacillus casei* aderidos ao farelo de aveia armazenados por 28 dias, sob temperaturas de (▲) 10°C, (■) 25°C e (◆) 40°C: (A) sem tratamento e (B) tratado com 20g/L de sacarose e 0,4M de trealose .....60
- Figura 18** – Comportamento de *Lactobacillus casei* aderidos a farinha de banana verde armazenados por 28 dias, sob temperaturas de (▲) 10°C, (■) 25°C e (◆) 40°C: (A) sem tratamento e (B) tratado com 20g/L de sacarose e 0,4M de trealose .....62

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Linhagens probióticas utilizadas por algumas empresas e seus respectivos efeitos clínicos .....21
- Tabela 2** – Valores reais e codificados de adição de sacarose e trealose à farinha de banana verde e os resultados da viabilidade *do L. casei* (LC-1) .....55
- Tabela 3** – Valores reais e codificados do novo delineamento para a adição de sacarose e trealose à farinha de banana verde e os resultados de viabilidade de *L. casei* (LC-1).....56
- Tabela 4** – Valores reais e codificados de adição de sacarose e trealose ao farelo de aveia e os resultados de viabilidade de *L. casei* (LC-1).....57
- Tabela 5** – Média de duas repetições de análises realizadas em duplicatas dos resultados obtidos para a umidade e pH, com e sem adição de sacarose e trealose, durante o armazenamento de *Lactobacillus casei* aderido ao farelo de aveia, por 28 dias nas temperaturas de 10°C, 25°C e 40°C .....61
- Tabela 6** – Média de duas repetições de análises realizadas em duplicatas dos resultados obtidos para a umidade e pH, com e sem adição de sacarose e trealose, durante o armazenamento de *Lactobacillus casei* aderido à farinha de banana verde, por 28 dias nas temperaturas de 10°C, 25°C e 40°C .....63
- Tabela 7** – Resultados obtidos para a atividade de água, com e sem adição de sacarose e trealose, durante o armazenamento de *Lactobacillus casei* aderido ao farelo de aveia e à farinha de banana verde e ao farelo de aveia, por 28 dias nas temperaturas de 10°C e 25°C .....63
- Tabela 8** – Sobrevivência média obtida para o *L. casei*, na forma livre e aderida ao farelo de aveia, após diferentes tempos em simulação do trato gastrintestinal .....65

<b>Tabela 9</b> – Resultado obtido na análise de microrganismo patogênicos e respectivos padrões microbiológicos exigidos pela legislação vigente para ‘farelo e fibras de cereais, com ou sem mistura de farinhas’ encontrado no item 10 do anexo I da Resolução RDC nº 12 da Anvisa.....	66
<b>Tabela 10</b> – Médias de aceitação do teste de escala hedônica para as amostras vitamina, vitamina adicionada de farelo de aveia e vitamina adicionada de farelo de aveia com probiótico .....	67

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
2.1 BACTÉRIAS LÁCTICAS (BAL).....	17
2.2 PROBIÓTICOS .....	19
2.3 FIBRAS ALIMENTARES.....	21
2.3.1 Inulina.....	23
2.3.2 Farinha de Banana Verde .....	25
2.3.3 Farelo de Aveia .....	26
2.3.4 Fibra de Maçã .....	27
2.4 DESIDRATAÇÃO.....	29
2.4.1 Manutenção da Viabilidade Celular .....	30
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	32
3.1 OBJETIVO GERAL.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
4.1 MICRORGANISMO .....	33
4.2 FIBRAS.....	33
4.3 DETERMINAÇÃO DA FASE DE CRESCIMENTO .....	33
4.4 OBTENÇÃO DA BIOMASSA DE LC-1 .....	34
4.5 ADERÊNCIA DO MICRORGANISMO ÀS FIBRAS E PROCESSO DE DESIDRATAÇÃO .....	34
4.6 SELEÇÃO DAS FIBRAS.....	35
4.6.1 Determinação da Viabilidade Celular .....	35
4.6.2 Análises Físico-Químicas .....	36
4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA .....	36
4.8 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SACAROSE COMO ESTRESSOR E DA TREALOSE COMO PROTETOR CELULAR NA VIABILIDADE DO MICRORGANISMO ADERIDO ÀS FIBRAS .....	36
4.9 AVALIAÇÃO DURANTE ARMAZENAMENTO .....	37

4.10 SOBREVIVÊNCIA DO LC-1 ADERIDO À FIBRA APÓS INCUBAÇÃO EM CONDIÇÕES GASTRINTESTINAIS SIMULADAS .....	38
4.10.1 Resistência à Acidez .....	38
4.10.2 Resistência aos Sais Biliares .....	38
4.11 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	39
4.12 ANALISE SENSORIAL.....	39
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
5.1 DETERMINAÇÃO DA FASE DE CRESCIMENTO .....	42
5.2 SELEÇÃO DAS FIBRAS.....	43
5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA .....	46
5.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SACAROSE COMO ESTRESSOR E DA TREALOSE COMO PROTETOR CELULAR .....	54
5.4.1 Farinha de Banana Verde .....	54
5.4.2 Farelo de Aveia .....	56
5.5 ARMAZENAMENTO .....	59
5.5.1 Farelo de Aveia .....	59
5.5.2 Farinha de Banana Verde .....	62
5.6 SOBREVIVÊNCIA DO LC-1 ADERIDO À FIBRA APÓS INCUBAÇÃO EM CONDIÇÕES GASTRINTESTINAIS SIMULADAS .....	64
5.7 ANALISE MICROBIOLÓGICA.....	65
5.8 ANÁLISE SENSORIAL.....	66
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>79</b>
ANEXO A .....	80
ANEXO B .....	81
ANEXO C .....	82
ANEXO D .....	84
ANEXO E .....	86

## 1 INTRODUÇÃO

Alimentos funcionais são definidos como aqueles que contêm substâncias que promovem efeitos benéficos à saúde, através da dieta normal, além das necessidades nutricionais básicas. O consumo de alimentos funcionais pode estar associado à prevenção dos riscos de algumas doenças crônicas porque em sua composição são encontrados compostos bioativos, capazes de atuar como moduladores dos processos metabólicos, prevenindo o surgimento de doenças degenerativas.

Entre os compostos bioativos estão incluídos o betacaroteno, os flavonoides, as fibras alimentares e os microrganismos probióticos, constituintes normais dos alimentos ou adicionados a produtos industrializados.

As fibras alimentares normalmente são encontradas em alimentos como frutas, verduras, legumes, grãos e cereais, que fazem parte da alimentação humana diária. Apresentam como propriedade a capacidade de resistirem à ação das enzimas digestivas humanas chegando intactas ao cólon, onde são parcialmente hidrolisadas e fermentadas pela microbiota colônica. Diversos estudos envolvendo fibras relatam seus benefícios para a saúde, tanto no tratamento como na prevenção de doenças, como, diabetes, obesidade, constipação e câncer de cólon.

Os microrganismos probióticos podem ser encontrados em alimentos lácteos como iogurte e leites fermentados. Quando introduzidos no sistema digestivo, através da alimentação, apresentam a capacidade de resistência à acidez estomacal e à ação dos sais biliares, chegando à mucosa intestinal onde ocorre a aderência e colonização. Os principais benefícios reportados pelo consumo de alimentos contendo probióticos são a produção de vitaminas e enzimas digestivas como a  $\beta$ -galactosidase, eliminação ou redução da ação de microrganismos patogênicos, estímulo do sistema imune e alívio na constipação.

Uma alternativa para a manutenção dos microrganismos probióticos no intestino é a promoção seletiva de bactérias benéficas através do consumo de carboidratos indigeríveis. Estes compostos são chamados de prebióticos e seletivamente estimulam a atividade ou o crescimento de bactérias benéficas no cólon. Para tanto devem chegar ao intestino grosso e estimular o crescimento da

microbiota. Os produtos que contem probióticos e prebióticos são conhecidos como simbióticos e a combinação de seus efeitos melhora a saúde pelo aumento dos ingredientes alimentares funcionais.

Nos últimos anos, a diversidade de alimentos probióticos vem aumentando significativamente no mercado e os probióticos podem ser encontrados em leites não fermentados, sucos e cereais. Entretanto, há pouca informação sobre a sobrevivência destes microrganismos em matrizes alimentares não lácteas, tornando sua aplicação um grande desafio.

Considerando o crescente interesse dos consumidores por alimentos com efeitos benéficos à saúde e a necessidade da indústria em diversificar os alimentos funcionais, o objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento de um produto funcional composto de fibra alimentar desidratada contendo o probiótico *Lactobacillus casei* (LC-1) aderido.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BACTÉRIAS LÁCTICAS (BAL)

As bactérias lácticas (BAL) foram descritas por Orla-Jensen (1919) para nomear um grupo fisiológico de Gram-positivos que fermentam carboidratos a ácido láctico ou a este e ácido acético, álcool e dióxido de carbono. Tem preferência por condições não aeróbias porém, aerotolerantes, fermentadoras de carboidratos, produtoras de ácido láctico, ácido tolerantes, não esporuladas e catalase negativas (FULLER, 1992; VASILJEVIC; SHAH, 2008). Dentre os principais gêneros, destacam-se *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Pediococcus*. Alguns autores sugerem que o gênero *Bifidobacterium* pertença ao grupo das bactérias lácticas, entretanto apresentam em seu DNA maiores quantidades de conteúdo de pares de G+C (guanina-citosina) e assim diferenças filogenéticas em relação aos outros gêneros (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Revisões taxonômicas destes gêneros sugerem que BAL compreendem: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Lactosphaera* e *Paralactobacillus* (LEISNER *et al.*, 2000).

BAL são subdivididas em dois grupos distintos com base no metabolismo de carboidratos. O grupo das homofermentativas, que inclui *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e alguns *Lactobacillus*, utilizam a via glicolítica para transformar a fonte de carbono principalmente em ácido láctico. Já as heterofermentativas, que compreendem *Leuconostoc*, *Weissella* e alguns *Lactobacillus*, produzem quantidades equimolares de lactato, CO<sub>2</sub>, etanol ou acetato a partir da glicose utilizando a via fosfoquetolase (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Amplamente distribuídas, BAL tem sido utilizadas em todo o mundo para melhorar a preservação, as características sensoriais e valor nutricional de uma ampla variedade de produtos, como leite, carne e vegetais. Isso porque algumas linhagens são capazes de converter açúcares, ácidos orgânicos, proteínas ou gorduras em componentes de aroma e sabor e também podem contribuir para

melhorar a textura e a viscosidade de produtos fermentados por meio da síntese de exopolissacarídeos (RUAS MADIEDO; HUGENHOLTZ; ZOON, 2002).

A maioria das bactérias do ácido láctico pertence ao gênero *Lactobacillus*, que é heterogêneo, com variedades fenotípicas e propriedades bioquímicas e fisiológicas diferenciadas (BERNARDEAU *et al.*, 2007). Os lactobacilos são os microrganismos probióticos mais conhecidos por causa da sua associação com os populares produtos lácteos fermentados. O consumo destes produtos, tais como o iogurte, é comumente associado a hábitos saudáveis. Lactobacilos fazem parte da microbiota da boca, intestino delgado, cólon e vagina de humanos (ELMER; MCFARLAND; MACFARLAND, 2007).

A fermentação de carboidratos pelos lactobacilos produz ácido láctico, permitindo que os mesmos sobrevivam em ambientes ácidos, como o estômago. Esta característica dá aos lactobacilos um nicho competitivo em ambientes ricos em nutrientes e pode explicar, em parte, sua ação probiótica (ELMER; MCFARLAND; MACFARLAND, 2007). A temperatura ideal de crescimento está na faixa de 35-40°C e pH 5,5-6,0, e compreendem diversas espécies oficialmente reconhecidas, sendo as mais utilizadas para fins de aditivo dietético os *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. casei* (PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005; BERNARDEAU *et al.*, 2007).

Os *L. casei* são caracterizados por fermentar manitol, glicose, galactose, manose, maltose e ribose e por não fermentar a rafinose e ramnose; também por produzir L-lactato e apresentar forma de bastonetes curtos a longos, com extremidades quadradas. São encontrados em leite, queijo, produtos lácteos de maneira geral e em carnes. Formam dois tipos de colônias: disco ou lentes e, um filamento que irradia para fora da colônia que aparece com a idade microbiana (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

Na imunoterapia, os *L. casei* são caracterizados por apresentar capacidade de redução dos níveis de colesterol sérico (BOTTAZZI, 1988), abrandar sintomas da doença de Crohn, apresentar propriedades antimicrobianas e eficiência contra diarreia provocada por rotavírus (ITSARANUWAT; AL-HADDAD; ROBINSON, 2003).

Além disso, alguns estudos têm demonstrado uma maior resistência do *L. casei* em relação às outras espécies, quando submetido a situações de estresse como secagem e desidratação (GARDINER *et al.*, 2000) ou,

armazenamento sob baixas temperaturas (SENDRA *et al.*, 2008).

## 2.2 PROBIÓTICOS

A palavra probiótico é derivada do grego e significa “em prol da vida”. Seu significado foi utilizado pela primeira vez em 1953 por Kollath para descrever a restauração da saúde por suplementos orgânicos e inorgânicos, em pacientes subnutridos (VASILJEVIC; SHAH, 2008). Fuller (1992) redefiniu probióticos como “um suplemento de microorganismos vivos que afeta beneficemente o animal hospedeiro pelo melhoramento no seu balanço microbiano intestinal”.

Embora ao longo dos anos, outros autores ofereceram suas versões, a definição atualmente aceita é a sugerida pela FAO/WHO (2002), descrevendo probiótico como microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) define probióticos como microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002).

Para a seleção de uma cultura microbiana como probiótica deve-se verificar gênero, origem, patogenicidade, toxicidade, atividade metabólica, propriedades intrínsecas, como resistência a antibióticos, segurança para o consumo humano, sobrevivência em ambiente com baixo pH, tolerância à bile e capacidade de adesão à mucosa intestinal. Além disso, a cultura deve estabilizar a microbiota intestinal mantendo o ambiente desfavorável a patogênicos e ter a capacidade de colonizar o trato gastrointestinal humano após sobreviver em produtos alimentares durante o processamento e armazenamento (PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005; MYERS, 2007; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Dentre as espécies de bactérias com propriedades probióticas estão incluídas *L. acidophilus*, *L. casei shirota*, *L. casei* variedade *rhamnosus*, *L. casei* variedade *defensis*, *L. paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*) *B. longum*, e *Enterococcus faecium* (BRASIL, 2007).

Os benefícios nutricionais dos alimentos contendo bactérias probióticas e possíveis causas e mecanismos são: o aumento da motilidade no intestino e alívio na constipação; melhora na digestibilidade com quebra parcial de proteínas, gorduras e carboidratos; melhora no valor nutricional por elevação dos níveis de Vitamina B e certos aminoácidos, como metionina, lisina e triptofano; melhora na utilização da lactose por redução desta no produto e disponibilização da lactase; ação antagonista a patógenos entéricos com o controle de desordens, como diarreia, colites, diverticulite e colites antibióticas pela acidificação, inibidores microbianos e prevenção da adesão do patógeno. Além disso, colonização no intestino pela sobrevivência ao ácido gástrico, resistência a lisozima, baixa tensão superficial do intestino, aderência à mucosa intestinal, multiplicação no trato intestinal e modulação do sistema imunológico; ação inibitória de alguns tipos de câncer, em particular de cânceres do trato gastrointestinal pela degradação de pré-carcinógenos em compostos inofensivos, redução de enzimas promotoras do câncer e estímulo do sistema imune; ação hipocolesterolêmica por produção de inibidores da síntese de colesterol ou uso do colesterol pela assimilação e precipitação com desconjugação de sais biliares; e modulação imunológica por interação na formação dos macrófagos, estímulo da produção de células supressoras de  $\gamma$ -interferon (GOMES; MALCATA, 1999; SHAH, 2007).

Para manter os efeitos benéficos dos probióticos, a legislação brasileira indica que a dose diária mínima deva ser de  $10^8$ - $10^9$  UFC, através de uma ingestão de 100g de produto que contenha  $10^6$ - $10^7$  células viáveis por mL ou g (BRASIL, 2007). Além disso, tais produtos devem ser consumidos regularmente (GOMES; MALCATA, 1999).

A introdução de probióticos em alimentos é freqüente, embora sua utilização apresente desafios quando em grande escala com relação à manutenção da estabilidade e viabilidade durante armazenamento e uso (GIBSON, 2004/b). Na Tabela 1 estão apresentadas algumas linhagens probióticas utilizadas por algumas empresas e que estão disponíveis no mercado nacional e internacional, segundo Typponen, Petaja e Mattila-Sandholm (2003) com adaptações.

**Tabela 1** – Linhagens probióticas utilizadas por algumas empresas e seus respectivos efeitos clínicos

<b>Linhagem</b>	<b>Empresa / País</b>	<b>Efeito clínico reportado</b>
<i>B. animalis</i> DN173010	Danone, Brasil	Melhora o transito intestinal lento
<i>L. acidophilus</i> La1	Néstle, Brasil	Aderência às células intestinais humanas, prevenindo aderência de microrganismos patogênicos e aumento da produção de anticorpos
<i>L. rhamnosus</i> GG	Valio, Finlândia	Aderência às células intestinais humanas, diminuição das atividades enzimáticas fecais, prevenção da diarreia, regulação da resposta imune, prevenção e tratamento de alergias alimentares.
<i>L. johnsonii</i> La1	Nestlé, Suíça	Regulação da microbiota intestinal, melhora imunológica, coadjuvante no tratamento de <i>Helicobacter pylori</i> .
<i>L. casei</i> Shirota	Yakult, Japão	Regulação da microbiota intestinal, diminuição das atividades enzimáticas fecais, prevenção da ocorrência de câncer na superfície do trato urinário.
<i>L. reuteri</i> SD2112	BioGaia, EUA	Colonização do trato intestinal, tratamento da diarreia.
<i>L. plantarum</i> 299V	Probi, Suécia	Aderência às células intestinais humanas, regulação da microbiota intestinal.
<i>B. lactis</i> Bb-12	Chr. Hansen, Dinamarca	Tratamento/prevenção da diarreia, regulação da microbiota intestinal, melhora da constipação, regulação da resposta imune, alívio dos sintomas da alergia alimentar.

**Fonte:** Adaptado de Tyopponen, Petaja e Mattila-Sandholm (2003)

### 2.3 FIBRAS ALIMENTARES

De acordo com a RDC nº 360 de 23 de janeiro de 2003, fibra alimentar é qualquer material comestível que não seja hidrolisado pelas enzimas endógenas do trato digestivo humano (BRASIL, 2003). Devido à porção da fibra que é metabolizada a ácidos graxos voláteis no trato gastrointestinal, as fibras não podem ser consideradas totalmente não disponíveis à nutrição humana (CHARALAMPOPOULOS *et al.*, 2002).

As fibras alimentares consistem em uma variedade de polissacarídeos não amiláceos, que incluem a celulose, hemicelulose, inulina; pectina,  $\beta$ -glucanas, gomas e lignina. As frutas, vegetais, cereais e legumes são os alimentos mais ricos destes componentes, entretanto podem ser extraídos também de fungos (GIBSON, 2004/a; SUGAWARA *et al.*, 2004; FIGUEROLA *et al.*, 2005). Fibras alimentares dispõem de diferentes graus de solubilidade, aos quais estão vinculadas diferentes funções gastrintestinais (ROBERFROID, 1993).

Considerando a solubilidade em água, as fibras classificam-se em solúveis e insolúveis. As fibras solúveis caracterizam-se por formar géis e pela sua capacidade de captar água. Ligam-se aos sais biliares no intestino, diminuindo sua reabsorção, o que resulta em menos colesterol disponível no fígado para a síntese de lipoproteínas. As fibras solúveis possuem também a propriedade de serem fermentadas pelas bactérias colônicas dando origem a ácidos graxos de cadeia curta, gás, água e energia, que, embora apresentem um efeito secundário, contribuem também para o aumento do volume das fezes (PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005), e podem prolongar o esvaziamento gástrico e reduzir a absorção de glicose (ROBERFROID, 1993). Alguns exemplos de fibras solúveis são a pectina, hemicelulose, goma guar e a inulina (GIBSON, 2004/a).

As fibras insolúveis fazem parte da estrutura das células vegetais e são encontradas principalmente em verduras, farelo de trigo e grãos integrais. Seus principais efeitos metabólicos incluem aumento do volume e maciez das fezes, aumento na frequência da evacuação e diminuição do tempo de trânsito no cólon, diminuição da constipação. Como são pouco fermentescíveis, retêm água e intensificam a proteção contra infecção bacteriana, entretanto não causam mudanças significativas no metabolismo de carboidratos ou de lipídios (ROBERFROID, 1993; PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005).

Nos últimos anos, diversos pesquisadores vêm estudando a interação entre fibras e bactérias probióticas. Segundo Saarela *et al.* (2006/b), além das propriedades funcionais proporcionando uma melhora na saúde, as fibras também podem agir tecnologicamente protegendo culturas probióticas em condições de estresse como a liofilização, desidratação e armazenamento. Neste contexto

Sendra *et al.* (2008) obtiveram significativa melhora na sobrevivência de *L. casei* durante 40 dias de estocagem a 4 °C, quando 1% de fibras de frutas cítricas foram adicionadas em leite fermentado e em Caldo MRS.

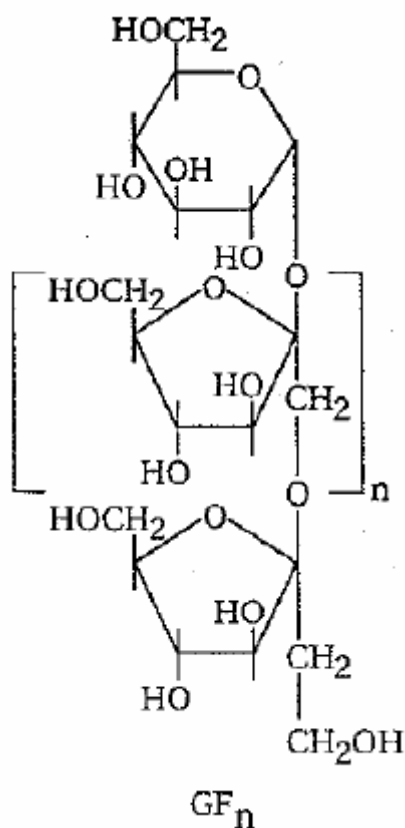
Algumas fibras alimentares são caracterizadas por apresentar efeito prebiótico, que foram definidos como um “ingrediente alimentar não digerível que afeta benéficamente o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade de uma ou mais bactérias no cólon, e assim melhorar a saúde do hospedeiro” (GIBSON, 2004/a).

De maneira geral, todos os oligossacarídeos e polissacarídeos que apresentam atividade prebiótica são considerados fibras alimentares, mas nem todas as fibras são alegadas como prebióticas (GIBSON, 2004/b). Um alimento classificado como prebiótico não deve ser hidrolisado ou absorvido no intestino delgado e deve ser metabolizado seletivamente, ao atingir o cólon, por número limitado de bactérias benéficas, além de ser capaz de transformar a microbiota colônica em uma microbiota saudável e de induzir efeito fisiológico importante para a saúde. Dentre os ingredientes alimentares que melhor atendem a esses requerimentos estão a inulina, frutooligossacarídeos (FOS), a  $\beta$ -glucana, amido resistente e a lactulose (CHARALAMPOPOUS *et al.*, 2002).

### 2.3.1 Inulina

A inulina é um carboidrato do grupo de polissacarídeos chamados de frutanas. Apresenta grau de polimerização de 3 até mais de 60 unidades de monômeros, principalmente de unidades de  $\beta$ -D-frutofuranosil, unidas entre si por ligações  $\beta$  (2  $\rightarrow$  1) e finalizadas com molécula de glicose (Figura 1). A fórmula estrutural pode ser descrita como **GF<sub>n</sub>**, onde **G** representa a molécula de glicose, **F** a molécula de frutose e **n** o número de unidades de frutose. Devido à sua conformação estrutural, com ligações  $\beta$  (2-1), ambas, inulina e oligofrutose, resistem a hidrólise pelas enzimas humanas digestivas, tendo propriedade importante de fibras alimentares (ROBERFROID, 1993).

A Inulina é extraída de plantas de consumo freqüente tais como como cebola, aspargos, trigo, banana, cebolinha, alho, mel, aveia, centeio e chicória e sua concentração em cada planta depende muito da variedade, do tempo decorrido desde a colheita até a utilização e das condições de estocagem (ARAGON-ALEGRO *et al.*, 2007).



**Figura 1** – Estrutura química da inulina.

Fonte: Roberfroid, (1993)

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

Na questão tecnológica, a alta solubilidade permite sua utilização em leites e produtos lácteos. Devido às cadeias mais longas, a inulina possui a capacidade de formar microcristais quando misturada à água e leite. Estes microcristais interagem entre si para formar uma mistura cremosa e macia promovendo a sensação de presença de gordura, sendo assim utilizada com sucesso como substituta de gordura em recheios prontos, sobremesas congeladas e molhos (NINESS, 1999; MONTAN, 2003).

Gibson *et al.* (1995) apud Gibson (2004/a), demonstraram que a administração de inulina e oligofrutoses aumenta significativamente o número de bactérias fecais produtoras do ácido láctico, diminuindo o pH fecal e criando um microambiente bactericida para bactérias putrefativas, desenvolvendo assim um

ambiente favorável à bactérias benéficas. Sob o mesmo aspecto Hond, Geypens e Ghooos (2000) mostraram que o consumo de inulina pode aumentar a frequência e o peso fecal, diminuindo os problemas com a constipação intestinal. Adicionalmente, existem relatos de que a suplementação com inulina ou oligofrutose pode aumentar a absorção de cálcio e magnésio no organismo (BROMMAGE *et al.*, 1993; OHTA *et al.*, 1995). Para a obtenção dos benefícios desejados, a ingestão média recomendada para os humanos é estimada em 1 - 10 g / dia (VANLOO *et al.*, 1995).

### 2.3.2 Farinha de banana verde

As frutas são importantes fontes de fibras solúveis e insolúveis e a banana é uma das frutas mais consumidas no mundo, (CORDENUNSI; SHIGA; LAJOLO, 2008), sendo o Brasil um dos líderes mundiais de produção e consumo (LEITE; MANCINI; BORGES, 2007).

A banana é um alimento altamente energético (cerca de 100kcal por 100g de polpa) com uma rica composição nutricional, composta de carboidrato rico em fósforo (27%), apresentando regulares teores de cálcio, ferro, cobre, zinco, iodo, manganês, cobalto, vitamina A, B1, B2 e vitamina C, além de ser considerado uma das principais fontes de potássio para o consumo humano (ZAIDAN, *et al.*, 1999; LIMA; NEBRA; QUEIROZ, 2000). A banana também contém frutooligossacarídeos (FOS), que apresenta efeitos benéficos à saúde pelo estímulo ao crescimento de bactérias lácticas no cólon humano, pela supressão de patógenos e pela redução das concentrações de colesterol sérico (TSEN; LIN; KING, 2004).

Rabani *et al.* (2001) em estudo realizado com 62 crianças que apresentavam quadro de diarreia, observaram redução no volume e melhora na qualidade das fezes em 82% dos casos, além de redução da duração da enfermidade, quando banana verde em pasta foi administrada junto com a dieta. Devido às dificuldades encontradas como sua alta perecibilidade, a exportação *in natura* torna-se bastante difícil, sendo a industrialização uma alternativa promissora para o aproveitamento integral da fruta, sem a perda das qualidades nutricionais (NETO *et al.*, 1998). Dentre os produtos de banana mais conhecidos destacam-se purê, farinha, *chips*, enlatados, geléia, banana passa, vinagre, vinho e suco (TSEN;

LIN; KING, 2004).

A farinha de banana verde é um empreendimento bastante promissor, podendo ser utilizada em vários setores industriais (NETO *et al.*, 1998). Para a produção da farinha, as bananas são lavadas em água corrente, descascadas, cortadas em tiras finas, secas em forno ou ao sol, trituradas e, por fim, peneiradas até a granulometria desejada (BARRET; SOMOGYI; RAMASWAMY, 2005).

Segundo estudo realizado por Juarez-Garcia *et al.* (2006), a farinha de banana verde apresenta, em média, na sua composição 73,4% do conteúdo total de amido, 17,5% de amido resistente e um nível de 14,5% de fibra dietética, entretanto estes valores podem sofrer variações dependendo de fatores como o estágio de maturidade da fruta e as diferentes características dos cultivares (RODRÍGUEZ-AMBRIZ *et al.*, 2008). No estudo de Fasolin *et al.* (2007) entre os principais minerais encontrados na farinha de banana verde estão o fósforo (190mg/100g de farinha), o potássio (158mg/100g de farinha) e o cálcio (156mg/100g de farinha).

O amido resistente tem sido reconhecido como uma fibra funcional, apresentando um importante papel na fisiologia digestiva. Similares aos oligossacarídeos, especialmente frutooligosacarídeos, passa pela digestão e fornece carboidratos fermentescíveis para as bactérias colônias (CHARALAMPOPOUS *et al.*, 2002).

### **2.3.3 Farelo de aveia**

A aveia (*Avena Sativa* L.) é um cereal de excelente valor nutricional, destacando-se dentre os outros cereais por apresentar um alto teor e qualidade protéica, que varia de 12,40 a 24,50% no grão descascado, e por sua maior porcentagem de lipídios, que variam de 3,01% a 10,90%, além de conter aminoácidos, vitaminas e sais minerais distribuídos por todo o grão (SÁ *et al.*, 2000).

O farelo de aveia consiste na camada mais externa do grão, que contém a maior parte da fibra alimentar. De acordo com Wood (1993) para consumo

humano as indústrias que processam aveia produzem o farelo obtido pela moagem da aveia e posterior separação da farinha por peneiragem e aspiração.

A porcentagem de fibra total encontrada na aveia varia entre 7,1% a 12,1%, sendo a variação em decorrência de diferenças entre cultivares e do método de determinação utilizado. No farelo, o conteúdo de fibra alimentar é de 15% a 19%, dentre estes 34% a 48% são fibras solúveis e o restante insolúveis (SHINNICK *et al.*, 1988).

Os principais componentes da fibra de aveia solúvel são as  $\beta$ -glucanas, polissacarídeos lineares não ramificados, compostos por unidade de glicose  $\beta$ -D-glicopiranosil unidas por ligações  $\beta$ - (1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$ - (1 $\rightarrow$ 4). São atribuídos à  $\beta$ -glucana os principais efeitos fisiológicos da aveia (MALKKI; VIRTANEN, 2001). A aveia apresenta em média entre 4,0% e 5,5% de  $\beta$ -glucanas, sendo o cultivar e as condições climáticas os fatores de variações (SÁ *et al.*, 2000).

Dentre os benefícios fisiológicos observados pelo consumo de aveia e, conseqüentemente,  $\beta$ -glucana, destaca-se a redução no risco de doenças crônicas como a diabetes e doenças do coração (WOOD; BEER, 1998).

A ação da  $\beta$ -glucana se dá pela alteração do metabolismo e secreção de ácidos biliares, modificação das concentrações de ácidos graxos de cadeia curta, diminuição da absorção de lipídios, modificação nos níveis de hormônios pancreáticos e gastrointestinais. Além disso, ação na absorção e digestão de proteínas e amido, ação sobre a saciedade, auxílio no combate à constipação intestinal, efeito prebiótico, entre outros (WOOD; BERR, 1998; MALKKI; VIRTANEM, 2001).

#### **2.3.4 Fibra de maçã**

A maçã é reconhecidamente importante para a saúde humana, devido ao conteúdo de compostos bioativos promotores de benefícios para o consumidor regular. Dentre os compostos bioativos da maçã encontram-se os polifenóis com função antioxidante, as pectinas e ácidos que promovem o equilíbrio do transito gastrointestinal (NEVES, 2005). Devido à associação de suas fibras com estes compostos, as fibras obtidas de maçã e de frutas cítricas, são consideradas

com qualidade superior à de outras fibras (FIGUEROLA *et al.*, 2005).

Excelente fonte de fibras, com uma proporção bem balanceada entre as frações solúveis e insolúveis, a maçã ajuda a reduzir níveis de colesterol no sangue, reduzir a absorção de glicose e, por absorver quantidades de água no trato intestinal, ajuda a prevenir a prisão de ventre (FIGUEROLA *et al.*, 2005; RUPASINGHE *et al.*, 2008).

O principal subproduto do processamento da maçã, o bagaço, representa de 20 a 40% da matéria-prima em função do nível tecnológico adotado. Trata-se de um material altamente instável do ponto de vista microbiológico, com elevado conteúdo de compostos fermentescíveis, e seu descarte pode acarretar forte impacto ambiental. Entretanto, é excelente para fins biotecnológicos, como para a produção de etanol, aromas, gás natural, ácido cítrico, pectinas e enzimas, além de outros processos como extração de fibras e carvão vegetal (FERTONANI *et al.*, 2006).

Algumas propostas visando aproveitar a matéria sólida produzida nas unidades industriais de maçã vêm sendo estudadas para aproveitamento como ingrediente de alimentos formulados, produtos para panificação e outros (RAUPP *et al.*, 2000; RUPASINGHE *et al.*, 2008). Conforme Rupasinghe *et al.* (2008) a casca de maçã em pó possui 40% de fibra alimentar, sendo 10% fração insolúvel e 30 % a fração solúvel.

As pectinas, substâncias coloidais de cadeias de ácido D-galacturônico unidos por ligações glicosídicas  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) (DENÉS *et al.*, 2000) tem efeitos fisiológicos e nutricionais, importantes para a saúde e a nutrição humana. Algumas destas funções são determinadas pela estrutura química, enquanto outras estão mais relacionadas a propriedades físicas. As pectinas são fibras alimentares, pois não são digeríveis pelas enzimas produzidas pelos humanos e, embora não seja absorvida pelo trato gastrointestinal, as pectinas podem ser fermentadas pela microbiota colônica em dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>), hidrogênio (H<sub>2</sub>) e ácidos graxos de cadeia curta, principalmente acetato, propionato e butirato (WANG; PAGÁN; SHI, 2002).

## 2.4 DESIDRATAÇÃO

A maioria das culturas probióticas líquidas e congeladas necessitam da cadeia do frio para armazenamento e distribuição, aumentando assim custos na difusão de sua utilização. Entretanto a necessidade de baixa temperatura pode ser reduzida ou eliminada através do uso de desidratados em pó, os quais são potencialmente superiores aos produtos no estado líquido e ou congelado, no que diz respeito à esterilidade e estabilidade (MENG *et al.*, 2007).

A desidratação é freqüentemente utilizada como um meio para estabilizar os probióticos e assim facilitar a estocagem, manuseio, transporte e subsequente uso e aplicações em alimentos funcionais. Porém, algumas culturas desidratadas apresentam viabilidade mais baixa quando comparada às culturas congeladas (SANTIVARANGKA; KULOZIK; FOERST, 2008/a).

A liofilização e a secagem em *spray* são as técnicas mais conhecidas para a desidratação de culturas probióticas e lácticas. Entretanto, a liofilização é a técnica mais difundida e utilizada por apresentar condições de processo mais brandas do que na secagem por *spray* (MENG *et al.*, 2007). Alguns autores também citam o uso de estufa para a desidratação de produtos impregnados com células bacterianas (BETORET *et al.*, 2003) e comparado à liofilização, a secagem por condução de calor é uma alternativa econômica para a preservação de microrganismos (LINDERS *et al.*, 1997).

Os mecanismos de inativação celular durante o processo de secagem ainda não estão completamente elucidados, entretanto sabe-se que as células bacterianas contêm cerca de 70 a 95% de água, e sua remoção impõe obstáculos fisiológicos às células. Isto porque as moléculas de água contribuem para a estabilidade das proteínas, DNA e lipídios além de conferir ordem estrutural às células (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2008/a).

Lievens *et al.* (1994), estudaram o mecanismo de desidratação de células de *L. plantarum* após a secagem a vácuo, sob a hipótese de que a enzima DNase difunde-se para o interior da célula quando há dano na membrana celular. Em conclusão relataram que os mecanismos de inativação celular por desidratação e pelo emprego de temperatura são diferentes, e que a inativação por desidratação causa danos maiores na membrana que a inativação térmica acima de 60°C.

Para a produção de alimentos secos, a maioria dos métodos de secagem envolve a passagem de ar aquecido, com umidade relativa controlada sobre o alimento a ser desidratado, que pode estar parado ou em movimento. Em função de sua maior disponibilidade, o ar é o meio mais utilizado na secagem de alimentos e o seu controle também não apresenta maiores dificuldades (LINDERS *et al.*, 1997).

Dentre os vários métodos de secagem, a secagem a vácuo é utilizada por permitir trabalhar a pressões baixas com temperaturas moderadas menores que 100°C, obtendo-se maiores taxas de evaporação da umidade e um produto final de melhor qualidade, se comparado com a secagem tradicional com ar quente (KROKIDA; ZOGZAS; MAROULIS, 1997). Adicionalmente, não necessita do congelamento prévio do produto como na liofilização (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2006), tornando sua utilização uma interessante alternativa para a produção de alimentos desidratados.

#### **2.4.1 Manutenção da Viabilidade celular**

Uma variedade de protetores celulares, ou chamados solutos compatíveis, podem ser adicionados ao meio para manter a viabilidade do organismo probiótico durante o congelamento e/ou secagem. Este fenômeno, chamado de anidrobiose, tem recebido a atenção de muitos pesquisadores, onde carboidratos como a trealose, sacarose, glicose e lactose, são adicionados ao substrato antes da fermentação, para auxiliar na adaptação dos probióticos ao ambiente, ou são misturados diretamente com a biomassa bacteriana previamente ao processo de secagem (CAPELA; HAY; SHAH, 2006; SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2006).

Os protetores podem agir de diversas maneiras de acordo com a sua natureza. Estes mecanismos de proteção incluem estabilização dos constituintes da membrana celular, formação de uma cobertura de proteção na proteína da parede celular, aumento na temperatura de transição vítrea e formação de interações fortes entre o protetor e a biomolécula, além disso, preparam as células para o estresse hiperosmótico que ocorre durante o processo de secagem (MENG *et*

*al.*, 2007; SANTIVARANGKA; KULOZIK; FOERST, 2008/b). Como o protetor é acumulado dentro da célula, a diferença osmótica do ambiente interno e externo é reduzida (CAPELA; HAY; SHAH, 2006). Dentre os protetores os mais utilizados estão leite em pó desnatado, proteínas do soro, trealose, glicerol, betaína, adonitol, sacarose, glicose, lactose e polímeros como a dextrana e o polietileno glicol (MENG *et al.*, 2007).

A trealose ( $\alpha$ -D-glicopiranosil,  $\alpha$ -D-glicopiranosídeo) é um dissacarídeo não redutor sintetizado por organismos procarióticos e eucarióticos, sendo encontrado em leveduras, bactérias, mofo, algas, plantas e insetos invertebrados (CONRAD *et al.*, 2000). A ação deste açúcar se dá como um agente de proteção das membranas celulares dos organismos durante condições de estresse ambiental como tratamento térmico, desidratação e congelamento (LINDERS *et al.*, 1997; CONRAD *et al.*, 2000; ZAYED; ROOS, 2004). Segundo Ferreira *et al.* (2005) e Tymcyszyn *et al.* (2007), uma maneira de efetivar o efeito do protetor celular é induzir o acúmulo dos solutos compatíveis pela célula, através da adição de estressores ao meio de crescimento.

Além do uso de solutos compatíveis e açúcares protetores, estudos como o de Teixeira *et al.* (1997) e Corcoran *et al.* (2004) têm demonstrado a influência de fatores da fisiologia celular e de condições de estocagem na manutenção da viabilidade da bactéria probiótica durante a desidratação. Como exemplos destes fatores estão a aplicação de condições de estresse suave antes da desidratação, a fase de crescimento à qual a bactéria é submetida ao processo; a composição do meio de crescimento, modificação genética das linhagens probióticas; umidade relativa e a temperatura no armazenamento (MENG *et al.*, 2007; SANTIVARANGKA *et al.*, 2008/b).

Dessa forma o emprego de protetores celulares e estressores pode ser uma alternativa para aumentar a viabilidade de bactérias lácticas adicionadas a alimentos a serem desidratados.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um produto simbiótico vegetal desidratado, para ser adicionado diretamente a alimentos, que atenda a quantidade mínima exigida pela legislação vigente para produtos contendo fibras e probióticos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar a viabilidade de *L. casei* aderidos à farinha de banana verde, farelo de aveia, fibra de maçã ou inulina submetidos à secagem a vácuo a 45°C selecionando aquelas que permitam maior viabilidade celular;

Verificar por microscopia eletrônica a aderência do microrganismo probiótico às fibras e a morfologia celular;

Avaliar o efeito da sacarose como estressor e da trealose como protetor celular na viabilidade do *Lactobacillus casei* aderido a fibras;

Acompanhar a viabilidade do probiótico aderido às fibras que apresentarem maior sobrevivência, com e sem adição do protetor e do estressor, por 28 dias, estocados nas temperaturas de 10°C, 25°C e 40°C.

Estudar a sobrevivência do probiótico aderido à fibra durante simulação do sistema gastrintestinal.

Adicionar o produto simbiótico a uma vitamina comercial e verificar as diferenças sensoriais e aceitação pelos consumidores.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MICRORGANISMO

A cultura liofilizada de *Lactobacillus casei* (LC-1) foi gentilmente cedida pela Christian Hansen (Valinhos, São Paulo, Brasil) para realização do trabalho.

### 4.2 FIBRAS

As matérias-primas utilizadas na presente pesquisa, denominadas como “fibras”, foram: farinha de banana verde de variedade *Musa* spp. obtida diretamente da empresa fabricante ROSITOS, contendo 9% de fibras (anexo A), o farelo de Aveia (Oat Bran) fornecido pela empresa SL Alimentos, contendo mínimo de 16% de fibras e 9-10% de  $\beta$ -glucana (anexo B), a fibra de maçã (Vitacel® AF 400) fornecida pela empresa Clariant, contendo 45% de fibras insolúveis e 15% de solúveis das quais 9,3% são pectina (anexo C) e a Inulina (Beneo® GR – Marca Orafiti®) fornecida pela empresa Clariant contendo mais que 90% de inulina (anexo D).

### 4.3 DETERMINAÇÃO DA FASE DE CRESCIMENTO

Partindo da cultura liofilizada, uma alçada do LC-1 foi inoculada em Caldo Man Rogosa Sharp (MRS, Marca HIMEDIA) estéril e incubado a 37°C por 18 horas. Decorrido este tempo, 1% (v/v) do pré-inoculo foi transferido para 100mL de Caldo MRS estéril e o crescimento acompanhado por 48 horas. A determinação da cinética de crescimento foi realizada em alíquotas retiradas nos tempos 0, 4, 6, 8, 9,

10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 24 e 48 horas de crescimento, por contagem em placas utilizando Agar MRS estéril e incubação a 37°C por 48h.

#### **4.4 OBTENÇÃO DA BIOMASSA DE LC-1**

Para ativação da cultura liofilizada de LC-1, uma alçada foi inoculada em 5mL de caldo MRS (HIMEDIA) e incubada a 37°C por 15h. Decorrido este tempo, 1% (v/v) foi novamente inoculado em 10mL de caldo e incubado a 37°C, 15h (pré-inóculo). Para obtenção da biomassa, 1% (V/V) do pré-inóculo foi transferido para 300mL de caldo MRS e re-incubado nas mesmas condições. A biomassa foi separada por centrifugação em centrífuga refrigerada (Eppendorf) a 14000g (10.000 rpm) 10 min, 4°C e lavada três vezes com solução salina 0,85% (p/v) estéril conforme Zayed e Roos (2004) com modificações.

#### **4.5 ADERÊNCIA DO MICRORGANISMO ÀS FIBRAS E PROCESSO DE DESIDRATAÇÃO**

A biomassa lavada foi ressuspensa em solução salina estéril 0,85% (p/v) em quantidade suficiente para homogeneização de 10g de cada uma das fibras estudadas, sendo 6mL para inulina, 10mL para farelo de aveia, 11mL para farinha de banana verde e 25 mL para fibra de maçã.

As amostras homogeneizadas foram mantidas à temperatura ambiente durante 1h para aderência do LC-1 às fibras, conforme Saarela *et al.* (2006/b). Após este período o pH da farinha de banana verde, fibra de maçã e inulina foi ajustado para 5,5-6,0 com solução saturada de bicarbonato de sódio.

A secagem foi conduzida em estufa a vácuo (Quimis), a 45°C até aproximadamente 5,6 ± 1% de umidade (ZAYED e ROOS, 2004), que corresponde a aproximadamente 25h para farinha de banana verde e farelo de aveia, 30h para a fibra de maçã e 12h para inulina.

## 4.6 SELEÇÃO DAS FIBRAS

### 4.6.1 Determinação da viabilidade celular

Uma amostra de 1g de fibra seca com o LC-1 aderido foi reidratada em 9mL de água peptonada 0,1% (p/v) estéril e mantida por 20 minutos a 37°C com agitação ocasional (SANTIVARANGKNA *et al.*, 2006). Posteriormente, foram realizadas diluições decimais adicionais em água peptonada 0,1% e inoculadas em agar MRS, seguida de incubação a 37°C por 72h (GARDINER *et al.*, 2000). O número de células viáveis foi determinado por contagem em placas antes e depois da secagem

Para verificar as fibras que obtiveram maior sobrevivência celular após a secagem, foi calculado o percentual de células recuperadas segundo equação 1 (CORCORAN *et al.* 2004):

$$\% \text{ Células Recuperadas} = \frac{\log \text{ UFC/g final} \times 100}{\log \text{ UFC/g Inicial}} \text{ (Eq. 1)}$$

Onde: Log UFC/g final = contagem do número de células viáveis do *L. casei* aderido às fibras logo após secagem;

Log UFC/g inicial = contagem do número de células viáveis do *L. casei* aderido às fibras imediatamente antes da secagem.

O experimento foi conduzido com duas repetições genuínas em duplicata e os resultados submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey, com significância de  $p \leq 0,10$ , analisados no programa computacional Statistica 7.0.

#### 4.6.2 Análises Físico-Químicas

Análises de pH, atividade de água ( $A_w$ ) e umidade foram realizadas em duplicatas após secagem de cada uma das fibras. O pH e o teor de umidade foram determinados conforme normas oficiais do Instituto Adolfo Lutz (1985), e a  $A_w$  mensurada diretamente no equipamento Aqualab CX-2.

#### 4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Para as análises de microscopia eletrônica de varredura, o material foi fixado em glutaraldeído 3%, paraformaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2, por um período de 12h a temperatura ambiente. Após a fixação primária, as amostras foram lavadas em três banhos de tampão cacodilato de sódio, pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão por 2h à temperatura ambiente e novamente lavadas em tampão. Em seguida o material foi desidratado em série alcoólica crescente e seco ao ponto crítico no CPD 030 *critical point dryer* (BAL-TEC AG, Balzers, Liechtenstein). As amostras secas foram montadas em *stubs* de alumínio usando fita de carbono e cobertas com ouro (Sputter coater – Baltec SCD 050). As imagens foram obtidas utilizando o microscópio eletrônico de varredura FEI – Quanta 200 do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina (LMEM/ PPPG-UEL).

#### 4.8 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SACAROSE COMO ESTRESSOR E DA TREALOSE COMO PROTETOR CELULAR NA VIABILIDADE DO MICRORGANISMO ADERIDO ÀS FIBRAS

Nas fibras que permitiram a recuperação do maior número de células viáveis de LC-1 conforme item 4.6, os efeitos da sacarose como estressor e o da trealose como protetor celular, foram avaliados conforme planejamento fatorial

2 x 3 realizado no programa Statística 7.0. Em ensaios aleatórios foram estudadas as concentrações de sacarose de 10g e 20g por litro de Caldo MRS, e de 0,1M, 0,25M e 0,4M para trealose (dados baseados na literatura). Previamente, as diferentes concentrações de ambos os açúcares foram esterilizadas em filtro de porosidade de 0,2  $\mu$ m e diâmetro de 47 mm (Marca Schleicher & Schuell).

As soluções esterilizadas de sacarose (Marca Synth) foram adicionadas ao caldo MRS estéril durante o cultivo celular. A trealose, com grau de pureza maior que 98%, (cedida pela empresa Tovani Benzaquen com. Imp. Exp. e Representações Ltda) foi adicionada à biomassa centrifugada e a mistura mantida por 1 hora em temperatura ambiente (CONRAD *et al.*, 2000). Após este tempo, a mistura de biomassa e solução de trealose foi adicionada às fibras e homogeneizada seguindo-se de secagem à vácuo a 45°C por 25 horas. A viabilidade do LC-1 foi determinada por contagem em placas com agar MRS e incubação por 72h à 37°C (GARDINER *et al.*, 2000) e os resultados analisados com auxílio do programa Statística 7.0.

#### **4.9 AVALIAÇÃO DURANTE ARMAZENAMENTO**

A estabilidade a 10°C, 25°C e 40°C foi acompanhada durante 28 dias de armazenamento, em amostras sem adição de sacarose e trealose e com adição nas concentrações que permitiram a recuperação do maior número de células viáveis conforme item anterior. Porções de 10g do produto seco foram embaladas em saches de BOPP metalizados hermeticamente selados. Análises de viabilidade celular, pH, atividade de água ( $A_w$ ) e umidade foram conduzidas a cada 7 dias, em duplicatas para cálculo da média de duas repetições dos tratamentos e o gráfico foi plotado pelo programa computacional Microsoft Excel 2003.

#### **4.10 SOBREVIVÊNCIA DO LC-1 ADERIDO À FIBRA APÓS INCUBAÇÃO EM CONDIÇÕES GASTRINTESTINAIS SIMULADAS**

Para a análise em condições gastrintestinais simuladas, a resistência ao suco gástrico e intestinal foi realizada separadamente, em células livres (controle) e aderidas ao farelo de aveia (fibra selecionada conforme itens 4.6 e 4.9), com e sem adição de estressor e protetor, em duplicatas com duas repetições, seguindo-se o procedimento descrito por Krasaekoopt, Bhandari e Deeth (2004) com modificações.

##### **4.10.1 Resistência à acidez**

Para o teste de tolerância ao ácido, 1mL do microrganismo cultivado em Caldo MRS por 15 horas (controle) ou 1g do simbiótico desenvolvido (farelo de aveia com LC-1 aderido), foi colocado em tubos com 9mL de solução estéril de HCl 0,08M contendo 0,2% de NaCl, pH 1,55, por 30, 60, 90 e 120 minutos e incubados a 37°C. Após este período foram realizadas contagens em Agar MRS.

##### **4.10.2 Resistência aos sais biliares**

No teste de resistência aos sais biliares, 1mL do microrganismo cultivado em Caldo MRS por 15 horas (controle) ou 1g do simbiótico foi transferido para tubos contendo 9mL de suco intestinal simulado esterilizado (0,05M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> contendo 0,6% de sais biliares, pH 7,4) e incubados por 150 minutos a 37°C. A sobrevivência do LC-1 foi determinada por contagem em placas utilizando Agar MRS.

#### 4.11 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Para garantir as condições microbiológicas e a segurança do produto a ser oferecido aos provadores, análises de *Staphylococcus aureus*, bolores e leveduras, *Salmonella* spp, *Bacillus cereus*, coliformes totais e coliformes à 45°C, foram realizadas segundo Silva *et al.* (2001).

#### 4.12 ANÁLISE SENSORIAL

Como o produto formulado é destinado à adição imediata em alimentos prontos para o consumo, para a realização dos testes sensoriais, foi utilizado como veículo uma vitamina comercial em pó (Neston Vitamina sabor mamão, maçã e banana, Nestlé®) preparada com leite integral UHT (CATIVA) conforme instruções do fabricante, sendo 30g de vitamina em pó adicionadas a 200mL de leite.

Previamente à realização dos testes sensoriais, o projeto foi submetido ao “Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/Hospital Regional Norte do Paraná”, obtendo como parecer “aprovado” (Protocolo nº 221/07) (Anexo E).

Para atender o consumo diário recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil – ANVISA (BRASIL, 2007), para alimentos contendo probiótico e fibra alimentar, deve-se adicionar 12g do simbiótico desenvolvido em 200mL de vitamina. Seguindo esta proporcionalidade, os testes sensoriais foram conduzidos adicionando 40mL das formulações em copos plásticos brancos codificados com número de três dígitos aleatórios, aos quais foram oferecidas aos julgadores, acompanhadas de água mineral.

Para verificar a existência de diferença entre uma amostra controle (vitamina + farelo de aveia) e a amostra testada (vitamina + farelo de aveia com probiótico), foi aplicado um teste triangular, com uma equipe treinada de 20 julgadores, utilizando ficha conforme Figura 2.

A aceitabilidade da vitamina, da vitamina adicionada de farelo de

aveia e da vitamina adicionada do produto probiótico, foi determinada realizando-se o teste de aceitação com 51 provadores não treinados, utilizando escala hedônica estruturada de nove pontos (Figura 3) e apresentação seqüencial das amostras. A partir dos resultados, foi aplicada análise de variância (ANOVA), sendo  $p < 0,05$ , e calculados os índices de aceitação pelo programa computacional SAS 8.0.

TESTE TRIANGULAR		
Nome:.....Data:.....		
Por favor, anote os códigos das amostras de vitamina, avalie-as da esquerda para a direita e, assinale qual das três considerou diferente em relação a cor, textura ou odor e, se desejado, faça comentários sobre as diferenças percebidas.		
_____	_____	_____
Comentários:.....		
.....		

**Figura 2** – Ficha teste triangular

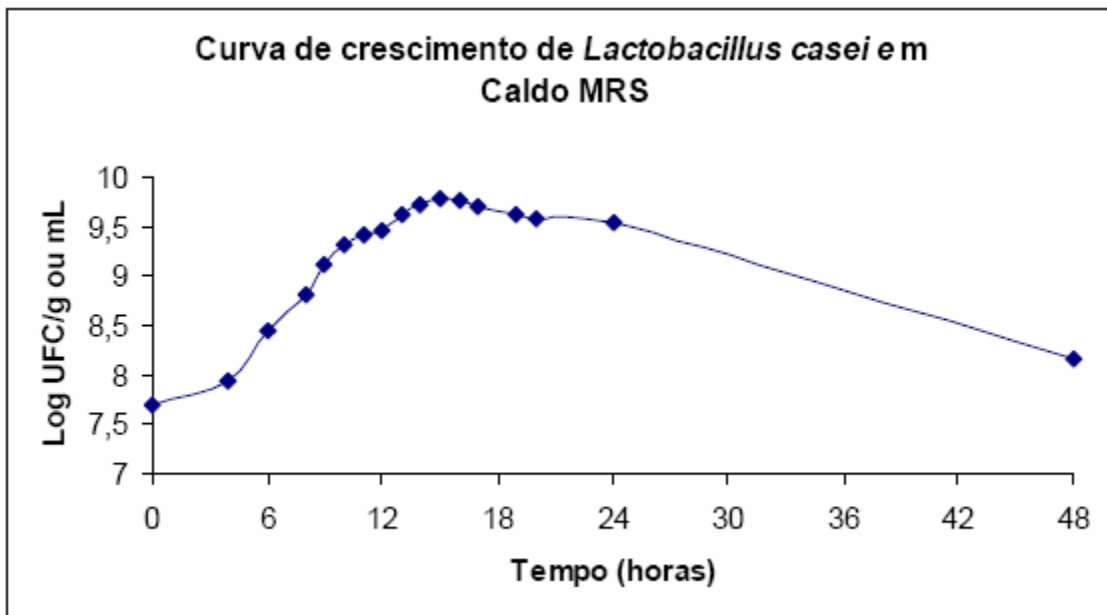
TESTE DE ACEITAÇÃO	
<b>Nome:</b> .....	<b>Data:</b> .....
Por favor, avalie a amostras de vitamina utilizando a escala abaixo, para dizer o quanto gostou ou desgostou do produto e, se desejado, faça comentários sobre ele.	
1- Desgostei muitissimo	
2- Desgostei muito	
3- Desgostei	
4- Desgostei ligeiramente	
5- Não gostei nem desgostei	
6- Gostei ligeiramente	
7- Gostei	
8- Gostei muito	
9- Gostei muitissimo	
<b>Código da amostra</b> _____	<b>Nota</b> _____
Comentários:.....	
.....	
.....	

**Figura 3** – Ficha teste de aceitação utilizando escala hedônica

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DETERMINAÇÃO DA FASE DE CRESCIMENTO

Na figura 4 está apresentada a curva de crescimento do LC-1 em 48h de cultivo. No período que compreende 0 e 4 h, o LC-1 encontrava-se na fase *lag*, de adaptação ao meio de cultivo, entre 5 e 13 h em sua fase de crescimento exponencial ou *log*, na qual as células dividem-se ao máximo e entre 14 e 17 h o LC-1 encontrava-se na fase estacionária, onde a velocidade de crescimento diminui até que o número de células novas iguale-se ao de células mortas. A partir de 19 h de cultivo, pode ser visualizada (Figura 4) a fase de morte celular, onde o LC-1 encontrava-se em declínio (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997).



**Figura 4** – Curva de crescimento do *Lactobacillus casei* cultivado por 48 horas em Caldo MRS a 37°C.

Quando uma bactéria entra em sua fase estacionária desenvolve uma resistência geral ao estresse, sendo assim, mais resistente ao processamento e armazenamento do que em sua fase *log*. Isto ocorre devido a exaustão das fontes

disponíveis de alimento que desperta uma resposta ao estresse e permite a sobrevivência da população celular (MENG *et al.*, 2007).

Neste contexto, Corcoran *et al.* (2004) submeteram células de *L. rhamnosus* a secagem por *spray-dryer*, nas fases lag, log e estacionária e obtiveram 50% de recuperação celular durante a fase estacionária, que foi superior à recuperação da fase log (14%) e, da fase lag, (2%), onde as células demonstraram a maior susceptibilidade. Dessa forma para o desenvolvimento do produto proposto no presente estudo foi eleito o tempo de 15 h de cultivo do LC-1 com base nas características de crescimento do *L. casei* em Caldo MRS a 37°C.

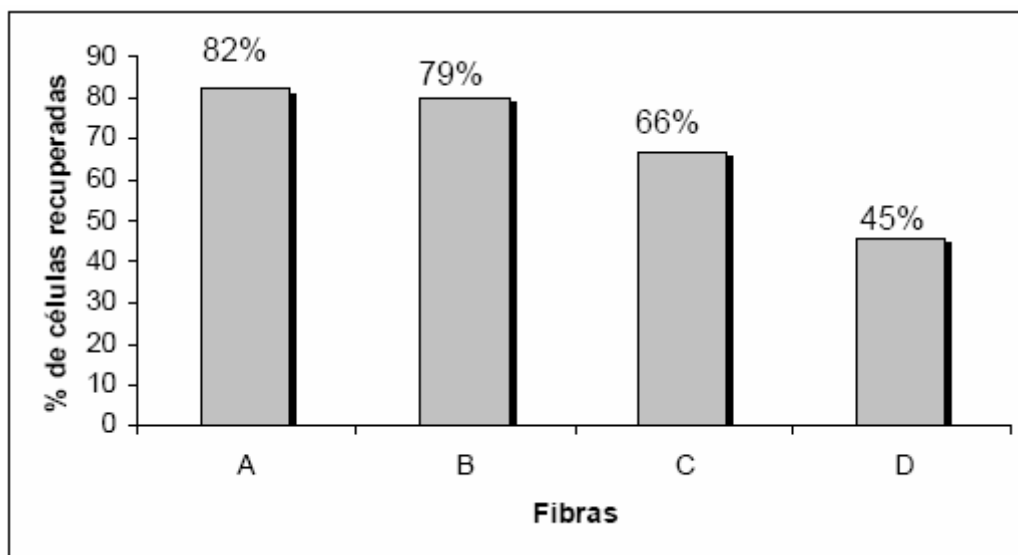
## 5.2 SELEÇÃO DAS FIBRAS

As fibras utilizadas no presente estudo foram selecionadas com base em seus possíveis efeitos prebióticos, que por favorecerem o crescimento dos microrganismos benéficos no intestino (RASTALL; MAITIN, 2002), supostamente poderiam auxiliar em sua sobrevivência durante e após a secagem.

Em ensaios preliminares foi constatado que na farinha de banana verde, fibra de maçã e inulina, todas com valores de pH inferiores a 4,0 (dados não mostrados), a sobrevivência do LC-1 após o processo de secagem foi baixa. Por outro lado, no farelo de aveia cujo pH final ficou próximo de 5,7 a viabilidade celular foi maior. Assim sendo, com exceção do farelo de aveia, foi realizado um ajuste de pH para 5,5-6,0 com solução saturada de bicarbonato de sódio antes do processo de secagem das fibras.

A figura 5 mostra as médias percentuais de células viáveis de LC-1 após a secagem de cada uma das fibras. A sobrevivência do LC-1 quando aderido à farinha de banana verde e ao farelo de aveia não apresentou diferença significativa ao nível de 90% sendo que ambas as fibras permitiram as maiores recuperações celulares após secagem. Apesar de a inulina ser a fibra com propriedade prebiótica mais conhecida e amplamente estudada, no presente estudo foi a que apresentou menor sobrevivência celular após a secagem a vácuo à 45°C, seguida pela fibra de maçã.

A umidade das fibras após a secagem foi de  $5,6 \pm 1,0\%$  e a  $A_w$  variou de 0,25 a 0,35, conforme propriedades individuais de cada fibra (dados não mostrados).



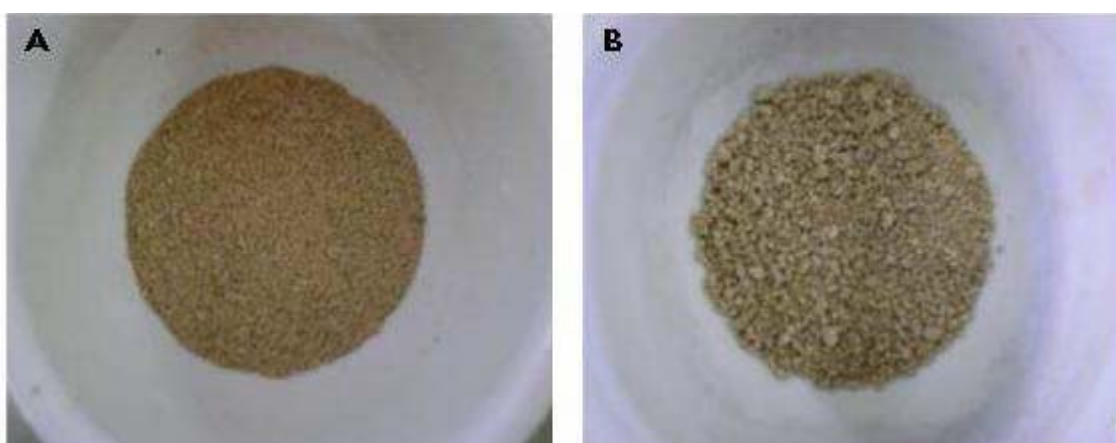
**Figura 5** – Médias percentuais de duas determinações com análises realizadas em duplicatas de células de *L. casei* recuperadas após a secagem a vácuo a 45°C. A: Farelo de aveia, B: Farinha de banana verde, C: Fibra de maçã e D: Inulina

Mesmo com o ajuste prévio do pH, ao final do processo de desidratação, a inulina e a fibra de maçã apresentaram as menores viabilidades celulares e valores de pH de 4,0 e 4,2 respectivamente. Em contrapartida, maiores sobrevivências do LC-1 foram observadas para a farinha de banana verde e para o farelo de aveia, cujos valores de pH foram 5,4 e 5,7 respectivamente. Estes resultados estão de acordo com Saarela *et al.* (2006/b), que avaliaram a sobrevivência e estabilidade sob armazenamento de *L. rhamnosus* aderido a diferentes fibras, após o processo de liofilização e também observaram a menor viabilidade na fibra de maçã e na inulina. Provavelmente a combinação dos 2 fatores, pH e injúria ocasionada pelo processo de secagem, podem ter contribuído para resultado de ambos estudos (SAARELA *et al.*, 2006/b).

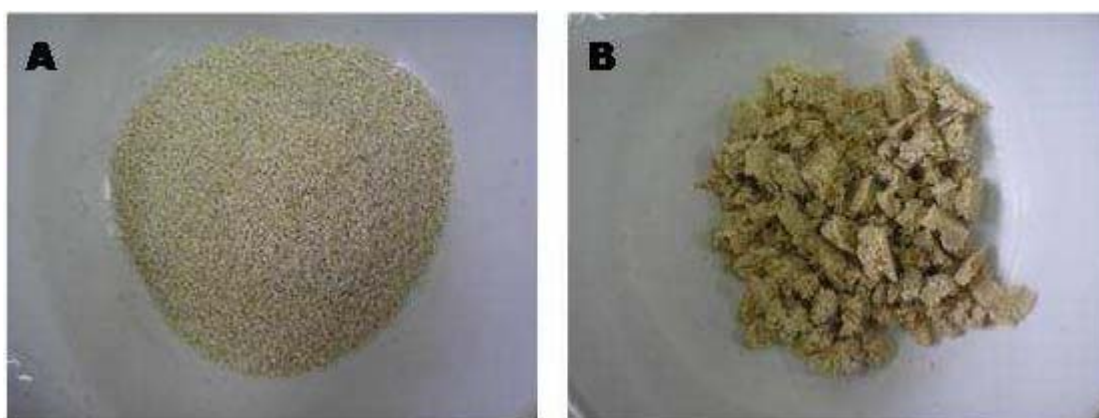
As maiores viabilidades obtidas para o farelo de aveia e para a farinha de banana verde podem ser justificadas pela composição de ambas, onde o farelo de aveia utilizado apresentava um teor de  $\beta$ -glucanas de 9-10% e a farinha de banana verde, grande quantidade de amido resistente que, juntamente a outros

compostos, como açúcares simples e compostos nitrogenados podem ter contribuído para uma maior sobrevivência celular durante a secagem nestas fibras. Segundo Michida *et. al.* (2006) alguns fatores podem contribuir para o aumento da viabilidade celular em condições estressantes sendo que a composição do meio em termos de açúcares solúveis e compostos nitrogenados, são os principais.

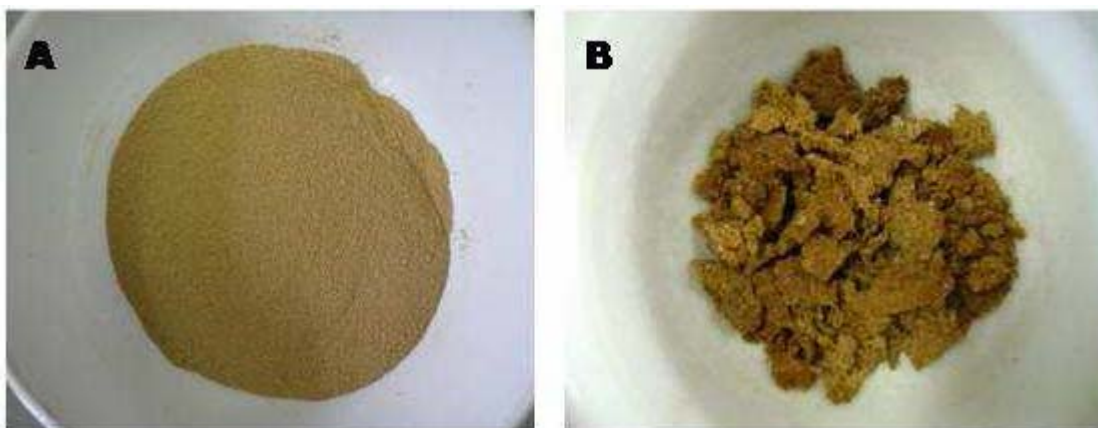
As figuras 6, 7, 8 e 9 mostram os aspectos da farinha de banana verde, farelo de aveia, fibra de maçã e inulina, respectivamente, antes (A) e após (B) a aderência do LC-1 e secagem à 45°C sob vácuo. É possível observar que, após a desidratação, as matérias-primas ficaram com aspecto granular ao invés de pó como na sua forma inicial. Esta diferença, ocasionada pelo processamento, demonstra as possíveis alterações na textura e sabor ocorridas nas fibras, tornando necessária uma análise subsequente para verificar a aceitação pelos consumidores.



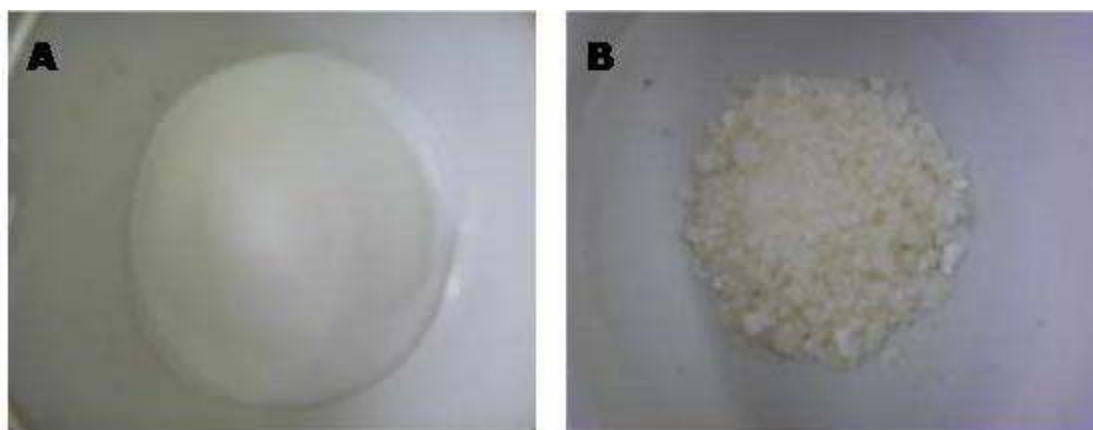
**Figura 6** – Farinha de banana verde antes (A) e após (B) aderência do *L. casei* e secagem a vácuo à 45°C.



**Figura 7** – Farelo de aveia antes (A) e após (B) aderência do *L. casei* e secagem a vácuo à 45°C.



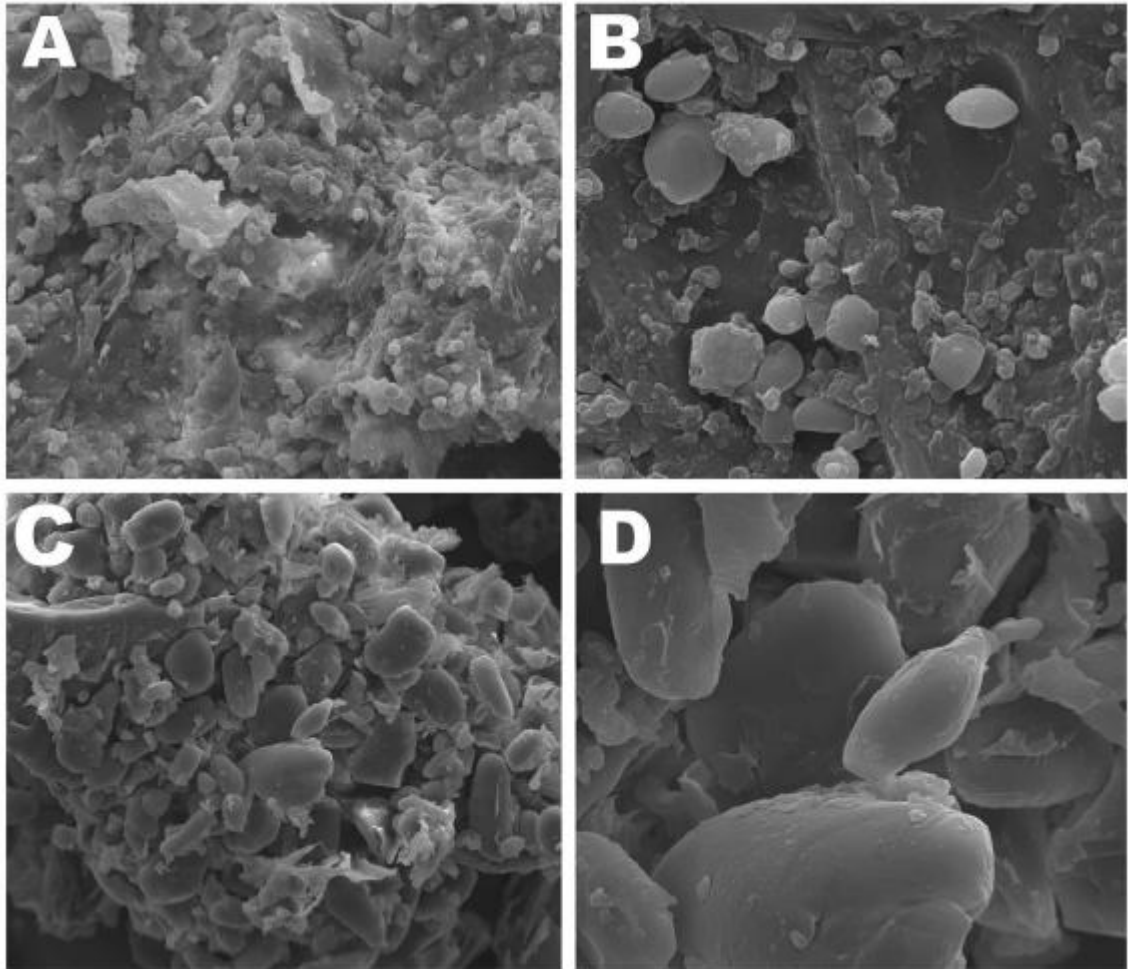
**Figura 8** – Fibra de maçã antes (A) e após (B) aderência do *L. casei* e secagem a vácuo à 45°C.



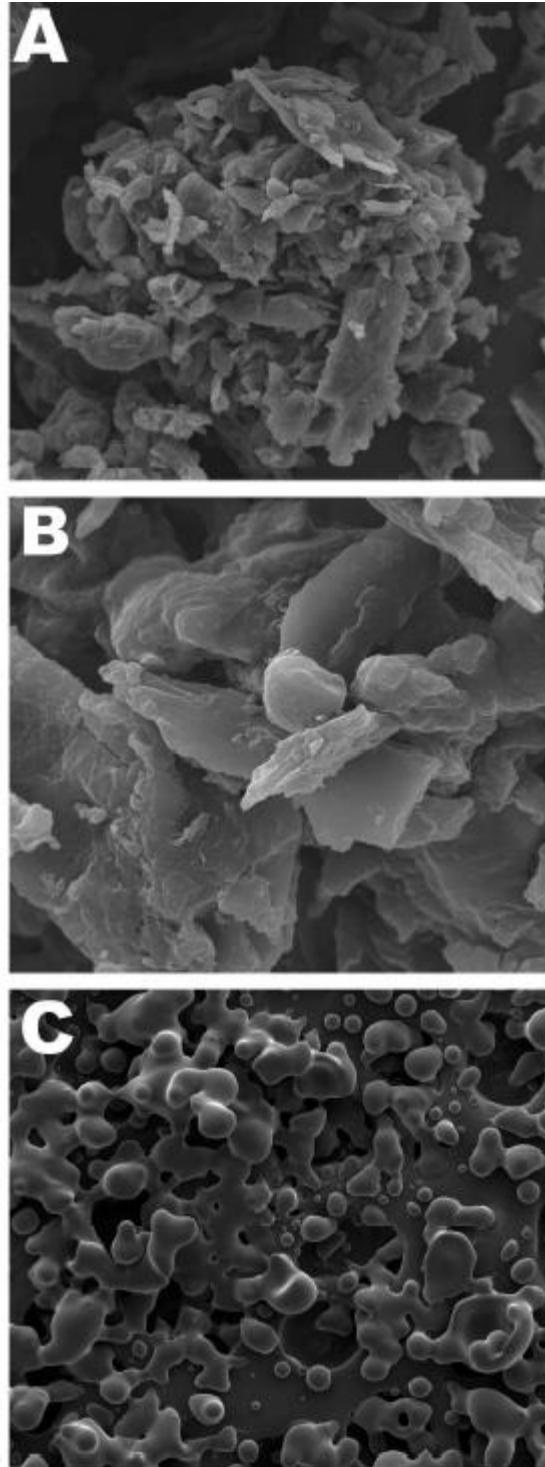
**Figura 9** – Inulina antes (A) e após (B) aderência do *L. casei* e secagem a vácuo à 45°C.

### 5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

As análises de microscopia eletrônica de varredura permitiram visualizar as fibras e o comportamento do LC-1 aderido antes e após o processo de secagem.



**Figura 10** – Microscopia eletrônica de varredura do farelo de aveia (A e B) e farinha de banana verde (C e D) sem adição de *L. casei*, com aumentos de 700 e 2500 vezes.



**Figura 11** – Microscopia eletrônica de varredura de fibra de maçã (A e B) e Inulina (C) sem adição de *L. casei* com aumentos de 700 e 2500 vezes.

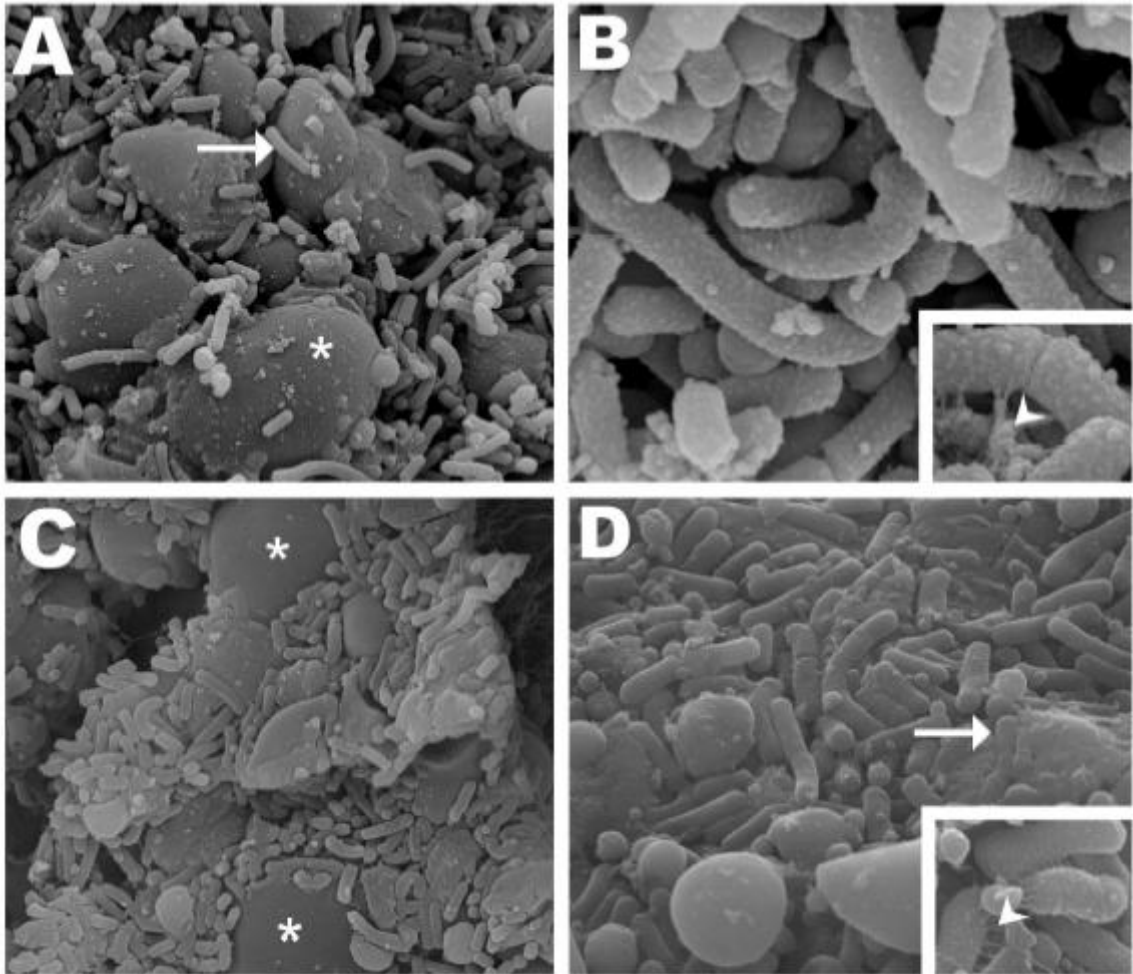
Nas imagens obtidas para as matérias-primas, no farelo de aveia e na farinha de banana verde (Figura 10) é possível verificar grandes estruturas ovais referentes a grânulos de amido. Freitas e Tavares (2005) obtiveram imagens semelhantes quando observaram amido de banana por microscopia eletrônica de varredura. Adicionalmente, segundo Juarez-Garcia *et al.* (2006), a farinha de banana verde apresenta em média 73% de amido em seu conteúdo total e Weber, Gutkoski e Elias (2002) relataram em média 42% de amido para aveia.

Em contrapartida, foi observado nas imagens da fibra de maçã estrutura em forma de “lascas” (Figura 11-A e B) e, para a inulina, devido à sua alta solubilidade, não foram obtidas imagens nítidas de sua estrutura (Figura 11-C).

Nas imagens obtidas após adição do *L. casei* nas fibras, observa-se que o microrganismo encontra-se aderido nas matrizes, que contêm amido, fibras, proteínas e outros componentes residuais. Imagens semelhantes foram obtidas no estudo de Michida *et al.* (2006), quando observaram células de *L. plantarum* imobilizadas em fibra de malte e cevada.

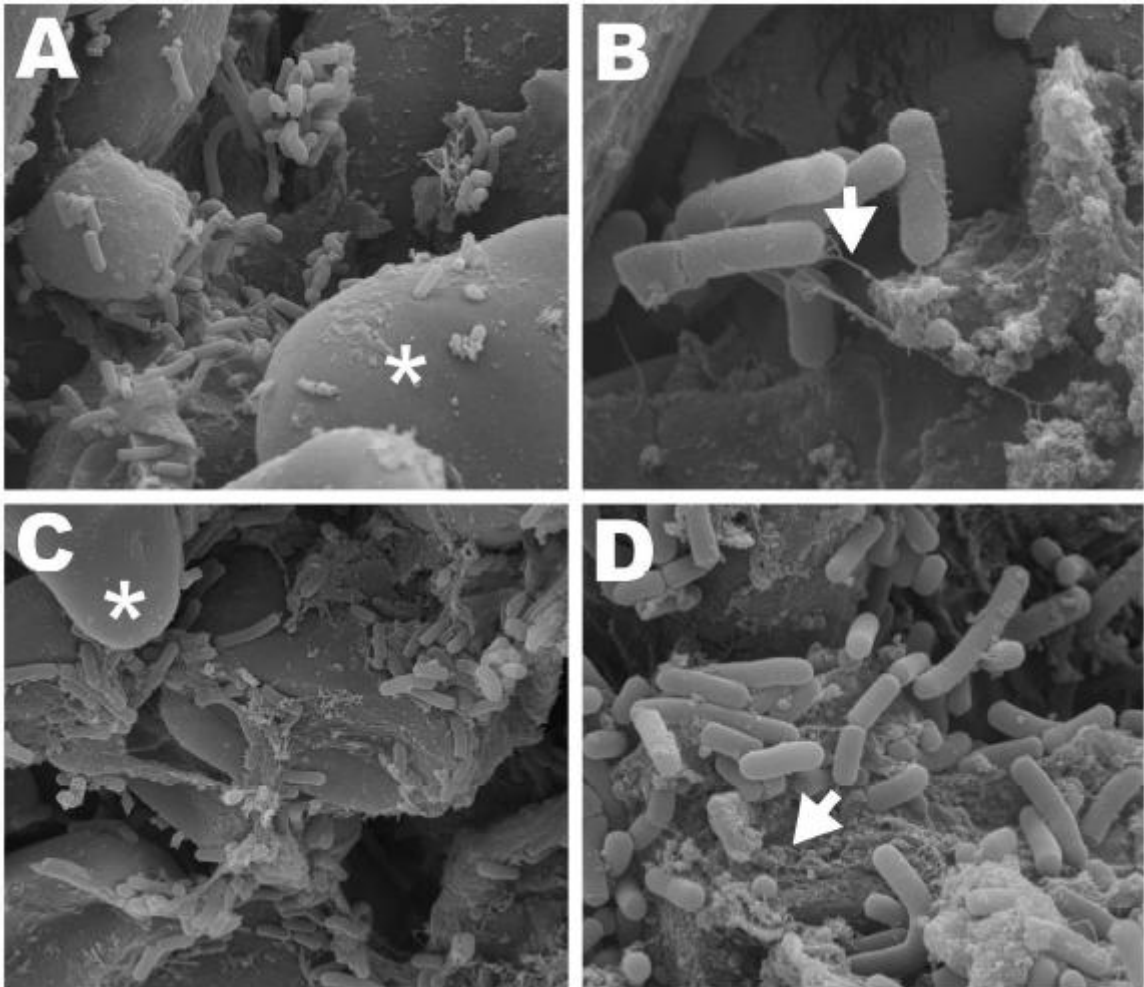
No farelo de aveia adicionado de probiótico, antes (figura 12-A e B) e após a secagem (figura 12-C e D), foi observada a presença de filamentos, que aderem as bactérias ao farelo e bactérias entre si. Supostamente estes filamentos são exopolissacarídeos excretados a partir do LC-1. Também foi verificada a distribuição homogênea do LC-1 na amostra sem alterações morfológicas após a secagem à vácuo.

A figura 13 mostra as imagens de microscopia para a farinha de banana verde antes (A e B) e após a secagem (C e D). Semelhantemente ao observado no farelo de aveia, a distribuição do LC-1 foi uniforme na amostra, com a presença de exopolissacarídeos unindo as bactérias entre si e na farinha, sem apresentar diferenças morfológicas antes e após a desidratação.



**Figura 12** – Microscopia eletrônica de varredura do farelo de aveia após adição de *L. casei*, antes (A e B) e após secagem à 45°C sob vácuo (C e D) com aumentos de 5.000 e 20.000 vezes.

Asteriscos: Grânulos de amido do farelo de aveia; Setas: *L. casei* aderido às estrutura do farelo; Detalhe: ponta de seta: Exopolissacarídeos



**Figura 13** – Microscopia eletrônica de varredura da farinha de banana verde após adição de *L. casei* antes (A e B) e após secagem à 45°C sob vácuo (C e D) com aumentos de 5.000 e 20.000 vezes.

Asteriscos: Grânulos da farinha de banana verde; Setas: Exopolissacarídeos

Na fibra de maçã (figura 14) foi observada a presença de exopolissacarídeos produzidos pelo LC-1 e diferença morfológica entre as células antes (A e B) e após o processo de secagem (C e D). Além disso, foram observadas células injuriadas, demonstrando a baixa sobrevivência observada na etapa de avaliação das fibras para a fibra de maçã.

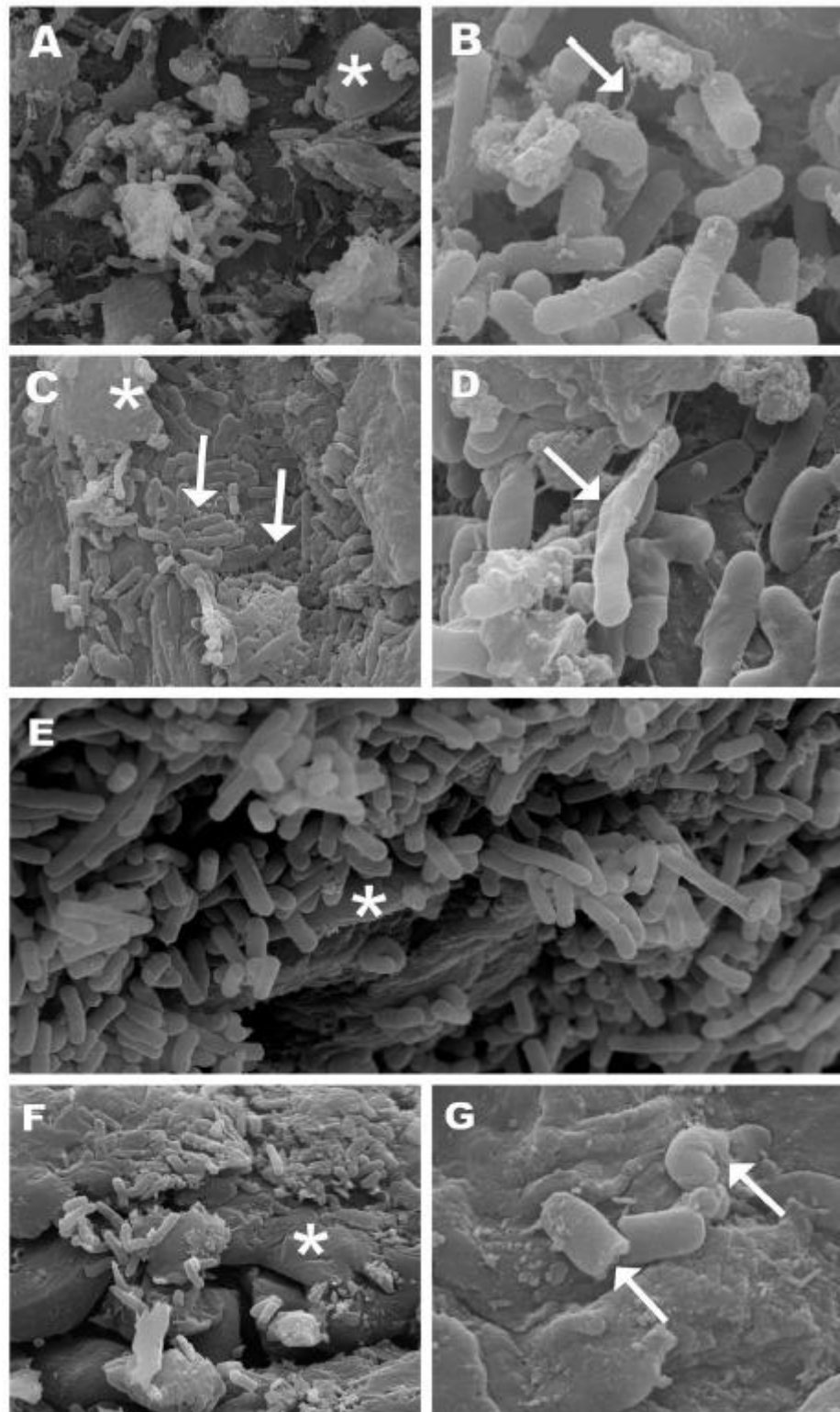
Nas análises da inulina antes (Figura 14-E) e após a secagem (figuras 14-F e G) não foram observados exopolissacarídeos unindo as bactérias entre si e bactérias na inulina. Nesta fibra, após a secagem, as células de LC-1 estavam em número consideravelmente menor do que nas demais fibras estudadas e, a maioria das células apresentou-se injuriada, elucidando a baixa sobrevivência

obtida na etapa inicial deste estudo.

Os polissacarídeos produzidos a partir de bactérias, inclusive pelas lácticas, são chamados de exopolissacarídeos (EPS) e embora neste estudo não tenham sido quantificados, a visualização de EPS de *L. casei* pode indicar um mecanismo de proteção em condições estressantes. Segundo Ruas-Madiedo, Hugenholtz e Zoon (2002), esses polissacarídeos têm a função de proteção celular contra, por exemplo, desidratação, fagocitose, ataque de bacteriófagos, antibióticos ou compostos tóxicos e estresse osmótico. EPS também tem o papel na identificação celular, na adesão em superfícies e na formação de biofilmes facilitando a colonização a vários ecossistemas (RUAS-MADIEDO; HUGENHOLTZ; ZOON, 2002).

As maiores sobrevivências encontradas para o farelo de aveia e para a farinha de banana verde pode ser também explicada pela produção de EPS. Schiavão-Souza *et al.* (2007) e Ayala-Hernandez *et al.* (2009) sugerem que sua produção está ligada à presença de nutrientes justificando o resultado obtido, pois além da  $\beta$ -glucana e do amido resistente, que apresentam efeitos prebióticos, estas fibras apresentavam em sua composição carboidratos disponíveis e proteínas.

A fibra de maçã utilizada no estudo, mesmo em menor quantidade, também apresentava em sua composição proteínas e carboidratos disponíveis e, embora o microorganismo tenha encontrado subsídios para a produção de EPS, o estresse ocasionado pela acidez do meio não permitiu maiores recuperações celulares.



**Figura 14** – Microscopia eletrônica de varredura de: fibra de maçã após adição de *L. casei* antes (A e B) e após secagem à 45°C sob vácuo (C e D) e de Inulina antes (E) e após do processo de secagem (F e G) com aumentos de 2.500 e 20.000 vezes. Imagens A e C: asteriscos: Fibra de maçã; Imagem B: seta: Exopolissacarídeos; Imagens C, D e G: seta: Células injuriadas; Imagens E e F: asteriscos: estrutura da Inulina;

## 5.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SACAROSE COMO ESTRESSOR E DA TREALOSE COMO PROTETOR CELULAR

### 5.4.1 Farinha de banana verde

Na avaliação da farinha de banana verde a maior viabilidade foi obtida com 20g/L de sacarose e com 0,4M de trealose que correspondem estatisticamente aos níveis codificados +1. Na Tabela 2 estão apresentados os valores reais e codificados utilizados para a sacarose e trealose, e o resultado correspondente observado para a viabilidade do LC-1 após secagem.

Após análise estatística, foi verificado que a sacarose e a trealose têm efeito na sobrevivência do microrganismo, sendo que somente a trealose foi significativa ao nível de 95% ( $p=0,02$ ).

O aumento da concentração de trealose do nível -1 (0,1M) para +1 (0,4M), produziu um efeito positivo na sobrevivência do LC-1 de 1,77 ciclos log, superior ao efeito da sacarose de 0,4 ciclos log na viabilidade celular, quando aumentou do nível -1 (10g/L) para +1 (20g/L).

As curvas de superfície de resposta (figura 15) permitiram visualizar que a região de maior viabilidade celular, é dada pelas maiores concentrações de sacarose e de trealose.

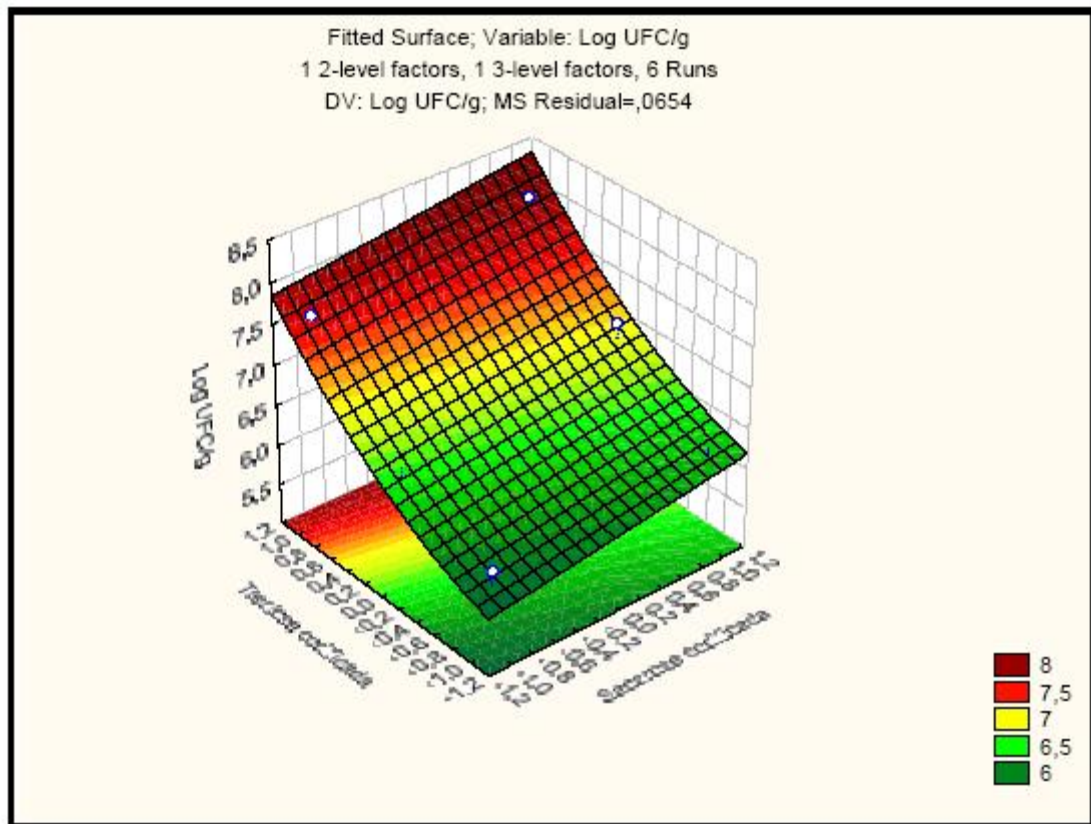
O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) do modelo obtido, que expressa a porcentagem de respostas explicadas pelos efeitos das variáveis foi de 0,91 evidenciando a adequação do modelo. A partir do cálculo dos coeficientes foi possível obter a seguinte equação ajustada para os dados experimentais:

$$Y = 6,84 + 0,20x_1 + 0,88x_2 - 0,11x_2^2 \quad (\text{Eq. 2})$$

**Tabela 2** – Valores reais e codificados de adição de sacarose e trealose à farinha de banana verde e os resultados da viabilidade do *L. casei* (LC-1)

Sacarose valores codificados	Trealose valores codificados	Sacarose (g/L) valores reais	Trealose (M) valores reais	Log UFC/g de farinha de banana verde
-1	-1	10	0,1	6,00
-1	0	10	0,25	6,30
-1	+1	10	0,4	7,62
+1	-1	20	0,1	6,06
+1	0	20	0,25	7,08
+1	+1	20	0,4	7,98

A presença do termo quadrático de sinal negativo na equação indica que a resposta está se aproximando da sua região de ótimo. Sendo o referido termo dado pela trealose ( $x_2$ ), a melhor resposta estaria deslocada para uma região onde uma maior concentração de trealose seria necessária para atingir uma maior resposta.



**Figura 15** – Gráfico de superfície de resposta obtido após secagem de farinha de banana verde com *L. casei* aderido, para as variáveis codificadas sacarose e trealose, tendo como resposta a viabilidade do LC-1 em log de UFC/g.

Para obter uma maior sobrevivência celular nesta fibra, foi proposto um novo ensaio seguindo a tendência de aumento da resposta de acordo com o modelo estatístico obtido. Assim sendo, as novas concentrações utilizadas para a sacarose e trealose foram 21g/L, 22g/L, 23g/L, 24g/L e 0,475M; 0,55M; 0,625M; 0,7M respectivamente.

A Tabela 3 mostra os valores reais e codificados para a trealose e sacarose, e a viabilidade do LC-1 após secagem à vácuo, para o novo ensaio proposto na farinha de banana verde.

**Tabela 3** – Valores reais e codificados do novo delineamento para a adição de sacarose e trealose à farinha de banana verde e os resultados de viabilidade de *L. casei* (LC-1)

Sacarose valores codificados	Trealose valores codificados	Sacarose (g/L) valores reais	Trealose (M) valores reais	Log UFC/g de farinha de banana verde
1,2	1,5	21	0,475	7,732
1,4	2,0	22	0,55	7,623
1,6	2,5	23	0,625	5,477
1,8	3,0	24	0,7	5,6

Como pode ser observado, o aumento das concentrações de sacarose e de trealose não aumentou a viabilidade do LC-1 na farinha de banana verde, conforme indicado pelo modelo estatístico. Supostamente o excesso de protetor acumulado na célula ao invés de proteger o microrganismo durante a desidratação, ocasionou um estresse osmótico não desejado, levando à morte através da saída passiva de água, concordando com o observado por Santivarangka *et al.*, 2006.

#### 5.4.2 Farelo de Aveia

A Tabela 4 apresenta os valores reais e codificados dos ensaios da sacarose e da trealose para o farelo de aveia, com os respectivos resultados

observados para células viáveis de LC-1 após a secagem. Assim como na farinha de banana verde o melhor resultado foi obtido com 20g/L de sacarose e com 0,4M de trealose, correspondentes aos níveis +1, sendo que este resultado pode ser visualizado no gráfico de curvas de superfície de resposta (Figura 16).

**Tabela 4** – Valores reais e codificados de adição de sacarose e trealose ao farelo de aveia e os resultados de viabilidade de *L. casei* (LC-1)

Sacarose valores codificados	Trealose valores codificados	Sacarose (g/L) valores reais	Trealose (M) valores reais	Log UFC/g farelo de aveia
-1	-1	10	0,1	7,75
-1	0	10	0,25	7,94
-1	+1	10	0,4	8,25
+1	-1	20	0,1	7,43
+1	0	20	0,25	8,38
+1	+1	20	0,4	8,70

A análise dos resultados com sacarose e com trealose revelaram que ambos, bem como sua interação têm efeito na viabilidade do LC-1, sendo que somente a trealose foi significativa ao nível de 95% ( $p=0,04$ ).

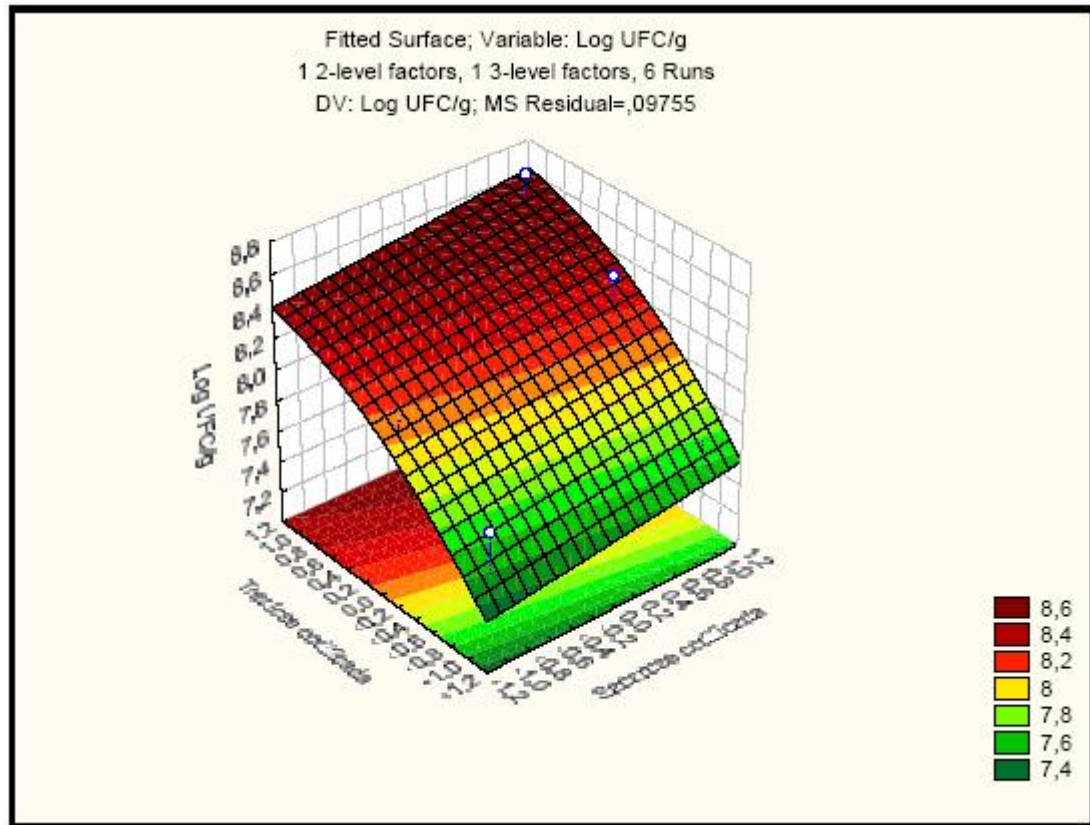
A proporção entre os efeitos da trealose e da sacarose para o farelo de aveia, permaneceu semelhante aos da farinha de banana verde, porém o efeito do aumento da concentração de trealose foi de 0,88 ciclo log, e o da sacarose 0,19 ciclo log, inferiores aos efeitos encontrados para a fibra anterior. A interação entre os dois protetores apresentou um efeito positivo de 0,38 ciclo log. É interessante ressaltar que o efeito da sacarose foi baixo em relação ao da trealose e, embora não significativo, sua interação teve um efeito positivo na sobrevivência do LC-1, tornando interessante sua manutenção.

Ferreira *et al.* (2005) e Tymczyn, Gómez-Zavaglia e Disalvo (2007) relataram que quando lactobacilos crescem em meio contendo fatores de estresse como a sacarose, o uso da trealose durante a secagem melhora a resistência do microrganismo, aumentando sua sobrevivência.

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) ajustado do modelo foi 0,83, o que representa um bom ajuste pois refere-se a dados microbiológicos. Os coeficientes calculados para a viabilidade do LC-1 após a secagem a vácuo, em Log

UFC/g, permitiram desenhar a equação ajustada para os dados experimentais:

$$Y = 8,07 + 0,095x_1 + 0,44x_2 + 0,19x_1x_2 \quad (\text{Eq.3})$$



**Figura 16** – Gráfico de superfície de resposta obtido após secagem de farelo de aveia com *L. casei* aderido, para as variáveis codificadas sacarose e trealose, tendo como resposta a viabilidade do LC-1 em log de UFC/g.

Embora o modelo estatístico indicasse uma maior viabilidade celular no farelo de aveia com o aumento das concentrações dos açúcares, não foram realizados novos experimentos porque o número de células viáveis desejados para um produto probiótico foi alcançado. Em adição, considerando os efeitos, seria necessário o emprego de concentrações elevadas de sacarose e trealose para aumentar consideravelmente a resposta, o que poderia não ocorrer devido ao estresse do microrganismo, como foi observado na farinha de banana verde. Além disso, poderia elevar demasiadamente os custos do produto inviabilizando sua comercialização.

No presente estudo a concentração de 0,4M de trealose permitiu maiores viabilidades celulares de LC-1, discordando de Gómez Zavaglia *et al.* (2003)

e Tymczyszyn, Gómez-Zavaglia e Disalvo. (2007), que relataram a maior sobrevivência de *L. bulgaricus* para 0,25M de trealose com e sem a adição de estressores ao meio de cultivo. Entretanto, nos estudos supracitados, a biomassa era seca diretamente com o protetor e no presente trabalho o farelo de aveia e a farinha de banana verde estavam em contato com o LC-1, ocasionando uma menor interação entre o protetor e o microrganismo.

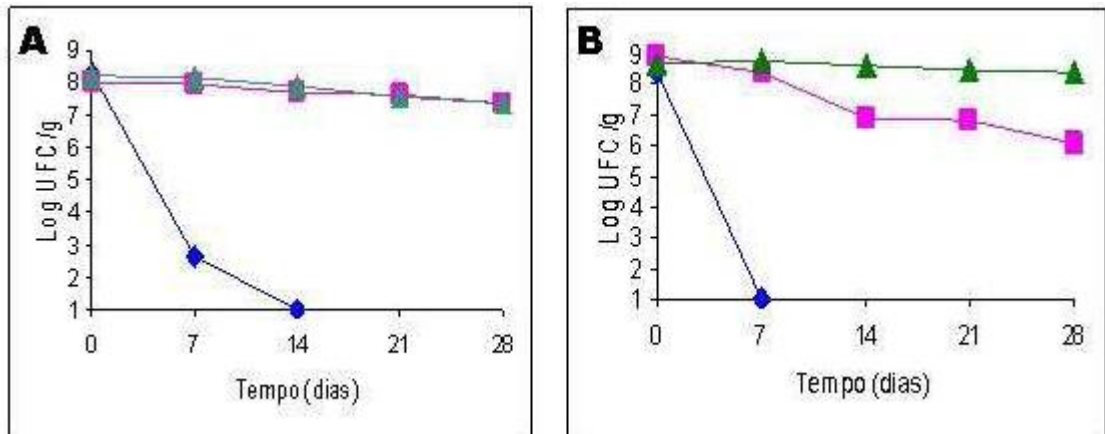
Após análise dos resultados, os testes de armazenamento foram conduzidos sem adição de açúcares (controle) e com as concentrações de 20g/L de sacarose e 0,4M de trealose, parâmetros determinados para a farinha de banana verde e farelo de aveia na análise estatística.

## **5.5 ARMAZENAMENTO**

### **5.5.1 Farelo de aveia**

A estabilidade do LC-1 aderido ao farelo de aveia durante os 28 dias de estocagem para as diferentes temperaturas estudadas, com e sem os açúcares, está apresentada na figura 15.

No farelo de aveia sem adição de sacarose e trealose (figura 17a), a viabilidade do LC-1 durante o armazenamento diminuiu 0,7 e 0,6 ciclos log, atingindo ao final do período 7,3 e 7,4 ciclos log nas temperaturas de 10°C e 25°C respectivamente, enquanto que a 40°C, após 14 dias a população de lactobacilos caiu 8 ciclos log. Com a adição dos açúcares, a maior estabilidade foi observada a 10°C e a menor a 40°C (figura 17b).



**Figura 17** – Comportamento de *Lactobacillus casei* aderidos ao farelo de aveia armazenados por 28 dias, sob temperatura de (▲) 10°C, (■) 25°C e (◆) 40°C: (A) sem tratamento e (B) tratado com 20g/L de sacarose e 0, 4M de trehalose.

Conrad *et al.* (2000) demonstraram que a presença da trealose durante a secagem de *Lactobacillus acidophilus*, aumentou a sobrevivência do microrganismo durante o armazenamento à 37°C por 70 dias. Outros estudos como de Crowe, Reid e Crowe (1996), Carvalho *et al.* (2004), Meng *et al.* (2007) e Santivarangkna *et al.* (2008/b) apontam o uso de açúcares protetores como promissores para o armazenamento de células desidratadas de bactérias lácticas. Porém, após a adição dos protetores no farelo de aveia, a viabilidade do probiótico na temperatura de 25°C, apresentou uma queda de 2,7 ciclos log ao final dos 28 dias de estocagem (17b). Este resultado pode ter sido ocasionado pelo sinergismo entre o baixo pH obtido após a adição dos açúcares durante todo o período de armazenamento (Tabela 5), os danos sofridos pelo microrganismo durante o processo de secagem e a temperatura de estocagem. Por se tratar de um produto seco, era desejável que nesta temperatura sua estabilidade se mantivesse, o que representaria redução dos custos de armazenamento, facilitaria o manuseio e transporte do produto até seu consumo.

O estudo na temperatura de 40°C foi considerado importante, pelo fato de os probióticos não refrigerados poderem sofrer alterações como grandes variações de temperatura durante o transporte e armazenamento, o que comprometeria sua viabilidade (SAARELA *et al.*, 2006/b). Entretanto, segundo Meng *et al.* (2007), a sobrevivência de uma bactéria probiótica durante a estocagem na forma desidratada, é menor quanto maior a temperatura de armazenamento,

justificando o resultado observado nesta temperatura.

A fim de compreender o baixo valor de pH obtido nas fibras que continham o protetor celular e verificar se este resultado era decorrente do açúcar, foi realizada uma análise de pH de uma solução de trealose. A média encontrada de três repetições foi de  $6,5 \pm 0,1$  indicando assim outras possíveis causas para o menor valor de pH do produto com protetor. No estudo de Sawitzki *et al.* (2007) diversas linhagens de *Lactobacillus plantarum* isoladas de salsichas fermentadas metabolizaram a trealose. Conforme Zayed e Roos (2004) o *L. salivarius* subsp. *salivarius* é capaz de produzir ácido a partir da trealose, diminuindo o pH ao final de 84 horas de fermentação. No presente estudo, embora não determinado, o *L. casei* pode ter fermentado a trealose durante as horas de secagem em baixa temperatura e, assim diminuído o pH final.

Durante os 28 dias de armazenamento a variação nos percentuais de umidade foi pequena e, não foram observadas mudanças que poderiam ser decorrentes da adição do protetor e do estressor (Tabela 5).

Não foram realizadas análises de pH e umidade para as amostras armazenadas a 40°C após 14 e 21 dias com e sem açúcares, por não haver sobrevivência de microrganismos.

**Tabela 5** – Média de duas repetições de análises realizadas em duplicatas dos resultados obtidos para a umidade e pH, com e sem adição de sacarose e trealose, durante o armazenamento de *Lactobacillus casei* aderido ao farelo de aveia, por 28 dias nas temperaturas de 10°C, 25°C e 40°C.

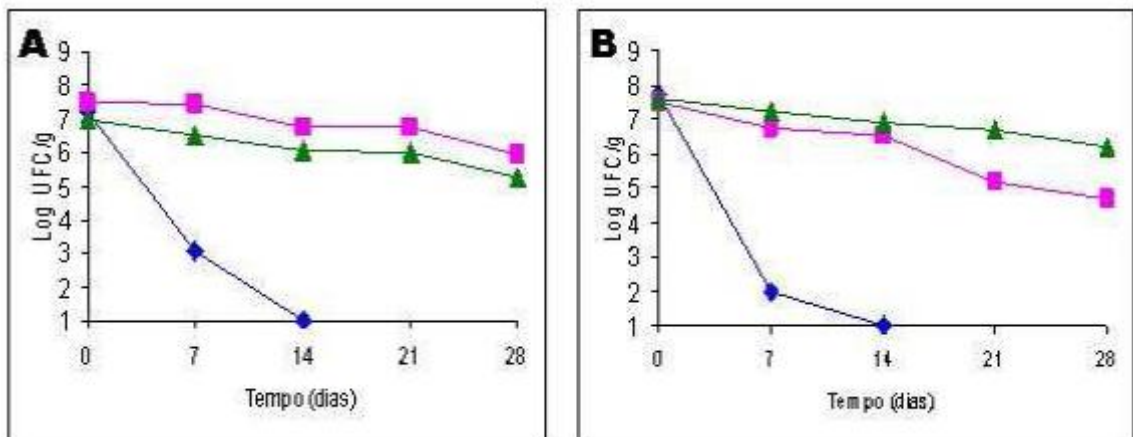
Tempo em dias	% Umidade sem protetor e estressor			% umidade com protetor e estressor			pH sem protetor e estressor			pH com protetor e estressor		
	10°C	25°C	40°C	10°C	25°C	40°C	10°C	25°C	40°C	10°C	25°C	40°C
0	4,8 ±0,5	5,4 ±0,5	5,6 ±0,6	5,6 ±0,8	5,9 ±0,7	5,2 ±0,5	5,80 ±0,1	5,82 ±0,08	5,92 ±0,5	4,57 ±0,05	4,21 ±0,1	4,11 ±0,1
7	4,8 ±0,5	5,5 ±0,5	6,3 ±0,5	5,2 ±0,8	5,7 ±0,7	4,8 ±0,5	5,92 ±0,04	5,93 ±0,05	5,96 ±0,5	4,21 ±0,06	4,27 ±0,1	4,05 ±0,05
14	4,6 ±0,4	5,0 ±0,5	5,0 ±0,6	5,7 ±0,6	6,3 ±0,5	nd	5,98 ±0,02	5,92 ±0,05	5,97 ±0,3	4,37 ±0,05	4,51 ±0,3	nd
21	4,3 ±0,3	4,5 ±0,5	nd	5,3 ±0,5	5,8 ±0,5	nd	5,63 ±0,2	5,56 ±0,3	nd	4,21 ±0,05	4,24 ±0,1	nd
28	4,9 ±0,5	4,7 ±0,5	nd	5,5 ±0,5	6,5 ±0,5	nd	5,98 ±0,01	5,90 ±0,06	nd	4,28 ±0,1	4,42 ±0,2	nd

nd: não determinado

### 5.5.2 Farinha de banana verde

A Figura 18 mostra a estabilidade do LC-1 aderido à farinha de banana verde por 28 dias nas temperaturas de 10, 25 e 40°C. Foi possível observar que em todos os tratamentos, a viabilidade do probiótico nesta fibra foi menor em relação ao farelo de aveia. Segundo Saarela *et al.* (2006/b), a quantidade de lipídios, de alto valor nutricional, presente no farelo de aveia (~7%) também apresenta função de proteção celular durante o armazenamento, o que pode justificar os valores obtidos na farinha de banana verde cujo teor em lipídeos é menor.

Ao final dos 28 dias de estocagem, a viabilidade do LC-1 aderidos à farinha de banana verde sem o protetor e o estressor, a 10°C e 25°C, teve diminuição de 1,5 ciclos log e 2 ciclos log, respectivamente. Com a presença da trealose, a 10°C, obteve-se a mesma queda de 1,5 ciclos log na viabilidade do microrganismo e, à 25°C foi observado uma diminuição de 3 ciclos log ao final do armazenamento. Na temperatura de 40°C não foi possível recuperar células viáveis de LC1 a partir do 14º dia de armazenamento.



**Figura 18** – Comportamento de *Lactobacillus casei* aderidos a farinha de banana verde armazenados sob temperatura de (▲) 10°C, (■) 25°C e (◆) 40°C: (A) sem tratamento e (B) tratado com 20g/L de sacarose e 0,4M de trehalose.

Na tabela 6 estão os valores de umidade e pH obtidos durante o armazenamento por 28 dias da farinha de banana verde com o probiótico aderido, nas temperaturas de 10, 25 e 40°C com e sem trealose. Assim como no farelo de

aveia, houve uma perceptível variação nos valores de pH após adição dos açúcares.

Durante os 28 dias de armazenamento, o percentual de umidade do produto desidratado com e sem tratamento, aumentou, o que pode explicar em parte a menor viabilidade encontrada para a farinha de banana verde. Em adição, Zayed e Roos (2004) relataram que a quantidade de água remanescente em produtos secos, afeta a viabilidade da bactéria durante o armazenamento.

A Tabela 7 mostra os valores encontrados para a atividade de água (aw) durante o período de armazenamento para as duas fibras com e sem sacarose e trealose. É possível observar que os valores de aw variam conforme a fibra estudada e com a presença ou ausência do protetor celular. Durante os 28 dias de armazenamento estes valores acompanharam a variação dos valores de umidade.

**Tabela 6** – Média de duas repetições de análises realizadas em duplicatas dos resultados obtidos para a umidade e pH, com e sem adição de sacarose e trealose, durante o armazenamento de *Lactobacillus casei* aderido à farinha de banana verde, por 28 dias nas temperaturas de 10°C, 25°C e 40°C.

Tempo em dias	% Umidade sem protetor e estressor			% umidade com protetor e estressor			pH sem protetor e estressor			pH com protetor e estressor		
	10°C	25°C	40°C	10°C	25°C	40°C	10°C	25°C	40°C	10°C	25°C	40°C
0	6,2 ±1,0	5,4 ±0,5	5,2 ±0,8	4,9 ±0,5	5,4 ±0,5	5,7 ±0,3	5,33 ±0,02	5,52 ±0,1	5,63 ±0,05	4,47 ±0,03	4,43 ±0,02	4,38 ±0,3
7	6,6 ±1	5,6 ±0,6	5,4 ±0,8	5,8 ±0,5	5,6 ±0,5	6,0 ±0,3	5,38 ±0,05	5,52 ±0,1	5,62 ±0,05	4,38 ±0,03	4,42 ±0,02	4,33 ±0,03
14	7,4 ±0,8	6,4 ±0,5	5,8 ±0,8	6,7 ±0,5	6,4 ±0,5	6,6 ±0,5	5,33 ±0,03	5,59 ±0,1	5,7 ±0,07	4,52 ±0,06	4,54 ±0,05	4,40 ±0,05
21	7,5 ±0,8	6,8 ±0,5	nd	7,4 ±0,4	7,1 ±0,6	nd	5,46 ±0,05	5,62 ±0,1	nd	4,46 ±0,05	4,46 ±0,05	nd
28	7,7 ±1,0	7,2 ±0,5	nd	7,4 ±0,5	8,2 ±0,5	nd	5,36 ±0,2	5,68 ±0,06	nd	4,52 ±0,05	4,51 ±0,03	nd

**Tabela 7** – Resultados obtidos para a atividade de água, com e sem adição de sacarose e trealose, durante o armazenamento de *Lactobacillus casei* aderido à farinha de banana verde e ao farelo de aveia, por 28 dias nas temperaturas de 10°C e 25°C.

Tempo em dias	Farelo de aveia						Farinha de banana verde					
	Atividade de água sem protetor			Atividade de água com protetor			Atividade de água sem protetor			Atividade de água com protetor		
	10°C	25°C	40°C	10°C	25°C	40°C	10°C	25°C	40°C	10°C	25°C	40°C
0	0,365	0,260	0,254	0,342	0,322	0,355	0,352	0,259	0,245	0,432	0,421	0,429
7	0,210	0,201	0,295	0,417	0,394	0,330	0,358	0,239	0,235	0,427	0,455	0,468
14	0,206	0,278	0,320	0,370	0,402	nd	0,330	0,298	0,269	0,446	0,465	0,484
21	0,247	0,298	nd	0,310	0,372	nd	0,362	0,294	nd	0,430	0,444	nd
28	0,234	0,312	nd	0,420	0,412	nd	0,374	0,350	nd	0,465	0,494	nd

A partir destes resultados, foi constatado que o LC-1 apresentou maior sobrevivência ao armazenamento quando aderido ao farelo de aveia do que quando aderido à farinha de banana verde. Portanto, para os testes de resistência à simulação de passagem no trato gastrointestinal foi utilizado apenas o farelo de aveia com e sem trealose e sacarose.

## **5.6 SOBREVIVÊNCIA DO LC-1 ADERIDO À FIBRA APÓS INCUBAÇÃO EM CONDIÇÕES GASTRINTESTINAIS SIMULADAS**

Para determinar o efeito do pH ácido do estômago na sobrevivência do probiótico aderido ao farelo de aveia, um sistema *in vitro* foi utilizado e os resultados estão apresentados na Tabela 8. Foi observado que quando as células se encontravam livres, ou seja, sem aderência à fibra, após 120 minutos em pH 1,55 foram obtidas 102 UFC de células viáveis por mL de cultivo. Neste mesmo contexto, após simulação ao suco intestinal (pH 7,4 e 150 minutos), o *L. casei* manteve sua viabilidade (107UFC/g). Também, nas células aderidas às fibras foi constatada uma alta sobrevivência celular ao final dos 120 minutos em pH ácido. Estes resultados estão de acordo com Michida *et al.* (2006), que demonstraram uma maior estabilidade ao suco gástrico quando as células se encontravam imobilizadas em fibras de malte e cevada do que quando cultivadas apenas em meio MRS. Puupponen-Pimia *et al.* (2002) relataram que o *L. rhamnosus* encapsulado em grânulos de amido, tem suas propriedades físicas preservadas durante longos períodos de armazenamento e durante passagem ao trato gastrointestinal.

Nas células aderidas ao farelo de aveia com e sem protetor, a sobrevivência do LC-1 após 120 minutos em pH ácido foi 1 ciclo log maior na fibra sem trealose do que na adicionada do açúcar. No ensaio utilizando sais biliares também foi observado uma menor sobrevivência celular na fibra com o protetor. Charalampopoulos *et al.* (2002) sugerem que a sobrevivência dos probióticos durante o trânsito gastrointestinal é influenciada pelas propriedades físico-químicas dos alimentos utilizados como carreadores celulares, sendo a capacidade de tamponamento e o pH do meio os fatores significantes.

Portanto, assim como no teste de armazenamento, a presença do

protetor celular não garantiu uma maior sobrevivência do microrganismo, ou seja, a fibra na sua forma natural forneceu os subsídios necessários para a proteção do LC-1, concluindo dessa forma que a fibra que apresenta melhor condição para o desenvolvimento do produto desidratado com fibras e probiótico, foi o farelo de aveia sem adição de protetor celular.

**Tabela 8** – Sobrevivência média obtida para o *L. casei*, na forma livre e aderida ao farelo de aveia, após diferentes tempos em simulação do trato gastrointestinal.

	Sobrevivência controle (UFC/g)*	Sobrevivência aderido ao farelo de aveia sem trealose (UFC/g)*	Sobrevivência aderido ao farelo de aveia com trealose (UFC/g)*
Inicial	$7,2 \times 10^8$	$6,2 \times 10^7$	$5,2 \times 10^8$
30' em pH 1,55	$1,1 \times 10^6$	$2,0 \times 10^7$	$4,0 \times 10^7$
60' em pH 1,55	$5 \times 10^4$	$1,2 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$
90' em pH 1,55	$< 10^3$	$1,2 \times 10^7$	$7,5 \times 10^6$
120' em pH 1,55	$2,3 \times 10^2$	$1,1 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$
150' em pH 7,4	$1,3 \times 10^8$	$2,2 \times 10^7$	$1,9 \times 10^6$

\* Resultados de contagem em Agar MRS de duplicatas e com 2 repetições

## 5.7 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Análises microbiológicas foram conduzidas antes da sensorial para garantia da segurança aos provadores, pesquisando microrganismos patogênicos e indicadores de qualidade higiênica insatisfatória.

A Tabela 9 mostra os resultados obtidos para os microrganismos analisados e o limite máximo estabelecido pela Resolução RDC nº12, de 12 de janeiro de 2001 da ANVISA.

O produto formulado apresentou condições sanitárias satisfatórias, de acordo com os padrões legais vigentes.

**Tabela 9** – Resultado obtido na análise de microrganismos patogênicos e respectivos padrões microbiológicos exigidos pela legislação vigente para ‘farelo e fibras de cereais, com ou sem mistura de farinhas’ encontrado no item 10 do anexo I da Resolução RDC nº 12 da Anvisa.

<b>Microrganismo</b>	<b>Resultado Fibra com <i>L.casei</i> aderido</b>	<b>Padrão segundo RDC nº12</b>
<i>Bacillus cereus/g</i>	< 1,0 x 10	5,0 x 10 <sup>3</sup>
Estafilococos coagulase positivo	< 1,0 x 10 UFC/g	-
Coliformes totais	50	240 NMP
Coliformes à 45°C/g	-	11 NMP
Bolores e leveduras	-	5,0 x 10 <sup>3</sup>
Salmonella sp	ausente	ausente

## 5.8 ANÁLISE SENSORIAL

Segundo Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2007), para que um produto contendo microrganismos probióticos possa utilizar a alegação de que “contribui para o equilíbrio da flora intestinal”, deve conter, na porção diária do produto pronto para o consumo, um mínimo de 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> UFC do probiótico. No caso dos produtos contendo fibras alimentares, para ser considerado fonte de fibras e possa utilizar a alegação de que “auxiliam no funcionamento do intestino” deve fornecer na porção diária um mínimo de 3 gramas de fibra quando for adicionada em alimentos sólidos e 1,5 gramas quando adicionada em alimentos líquidos.

O teor de fibras do farelo de aveia utilizado no estudo era de 15 gramas de fibras em 100 gramas de farelo e, 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> UFC de probiótico por grama de farelo de aveia. Assim sendo, a ingestão diária mínima de 12 gramas do produto desenvolvido, atende as exigências recomendadas pela legislação para o consumo de fibras e probiótico e desta forma foram conduzidos os testes sensoriais.

Para verificar se os procedimentos e etapas aplicadas ao farelo de aveia para a obtenção do produto probiótico seriam percebidos pelos consumidores, um teste triangular e outro de aceitação foram aplicados.

No teste triangular realizado com 20 julgadores, 15 identificaram a amostra diferente. Considerando a tabela nº 30 de Dutcosky (2007), as amostras de vitamina com farelo de aveia (controle) e vitamina com farelo de aveia e probiótico apresentam diferença significativa a nível de 0,01%, onde um mínimo de 14 respostas corretas seria necessário.

Neste teste, os provadores deveriam apenas analisar o produto de maneira geral, entretanto foi observado nas amostras que continham apenas o farelo sem o probiótico, o comentário de que o sabor e odor de aveia estavam mais acentuados.

Como não se conhecia a aceitação da vitamina comercial utilizada no estudo como veículo e, no teste triangular as amostras de vitamina adicionada de farelo de aveia com e sem probiótico apresentaram diferença sensorial, foi realizado um teste hedônico com 51 provadores não treinados, para avaliar a aceitação de cada uma das amostras.

Após análise variância (ANOVA) foi observado que as amostras apresentaram diferença significativa a nível de 5% na avaliação da aceitação global dos produtos. Aplicado o teste de Tukey, foi possível verificar que a amostra de vitamina foi a mais aceita pelos provadores enquanto que as amostras de vitamina com farelo de aveia e vitamina com farelo de aveia e probiótico foram igualmente aceitas (Tabela 10).

**Tabela 10** – Médias de aceitação do teste de escala hedônica para as amostras vitamina, vitamina adicionada de farelo de aveia e vitamina adicionado de farelo de aveia com probiótico

<b>Amostra</b>	<b>Médias de aceitação *</b>
Vitamina	7,7843 <sup>a</sup>
Vitamina + farelo de aveia	6,9412 <sup>b</sup>
Vitamina + farelo de aveia com probiótico	6,8235 <sup>b</sup>

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

No teste de aceitação, foi utilizado escala hedônica estruturada com nove pontos e, como a média da aceitação de todas as amostras estava acima do

valor médio estipulado (não gostei nem desgostei = 5), considera-se todos os produtos bem aceitos pelos consumidores, sendo os índices de aceitação de 86,5% para a vitamina, 77% para a vitamina adicionada de farelo de aveia e 76% para a vitamina adicionada de farelo de aveia com probiótico.

## 6 CONCLUSÕES

Entre as fibras estudadas a farinha de banana verde e o farelo de aveia foram as fibras que permitiram maior viabilidade do *L. casei* após secagem a vácuo a 45°C.

As células não apresentaram diferenças morfológicas após a secagem a vácuo quando aderidas ao farelo de aveia e à farinha de banana verde. Foi observada a produção de exopolissacarídeos aderindo as bactérias às fibras e as bactérias entre si.

Os açúcares sacarose e trealose, utilizados como estressor e protetor, respectivamente, demonstraram efeito de aumento da viabilidade do probiótico aderido às fibras após o processo de desidratação.

Durante o armazenamento, o farelo de aveia sem adição de protetores celulares mostrou ser o mais promissor para o desenvolvimento do simbiótico em estudo, por manter o microrganismo viável segundo os parâmetros exigidos pela Legislação Brasileira, por 28 dias em temperatura ambiente.

O *L. casei* quando aderido ao farelo de aveia apresenta maior viabilidade durante simulação ao suco gástrico e intestinal.

O simbiótico desenvolvido apresentou diferenças sensoriais em relação ao farelo de aveia adicionado à vitamina. Entretanto permaneceu bem aceito pelos consumidores potenciais, com um índice de aceitabilidade de 76%.

Conclui-se que o desenvolvimento de um produto simbiótico vegetal utilizando farelo de aveia é uma possibilidade de inovação para a indústria de alimentos funcionais.

## REFERÊNCIAS

ADOLFO LUTZ, Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 3 ed., v. 1, São Paulo: O Instituto, 1985.

ARAGON-ALEGRO L. C.; ALEGRO, J. H. A.; CARDARELLI, H. R.; CHIU, M. C.; SAAD, S. M. I. Potentially probiotic and symbiotic chocolate mousse. **Food Science and Technology**, v.40, p. 669-675, 2007.

AYALA-HERNANDEZ, I.; HASSAN, A.N.; GOFF, H.D.; CORREDIG, M. Effect of protein supplementation on the rheological characteristics of milk permeates fermented with exopolisaccharide-producing *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 5, p. 1299-1304, 2009.

BARRET, D. M.; SOMOGYI, L. P.; RAMASWAMY, H. S. **Processing Fruits: Science and Technology**. CRC Press, 2005, 841 p.

BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J. P.; HENRI-DUBERNET, S.; GUÉGUEN, M. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. **International Journal of food microbiology**, v. 126, n. 3, p. 278-285, 2007.

BETORET, N.; PUENTE, L.; DIAZ, M. J.; PAGAN, M. J.; GARCIA, M. J.; GRAS, M.L.; MARTINEZ-MONZÓ, J.; FITO, P. Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. **Journal of Food Engineering**, v. 56, n. 2-3, p. 273-277, 2003.

BOTTAZZI, V. An introduction to rod-shaped lactic-acid bacteria. **Biochimie**, v.70, n. 3, p.303-315, 1988.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/> . Acesso em 31/03/2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 360 de 23 de Janeiro de 2003. Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em 31/03/2009

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 aprovados. Agosto, 2007. <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 16/04/2009.

BROMMAGE, R.; BINACUA, C.; ANTILLE, S.; CARRIE, AL. Intestinal calcium absorption in rats is stimulated by dietary lactulose and other resistant sugars. **Journal of Nutritional**, v. 123, p. 2186-2194, 1993.

CAPELA, P.; HAY, T.K.C.; SHAH, N.P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. **Food Research International**, v. 39, n. 39, p. 203-211, 2006.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, p. 281-370, 2002.

CARVALHO, A. S.; SILVA, J.; HO, P.; TEIXEIRA, P.; MALCATA, F. X.; GIBBS, P. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 10, p. 835-847, 2004.

CHARALAMPOPOULOS, D.; WANG, R.; PANDIELLA, S. S.; WEBB, C. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, n. 1-2, p. 131-141, 2002.

CONRAD, P. B.; MILLER, D. P.; CIELENSKI, P. R.; PABLO de, J. J. Stabilization and Preservation of *Lactobacillus acidophilus* in Saccharide matrices. **Cryobiology**, v. 41, n. 1, p. 17-24, 2000.

CORCORAN, B. M.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1024-1039, 2004.

CORDENUNSI, B. R.; SHIGA, T. M.; LAJOLO, F. Non-starch polysaccharide composition of two cultivars of banana (*Musa acuminata* L.: cvs Mysore and Nanicão). **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 26-31, 2008.

CROWE, L. M.; REID, D. S.; CROWE, J. H. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? **Biophysical Journal**, v. 71, p. 2087-2093, oct. 1996.

DENÉS, J.M.; BARON, A.; RENARD, C. M. G. C.; PÉAN, C.; DRILLEAU, J. F. Different action patterns for apple pectin methylesterase at pH 7,0 e 4,5. **Carbohydrate Research**, v. 327, p. 385-393, 2000.

DUTCOSKY, S. D. **Análise Sensorial de Alimentos**. Editora Champagnat, 2ª edição, Curitiba, 2007, 239 p.

ELMER, W. G.; MCFARLAND, V. L.; MCFARLAND, M. **The power of probiotics. Improving your health with beneficial microbes**. The Harworth Press, Inc., 2007. 236 p.

FAO/WHO. **Guidelines for Evaluation of Probiotics in Food**. London, Ontario, Canada, 30 abr. e 01 maio, 2002.

FERREIRA, V.; SOARES, V.; SANTOS, C.; SILVA, J.; GIBBS, P. A.; TEIXEIRA, P. Survival of *Lactobacillus sakei* during heating, drying and storage in the dried state when growth has occurred in the presence of sucrose or monosodium glutamate. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 249-252, 2005.

FERTONANI, H. C. R.; SCABIO, A.; SCHEMIN, M. H. C.; CARNEIRO, E. B. B.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Influência da concentração de ácidos no processo de extração e na qualidade de pectina de bagaço de maçã. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, p.599-612, out/dez, 2006.

FIGUEROLA, F.; HURTADO, M. L.; ESTÉVEZ, A. M.; CHIFFELLE, I.; ASENJO, F. Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. **Food Chemistry**, v.91, p. 395-401, 2005.

FREITAS, M. C. J.; TAVARES, D. de Q. Caracterização do grânulo de amido de bananas (*Musa* AAA-NANICÃO E *Musa* AAB-TERRA). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 217-222, abr-jun, 2005.

FULLER, R. **Probiotics. The scientific basis**. 1ª Ed., Londres, 1992.

GARDINER, G. E.; SULLIVAN, O.; KELLY, J.; AUTRY, M. A. E. ; FITZGERALD, G. F.; COLLINS, J. K.; ROSSI, R. P.; STANTONI, C. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n.6, p. 2605-2612, 2000.

GIBSON, G. R., Prebiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.18, n. 2, p. 287-298, 2004/a.

GIBSON, G. R.; Fibre and effects on probiotics (The prebiotic concept). **Clinical Nutritional Supplements**, v.1, p. 25-31, 2004/b.

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

GÓMES-ZAVAGLIA, A.; TYMCZYSZYN, E.; DE ANTONI, G.; DISALVO, E. A. Action of trehalose on the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* by heat and osmotic dehydration. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 1315-1320, 2003.

HAULY M.C. de O.; MOSCATTO J. A. Inulina e oligofrutoses: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeito prebiótico e importância na indústria de alimentos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 105-118, dez, 2002.

HOND, E. D.; GEYPENS, B.; GHOOS, Y. Effect of high performance chicory inulin on constipation. **Nutrition Research**, v. 20, n. 5, p. 731-736, 2000.

ITSARANUWAT, P.; AL-HADDAD, K. S. H.; ROBINSON, R. K. The potencial therapeutic benefits of consuming 'health-promoting' fermented dairy products: a brief update. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, n. 4, p. 203-210, 2003.

JUARÉZ-GARCIA, E.; AGAMA-ACEVEDO, E.; SAYAGO-AYERDI, S. G.; RODRIGUEZ-AMBRIZ, S. L.; BELLO-PÉREZ, L. A. Composition, digestibility and application in breamaking of banana flour. **Plant Foods for Humam Nutritional**, v. 61, p. 131-137, 2006.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 8, p. 737-743, 2004.

KROKIDA, M. K.; ZOGZAS, N. P.; MAROULIS, Z. B. Modeling shrinkage and porosity during vacuum dehydration. **International Journal of food science and technology**, v. 32, p. 445-458, 1997.

LEISNER, J.J.; VANCANNEYT, M.; GORIS, J.; CHRISTENSEN, H.; RUSUL, G. Description of *Paralactobacillus selangorensis* gen. nov., sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from chili bo, a Malaysian food ingredient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 19-24, 2000.

LEITE, J. B.; MANCINI, M. C.; BORGES, S. V. Effect of drying temperature on the quality of dried bananas cv. prata and d'água. **Food Science and Technology**, v. 40, p. 319-323, 2007.

LIEVENSE, L. C.; VERBEEK, M. A. M.; NOOMEN, A.; RIET, K. V. Mechanism of dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 90-94, 1994.

LIMA, de A. G. B.; NEBRA, S. A.; QUEIROZ, de M. R. Aspectos científicos e tecnológicos da banana. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 2, n.1, p. 87-101, 2000.

LINDERS, L. J. M.; JONG, de G. I. W.; MEERDINK, G.; RIET, K. V. Carbohydrates and the dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*: The role of moisture distribution and water activity. **Journal of food engineering**, v. 31, p. 237-250, 1997.

MAGNONI, D.; CUKIER, C.; COSTA, R. P. Fibras nas doenças metabólicas: Diabete Melito e Dislipidemias. **Instituto de Metabolismo e Nutrição – IMEN**, 2005 – Disponível em 27/09/2007 - <http://www.nutricaoclinica.com.br>

MENG, X. C.; STANTON, G. F.; FITZGERALD, C. D.; ROSS, R. P. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1406-1416, 2007.

MALKKI, Y.; VIRTANEN, E. Gastrointestinal Effects of Oat Bran and Oat Gum: A review. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 6, p. 337-347, 2001.

MEYERS, D. Probiotics. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 16, n. 3, p. 195-197, 2007.

MICHIDA, H.; TAMALAMPUDI, S.; PANDIELLA, S. S.; WEBB, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, p. 73-78, 2006.

MONTAN, M. As fibras invisíveis. **Brasil Alimentos**, n. 19, mar/abr, 2003.

NEVES, L. S. **Fermentado probiótico de suco de maçã**. Curitiba, 2005. 94 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

NINESS, K. R. Inulin and oligofrutose: what are they? **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 7, p. 1402 – 1406, 1999.

NETO, J. M. M. de,; CIRNE, L. E. M. da R.; PEDROZA, J. P.; SILVA, M. G. da. Componentes químicos da farinha de banana (*Musa* sp) obtida por meio de secagem natural. **Revista brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 2, n. 3, p. 316-318, 1998.

OHTA, A.; OHTSUKI, M.; BABA, S.; ADACHI, T.; SAKATA, T.; SAKAGUCHI, E. Calcium and magnesium absorption from the colon and rectum are increased in rats fed fructooligosaccharides. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 2417-2424, 1995.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e aplicações**. Vol 1, 2ª edição, Makron Books, 524p. 1997.

PIMENTEL, M.B. V. C. de; FRANCKI, M. V.; GOLLÜCKE, B. P. A. **Alimentos funcionais. Introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo, 2005.

PUUPPONEN-PIMIA, R.; AURA, A. M.; OKSMAN-CALDENTY, K. M.; MYLLARINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, 3-11, 2002.

RABBANI, G. H.; TEKA, T.; ZAMAN, B.; MAJID, N.; KHATUN, M.; FUCHS, G. J. Clinical studies in persistent diarrhea: Dietary management with green banana or pectin in Bangladesh children. **Gastroenterology**, v. 121, p. 554-560, 2001.

RASTALL, R. A.; MAITIN, V. Prebiotics and symbiotics: towards the next generation. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, p. 490-496, 2002.

RAUPP, D. S. da; CARRIJOZ, K. C. R.; COSTA, L. L. F.; MENDES, S. D. C.; BANZATTO, D. A. Propriedades funcionais-digestivas e nutricionais de polpa-refinada de maçã. **Scientia Agrícola**, v. 57, n. 3, p. 395-402, jul/set, 2000.

ROBERFROID, M. Dietary fiber, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 2, p. 103-148, 1993.

RODRÍGUEZ-AMBRIZ, S. L.; ISLAS-HERNÁNDEZ, J. J.; AGAMA-ACEVO, E.; TOVAR, J.; BELLO-PERÉZ, L. A. Characterization of a fibre-rich powder prepared by liquefaction of unripe banana flour. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1515-1521, 2008.

RUAS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J.; ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2-3, p. 163-171, 2002.

RUPASINGHE, H. P. V.; WANG, L.; HUBER, G. M.; PITTS, N. L. Effect of baking on dietary fibre and phenolics of muffins incorporated with apple skin powder. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1217-1224, 2008.

SÁ, de R. M.; FRANCISCO, de A.; OGLIARI, P. J.; BERTOLDI, F. C. Variação no conteúdo de  $\beta$ -glucanas em cultivares brasileiros de aveia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 1, 2000.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MATTO, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197-215, 2000.

SAARELA, M.; VIRKAJARVI, I.; ALAKOMI, H. L.; SIGVART-MATILLA, P.; MATTO, J. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 12, p. 1477-1482, 2006/a.

SAARELA, M.; VIRKAJARVI, I.; NOHYNEK, L.; VAARI, A.; MATTO, J. Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. **International Journal of Food Microbiology**, v.112, n. 2, p. 171-178, 2006/b.

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

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying process. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1-13, 2008/a.

SANTIVARANGKA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. **Food microbiology**, v. 25, p. 429-441, 2008/b.

SAWITZKI, M. C.; FIORENTINI, A. M.; BROD, F. C. A.; TAGLIARI, C.; BERTOL, T. M.; ARISI, A. C. M.; SANT'ANA, E. S. Phenotypic characterization and species-specific PCR of promising starter culture strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from naturally fermented sausages. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 28, p. 547-552, 2007.

SCHIAVÃO-SOUZA, T. D.; YUHARA, T. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J.; GARCIA, S. Produção de exopolissacarídeos por bactérias probióticas: otimização do meio de cultura. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n.1, p. 27-34, jan/mar. 2007.

SENDRA, E.; FAYOS, P.; LARIO, Y.; FERNANDEZ-LOPEZ, J.; SAYAS-BARBERA, E.; PEREZ-ALVAREZ, A. Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. **Food Microbiology**, v. 25, p. 13-21, 2008.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 11, p. 1262-1277, 2007.

SHINNICK, F. L.; LONGACRE, M. J.; INK, S. L.; MARLETT, J. Oat Fiber: Composition versus physiological function in rats. **Journal of Nutrition**, v. 118, p. 144-151, 1988.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. 2º ed. Livraria Varela. São Paulo, 2001. 317 p.

SLAVIN, J. Position of the American Dietetic Association: Health implications of dietary fiber. **Journal of the American Dietetic Association**, v.108, p. 1716-1731, 2008.

SUGAWARA, T.; TAKAHASHI, S.; OSUMI, M.; OHNO, N. Refinement of the structures of cell-wall glucans of *Schizosaccharomyces pombe* by chemical modification and NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 2255-2265, 2004.

TSEN, J.; LIN, Y.; KING, A.V. Fermentation of banana media by using n-carrageenan immobilized *Lactobacillus acidophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 2, p. 215-220, 2004.

TEIXEIRA, P.; CASTRO, H.; MOHÁCSI-FARKAS, C.; KIRBY, R. Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 219-226, 1997.

TYMCZYSZYN, E. E.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A.; DISALVO, E. A. Effects of sugars and growth media on the dehydration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, p. 845-851, 2007.

TYPONEN, S.; PETAJA, E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 3, p. 233-244, 2003.

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

VANLOO, J.; COUSSEMENT, P.; DELEENHEER, L.; HOEBREGS, H.; SMITS, G. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 35, p. 525-552, 1995.

WANG, Q.; PAGÁN, J.; SHI, J. **Pectin from fruits**. Cap. 9, CRC Press LLC, 2002.

WEBER, F. H.; GUTKOSKI, L. C.; ELIAS, M. C. Caracterização química de cariopses de aveia (*Avena sativa* L.) da cultivar UPF 18. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 22, v. 1, p. 39-44, 2002.

WOOD, P. J. **Oat Bran**. St Paul, Minnessota, EUA: American Association of Cereal Chemists, Inc, 1993.

WOOD, P. J.; BEER, M. U. **Functional Foods**. Cap. 1,1998, 460 p.

ZAIDAN, H. A.; OLIVEIRA, de E. T.; GALLO, L. A.; CROCOMO, O. J. Comportamento fisiológico *in vitro* de bananeira (*Musa* sp., AAA e AAB) cvs. Nanica e Prata Anã: Influência de diferentes níveis de potássio. **Scientia Agrícola**, v. 56, n. 2, 1999.

ZAYED, G.; ROOS, Y. H. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subject to freeze-drying and storage. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1081-1086, 2004.

## **ANEXOS**

**ANEXO A – Tabela nutricional Farinha de Banana Verde (Rositos)**

<b>Quantidade por porção de 100g</b>	
Carboidratos	73,33g
Lípidios	0g
Proteína	2,22g
Fibra alimentar total	9g
Sódio	90mg
Potássio	556mg
Magnésio	35,6mg

**ANEXO B – Composição Farelo de aveia – Oat Bran (SL Alimentos)**

Lípidios	Máx. 9% (média 7,0 – 8,5%)
Proteína	Mín. 18% (média 21 - 23%)
Cinzas	3%
Fibra alimentar total	Mín. 16%
Fibra alimentar solúvel	Mín. 6%

## ANEXO C – Especificação técnica fibra de maçã



### Especificações Técnicas

# VITACEL®

Fibra de Maçã

Tipo: AF 401

### Apresentação:

A Fibra de Maçã VITACEL® AF 401 é extraída de maçãs, cuidadosamente secas.

### Características:

Fibras (segundo o Método AOAC)*	55 ± 5% d.s.
Sendo: Fibras Insolúveis	45%
Fibras Solúveis	15%
(das quais pectina)	9,3%
Perda por secagem	8,0%
Cinzas	3,0 %
Proteína*	4,6%
Lipídeos*	2,5%
Total de Ácidos (titr., calc. como ácido málico)*	1,64%
Ácido Fítico	Negativo
Glúten	< 10 mg/kg
pH – (em 10% de suspensão)	4,0 ± 1,0
Carboidratos Disponíveis (por diferença)	Aprox. 24,2%
Dos quais: Sacarose	3,5%
Glicose	3,2%
Frutose	7,7%
Sorbitol	1,2%
Minerais*: Potássio	3200 mg/kg
Cálcio	900 mg/kg
Magnésio	350 mg/kg
Sódio	320 mg/kg
Patulin	Não detectável

### Análise Microbiológica:

Contagem de Placa Padrão	Máx. 10 <sup>4</sup> UFC/g
Fungos / Leveduras	Máx. 10 <sup>3</sup> UFC/g

### Metais Pesados\*:

Os teores de metais encontrados são inferiores ao limite imposto pela BGA (Agência Alemã Federal de Saúde).

(\*valores típicos)



### Pesticidas e Fungicidas:

O teor de resíduos encontrados está abaixo dos limites estipulados para frutas e verduras.

### Propriedades Físicas:

Capacidade de ligar-se à Água (método AACC)	5,0 g H <sub>2</sub> O/g d.s.
A <sub>w</sub> (atividade de água)*	0,5
Calorias/g*	1,03 kcal = 4,37kJ
Densidade (segundo DIN 53 468)	450 g/L ± 15%
Granulometria	90 % < 300 µm

### Propriedades Sensoriais:

Aparência	Pó, Bege
Sabor	Típico de maçã
Odor	Típico de maçã

### Análise de Granulometria (segundo DIN 53 734/ peneira com jato de ar):

> 400 µm	Máx. 0,5%
> 150 µm	Máx. 40%
> 32 µm	Máx. 80%

### Observações e Rotulagem:

Fibra de Maçã VITACEL® AF 401 é um ingrediente que pode ser adicionado a qualquer formulação de produto alimentício sem que nenhum cuidado especial tenha que ser tomado devido a sua composição.

Recomendamos na rotulagem a citação *Fibra de Maçã*, pode-se adjectivá-lo também como fibra dietética de maçã.

### Embalagem e Armazenamento:

Embalado em sacos de papel de 25 kg, multicamadas com PE.

525 kg/pallet; dimensões médias (em cm) : 135 x 95 x 110

Validade de pelo menos 2 anos se estocado em local seco a temperatura ambiente (máx 20°C).

(\*valores típicos)

## ANEXO D – Especificação técnica inulina

# Product Sheet

## Beneo®GR

DOC.A4-03\*01/02-B

---

**Description**

**Beneo®GR** is a food ingredient consisting mainly of chicory inulin. Beneo®GR is a **GR**anulated powder.

**chicory inulin** is a mixture of oligo- and polysaccharides which are composed of fructose units linked together by  $\beta(2-1)$  linkages. Almost every molecule is terminated by a glucose unit. The total number of fructose or glucose units (= Degree of Polymerisation or DP) of chicory inulin ranges mainly between 2 and 60.

---

**Compositional Specifications**

All values expressed on dry matter.  
Analytical Methods : see our Technical Brochures.


inulin	> 90 %
glucose + fructose	≤ 4 %
sucrose	≤ 8 %
Dry Matter (d.m.)	97 ± 1.5 %
Carbohydrate content	> 99.5 %
Average DP of the inulin	≥ 10
Ash (sulphated)	< 0.2 %
Conductivity (15 Brix)	< 250 $\mu$ S
Heavy Metals	Pb, As each < 0.1 mg/kg Cd, Hg each < 0.01mg/kg
pH (10°Brix)	5.0 - 7.0

---

**Microbiological Specifications**

All values expressed on dry matter.  
Analytical Methods : see our Technical Brochures.


Mesophilic bacteria - total count	max. 1000/g
yeasts	max. 20/g
moulds	max. 20/g
Thermophilic aerobic spores	max. 1000/g
Anaerobic H <sub>2</sub> S producing thermophilic spores	max. 25/g
Enterobacteriaceae	absent in 1 g
Bacillus cereus	max. 100/g
Staphilococcus aureus	absent in 1 g
Escherichia coli	absent in 1 g
Clostridium perfringens	absent in 1 g
Clostridium botulinum	absent in 1 g
Salmonella	absent in 100 g
Shigella	absent in 10 g



ORAFI  
Active Food Ingredients

page 1

Doc.A4-03-01-02-B.doc



BENE

ORAFI Active Food Ingredients • Aandorenstraat 1, B - 3300 Tienen Belgium • Tel +32 (0)16 801 301 Fax +32 (0)16 801 308  
afi@orafit.com • www.orafit.com

## Labelling

All values are average values expressed per 100 g commercial product.

Carbohydrates	8 (97 <sup>1)</sup> )	gluten	absent
Sugars	8	lactose	absent
Dietary Fibre <sup>2)</sup>	89	Milk/meat/egg components	absent
Protein	absent	Seed/soy components	absent
Fat	absent	Insecticides, pesticides	absent
Vitamins and Minerals	Negligeable	Nuts, nut components	absent
Caloric value <sup>3)</sup>	120 kcal/505 kJ	Colza	absent
Broteinheite <sup>4)</sup>	0.65	Other allergens	absent
		Enzymatic activity	absent
		Folate	absent

N.D. = Not Detectable N/A = Not Applicable

1) including dietary fibre

2) measured by AOAC Method 997.08

3) based on a caloric value of 1 kcal/g for pure inulin. To be adapted to local regulations.

4) in accordance with German regulations.

## Other Information

**see also our Technical Brochures**

Aspect	fine white granulated powder
Behaviour	hygroscopic
Taste	slightly sweet, without aftertaste
Solubility in water	120 g/l at 25°C - 350 g/l at 90°C
Wettability in water	Good.
Dispersability in water	Good. May require stirring.
Properties and Applications	See our Technical Brochures.
Particle Sizes	See document "Particle Sizes".
Density	approx. 580 ± 50 g/l
Labelling - Ingredients List	inulin
Safety	Safe. Not toxic. Not dangerous. Excessive consumption may cause laxative effects. Is, like other fine powders, when mixed with air and ignited, capable of causing an explosion.
Packaging	Paper bags on pallets, see 'Packaging Sheet Powders'
Optimal storage conditions	Cool and dry, in its original airtight packaging.
Maximum durability	See packaging (minimum 18 months upon delivery)
Transport conditions	According to document 'Transport Conditions'
Irradiation	Not irradiated
GMO	Not containing GMOs or GMO-derived components. Not produced using GMO-based technology.
Kosher	Certified, Orthodox Union
Halal	Certified, Halal Feed and Food Inspection Authority
Plant origin	Suitable for vegetarians & vegans
Produced by	ORAFTI - address on first page

Represented by :


To the best of our knowledge, this information is reliable but should not be considered as a warranty of any kind.  
Specifications might be subject to change without notice



## ANEXO E – Parecer do Comitê de Ética



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**  
 Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná  
 Registro CONEP 268

Parecer Nº 221/07 CAAE Nº 0227.0.268.000-07	Londrina, 24 de outubro de 2007
<b>PESQUISADORA: SANDRA GARCIA</b>	
<p>Ilma Sra</p> <p align="center">O “Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná” de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, <u>APROVA</u> a execução do projeto:</p> <p align="center"><b>“Lactobacillus casei aderidos a fibras para uso em alimentos funcionais”</b></p> <p>Informamos que a Sra deverá comunicar, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá ser apresentado ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.</p>	
Situação do Projeto: <b>APROVADO</b>	
<p align="center">Atenciosamente,</p> <p align="center">   <b>Prof.ª. Dra. Nilza Maria Diniz</b>          Coordenadora          Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UEL       </p>	