LUIZ HENRIQUE GROTO GARUTTI

Influência da adição de subproduto de fruta em produto de soja potencialmente probiótico tipo *frozen yogurt* sobre o bioenriquecimento com riboflavina

São Paulo
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Luiz Henrique Groto Garutti

**Influência da adição de subproduto de fruta em produto de soja
potencialmente probiótico tipo *frozen yogurt* sobre o bioenriquecimento com
riboflavina**

(Projeto Vinculado ao projeto temático internacional FAPESP 2013/50506-8)

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação
em Ciência dos Alimentos –
FCF/USP, para obtenção do
título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad
Co-orientador: Dr. Jean Guy Joseph LeBlanc
(CERELA, Tucumán, Argentina)

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Versão Original

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

G212i	Garutti, Luiz Henrique Groto Influência da adição de subproduto de fruta em produto de soja potencialmente probiótico tipo frozen yogurt sobre o bioenriquecimento com riboflavina / Luiz Henrique Groto Garutti. - São Paulo, 2019. 58 p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Orientador: Saad, Susana Marta Isay Coorientador: LeBlanc, Jean Guy Joseph 1. Probiótico. 2. Riboflavina. 3. Produto Fermentado de Soja. 4. Bioenriquecimento. I. T. II. Saad, Susana Marta Isay, orientador. III. LeBlanc, Jean Guy Joseph, coorientador.
-------	--

Luiz Henrique Groto Garutti

**Influência da adição de subproduto de fruta em produto de soja
potencialmente probiótico tipo *frozen yogurt* sobre o bioenriquecimento com
riboflavina**

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do grau de Mestre

X

Prof. Dr^a. Susana Marta Isay Saad
Orientadora/Presidente

X

1º Examinador

X

2º Examinador

X

3º Examinador

São Paulo, de de 2019

Dedico este trabalho aos que se importam, a família em
que nasci e para a família que me acolheu, que me
apoiam.
E mesmo àqueles que nunca acreditaram.

AGRADECIMENTOS

Aos deuses que seguem a minha trajetória, com suas direções mais sutis, por tudo que colocaram em meu caminho.

Aos meus pais Gerlane e André Luiz, que acima de tudo, me deram um lar e por me ensinarem o que é certo e errado.

Aos meus irmãos Lucas e Thaís, que sempre estarão do meu lado.

À minha noiva Samantha, que nos piores momentos me mostrou que tudo é possível e que sempre foi a minha fonte maior de força e alegria, e aos meus sogros, Maria da Conceição e Marcus Tufic, que sempre me acolheram e me apoiaram.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Susana Marta Isay Saad, que acreditou na minha capacidade e me deu a oportunidade de aprender e desenvolver essa pesquisa.

Ao meu co-orientador Dr. Jean Guy Joseph LeBlanc, por suas contribuições e conselhos, por responder minhas dúvidas e por sua paciência.

À Dr.^a Karina Maria Olbrich dos Santos, e a EMBRAPA, por me fornecer o material sem o qual essa pesquisa não seria possível.

À Prof.^a Dr.^a Ligia Bicudo de Almeida Muradian e ao técnico Elias da Silva Araujo, do laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos, por cederem o tempo e equipamentos necessários para realizar as análises da vitamina.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, por cederem o espaço e companhia, pelo tempo que precisei.

Aos meus amigos e colegas do grupo de pesquisa e da pós-graduação, Igor Ucella, Marcela Albuquerque, Marcela Leite, Andressa Mem, Débora Oliveira, Raquel Bedani, Marina Padilha, Diogo Vieira, Thainá Domingues e Breno Han, que apoiaram e ajudaram durante os experimentos e escrita deste trabalho, assim como pelos momentos de alegria durante as horas fora do trabalho.

Aos docentes, funcionários e técnicos do Departamento de Tecnologia e Bioquímica Farmacêutica e do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, pela cordialidade e acolhimento.

Às empresas Christian-Hansen e Danisco pela contribuição de material para o andamento da pesquisa.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado (Processo 133025/2017-9) e à FAPESP pelo apoio financeiro (Projeto #2013/50506-8)

À Prof.^a Dr.^a Ila Maria de Aguiar Oliveira, pela sua imensa influência na minha decisão de seguir uma carreira acadêmica.

“Melhor fardo homem nenhum carrega no caminho do que muito bom senso; melhor do que riqueza isto lhe parece em um lugar que lhe é estranho. ”

Hávamál – I-Os ensinamentos de Odin

GARUTTI, L.H.G. **Influência da adição de subproduto de fruta em produto de soja potencialmente probiótico tipo *frozen yogurt* sobre o bioenriquecimento com riboflavina.** 2019, 49p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2019

RESUMO

As bactérias probióticas, além de diversos possíveis efeitos benéficos à saúde do consumidor, podem apresentar um potencial para bioenriquecer alimentos através da produção de compostos de interesse nutricional e para a saúde durante a etapa de fermentação. Nesse sentido, a produção de vitaminas naturais por bactérias lácticas, incluindo as probióticas, emerge como alternativa promissora ao uso de vitaminas sintéticas para a fortificação de alimentos. O uso de substratos vegetais para estimular a produção de vitaminas do grupo B por probióticos compreende uma solução sustentável para o reaproveitamento desse material oriundo, principalmente, do processamento de frutas. Os subprodutos de frutas são compostos por diversas substâncias bioativas e a incorporação desses ingredientes para o desenvolvimento de alimentos com alto valor agregado representa uma solução sustentável para o seu reaproveitamento. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a influência da adição de subproduto de fruta no bioenriquecimento de um produto de soja fermentado tipo *frozen yogurt* probiótico com riboflavina (vitamina B2). Para este fim, a capacidade de diferentes cepas de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. em produzir riboflavina foi avaliada, utilizando-se um meio de cultura desprovido desta vitamina (*Riboflavin Assay medium*, RAM). Paralelamente, foi avaliada a capacidade dessas cepas em fermentar os subprodutos de uva (*Vitis* spp.) e de caju (*Anacardium occidentale* L.). De acordo com os resultados de produção de riboflavina em RAM e de fermentação dos subprodutos de fruta, foram selecionadas as cepas para o desenvolvimento do produto fermentado de soja tipo *frozen yogurt* (FY). Dentre as cepas testadas, os *Streptococcus thermophilus* (ST-M6, TA-40 e TH-04) e o probiótico *Lactobacillus fermentum* PCC apresentaram potencial para produzir riboflavina em meio RAM. As cepas PCC e ST-M6 mostraram-se capazes de fermentar os subprodutos de caju e de uva (atingindo 8,25 e 8,40 log UFC/mL, respectivamente, para PCC e ST-M6 com subproduto de uva e 4,82 e 8,38 log UFC/mL, respectivamente, para PCC e ST-M6 com subproduto de caju em 24h). Por outro lado, as cepas TH-4 e TA-40 fermentaram apenas o subproduto de uva (atingindo 6,87 e 7,24 log UFC/mL, respectivamente, em 24h). Sendo assim, foram selecionadas as cepas de *St. thermophilus* ST-M6, TH-4 e TA-40 e a de *Lactobacillus fermentum* PCC para a aplicação nos produtos visando o seu bioenriquecimento. O FY suplementado com 1% de subproduto de uva foi preparado, utilizando-se as cepas em co-cultura totalizando 3 combinações, ou seja, entre *Lb. fermentum* PCC e as 3 cepas de *St. thermophilus*. As formulações de FY foram capazes de atingir uma concentração de riboflavina de 8,40 e de 5,18 µg/mL (combinando TA-40 e PCC) em 60 dias, respectivamente, sem e com o subproduto de uva. Já a associação de ST-M6 e PCC, sem o subproduto, resultou na menor concentração obtida (2,30 µg/mL), atingindo 5,62 µg/mL na presença do subproduto. Dessa maneira aplicação do subproduto de uva para estimular a produção de riboflavina só foi efetiva para a formulação que combinou *St. thermophilus* ST-M6 e *Lb. fermentum* PCC.

Palavras-chaves: Probiótico; Vitamina B2; Alimento Bioenriquecido; *Lactobacillus*; Subproduto de uva; *Streptococcus thermophilus*; Resíduo agro-industrial

GARUTTI, L.H.G. **Influence of the addition of a fruit by-product on the bio-enrichment with riboflavin of a frozen yogurt-like soy product.** 2019. 49p. Dissertation (Master of Science) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2019

ABSTRACT

Probiotic bacteria, in addition to several possible beneficial effects on the consumer's health, may present a potential to bioenrich food through the production of compounds of nutritional and health interest during fermentation. In this sense, the production of natural vitamins by lactic acid bacteria, including probiotics, emerges as a promising alternative to the use of synthetic vitamins for food fortification. The use of vegetable substrates to stimulate the production of B-group vitamins by probiotics comprises a sustainable solution for the reuse of this material coming mainly from fruit processing. Fruit by-products are composed of various bioactive substances and the incorporation of these ingredients into the development of high value-added foods represents a sustainable solution for their reuse. Therefore, the present study aims to evaluate the influence of the addition of fruit by-product on the bio-enrichment of a probiotic frozen yogurt-like fermented soy product with riboflavin (vitamin B2). For this purpose, the ability of different strains of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. in producing riboflavin was evaluated using a culture medium devoid of this vitamin (Riboflavin Assay Medium, RAM). In addition, we evaluated the ability of these strains to ferment the grape (*Vitis* spp.) and cashew (*Anacardium occidentale* L.) by-products. According to the results of riboflavin production in RAM and fermentation of fruit by-products, strains were selected for the development of a fermented frozen yogurt-like (FY) soybean product. Among the strains tested, *Streptococcus thermophilus* (ST-M6, TA-40, and TH-04) and the probiotic *Lactobacillus fermentum* PCC had the potential to produce riboflavin in RAM medium. The strains PCC and ST-M6 were able to ferment the cashew and the grape by-products (reaching 8.25 and 8.40 log CFU/mL, respectively, for PCC and ST-M6 with the grape by-product, and 4.82 and 8.38 log CFU/mL, respectively, for PCC and ST-M6 with cashew by-product in 24h). On the other hand, TH-4 and TA-40 fermented only the grape by-product (reaching 6.87 and 7.24 log CFU/mL, respectively, in 24h). Therefore, the strains *St. thermophilus* ST-M6, TH-4, and TA-40 and the strain *Lactobacillus fermentum* PCC were selected for application in the products for bio-enrichment. The FY supplemented with 1% of grape by-product was prepared using the co-culture strains comprising three combinations between *Lb. fermentum* PCC and the three strains of *St. thermophilus*. The FY formulations were capable of producing 8.40 and 5.18 µg/mL (combination of TA-40 and PCC) in 60 days, respectively, without and with the grape by-product. However, the association of ST-M6 and CCP, without the by-product, resulted in the lowest concentration obtained (2.30 µg/mL), achieving 5.62 µg/mL in the presence of the by-product. Thus, the application of the grape by-product in order to stimulate the production of riboflavin was only effective for the formulation that combined *St. thermophilus* ST-M6 and *Lb. fermentum* PCC.

Key-words: Probiotic; Vitamin B2; Bioenriched food; *Lactobacillus*; Grape by-product; *Streptococcus thermophilus*; Agro-industrial pomace

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1 - Cepas probióticas e starter testadas e respectivos meios de cultivo e condições de incubação.....</i>	<i>23</i>
Tabela 2 - Formulação dos ingredientes utilizados para o preparo do produto de soja tipo frozen yogurt	25
Tabela 3 - Multiplicação das cepas starter e probióticas em RAM	28
Tabela 4 - Diferenças na variação de populações entre 0 e 24h na fermentação do subproduto.....	31
Tabela 5 – Valores de pH e acidez ao longo de 60 dias de armazenamento a - 18±2 °C dos FY.....	32
Tabela 6 - Composição centesimal das formulações de FY	33
Tabela 7 - Evolução das populações de microrganismos ao longo do armazenamento a -18±2 °C por até 60 dias	33
Tabela 8 - Variações das populações no produto ao longo do armazenamento a -18±2 °C por até 60 dias em relação ao inóculo inicial (t = 0)	34

Lista de Figuras

Figura 1 - Via da biossíntese de riboflavina em bactérias	19
Figura 2 – Populações iniciais (0h) e após 24 e 48 horas de incubação das cepas de <i>Streptococcus thermophilus</i> (TA-40, TH-4 e ST-M6) e <i>Lactobacillus fermentum</i> PCC em caldo MRS modificado com vermelho de fenol suplementado em 1% (m/v) de subproduto de caju	29
Figura 3 - Populações iniciais (0h) e após 24 e 48 horas de incubação das cepas de <i>Streptococcus thermophilus</i> (TA-40, TH-4 e ST-M6) e <i>Lactobacillus fermentum</i> PCC em caldo MRS modificado com vermelho de fenol suplementado em 1% (m/v) de subproduto de uva.....	30
Figura 4 - Concentração da riboflavina ao longo do armazenamento dos produtos a -18 ± 2 °C por até 60 dias	36

Sumário

Sumário.....	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Bactérias Láticas	11
1.2. Subprodutos de fruta	12
1.2.1. O caju e seus subprodutos	13
1.2.2. A uva e seus subprodutos.....	13
1.3. Alimentos funcionais probióticos, prebióticos e simbióticos	14
1.4. Produto de soja fermentado	15
1.5. Vitaminas e a riboflavina	16
1.5.1. Produção da riboflavina por microrganismos	18
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo Geral	21
2.2. Objetivos Específicos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1. Preparação dos subprodutos.....	22
3.2. Seleção das cepas probióticas	22
3.3. Ensaio de fermentabilidade dos subprodutos de frutas e determinação da capacidade de cada cepa em produzir riboflavina a partir da fermentação dos subprodutos de fruta.....	24
3.4. Preparação do produto fermentado de soja tipo frozen yogurt	24
3.5. Quantificação dos microrganismos probióticos e starter no produto	26
3.6. Quantificação de riboflavina	26
3.7. Composição centesimal	27
3.8. Análise estatística	27
4. Resultados e Discussão	28
4.1. Triagem de Microrganismos Probióticos e Starter	28
4.2. Fermentabilidade dos Subprodutos	29
4.3. Características físico-químicas do FY	32
4.4. Sobrevivência ao processamento e armazenamento	33
4.5. Quantificação da riboflavina	35
5. Conclusão	39
Referências Bibliográficas	40
ANEXOS	49
ANEXO A – Currículo Lattes.....	49
ANEXO B – Ficha do Aluno.....	52
ANEXO C - Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado.....	54

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Bactérias Lácticas*

O uso de microrganismos para a produção de alimentos é uma prática difundida, mesmo que de forma inconsciente, observada em diversos períodos da humanidade. Desde a fermentação do grão para a obtenção de bebidas alcoólicas e como meio de preservação de alimentos, até a produção de medicamentos, os microrganismos têm sido utilizados de maneira a suprir necessidades que se mostram cada vez mais desafiadoras de se realizar, de maneira eficiente e renovável, o consumo sustentável dos recursos disponíveis na natureza.

As bactérias lácticas (BAL) compreendem um grupo de microrganismos que possuem características semelhantes, sendo que todas têm o ácido láctico como principal produto de fermentação de carboidratos. Essas bactérias são classificadas como Gram-positivas, podendo ser em formato de cocos ou bastonetes não formadores de esporos, catalase-negativos e anaeróbios ou microaerófilos (SALMINEN; WRIGHT, 2004).

Em parte por causa de seu uso extensivo na elaboração e fabricação de alimentos, boa parte das BAL são consideradas seguras para o consumo (GRAS = “*generally recognized as safe*”) (TAMIME; THOMAS, 2017). Dentre as BAL, algumas cepas que pertencem ao gênero *Lactobacillus* possuem um interesse especial na pesquisa e, principalmente, por parte das indústrias de alimentos, devido às suas características de potencial probióticos (ALBUQUERQUE, M. et al., 2016; ANGMO; KUMARI; BHALLA, 2016; THAKUR; TOMAR, 2016). Atualmente os microrganismos probióticos são definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (HILL et al., 2014).

As bactérias lácticas são conhecidas por serem a principal microbiota de produtos fermentados, por terem um efeito de conservação devido à inibição de microrganismos saprófitas e, ainda, a inibição de microrganismos patogênicos, em virtude da produção de ácido láctico, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (ANGMO; KUMARI; BHALLA, 2016).

Adicionalmente, é possível encontrar algumas cepas de BAL que têm a capacidade de produzir vitaminas hidrossolúveis, como as vitaminas do complexo B.

Normalmente, as BAL são auxotróficas para várias vitaminas, ou seja, dependem dessas vitaminas para multiplicação, o que traz a essas cepas produtoras um interesse maior na pesquisa (CAPOZZI et al., 2012).

1.2. *Subprodutos de fruta*

Na indústria do processamento de frutas é gerada uma quantidade considerável de subprodutos compostos, geralmente, por sementes, cascas e bagaço. A utilização desses subprodutos depende de vários fatores, como o tipo de fruta processada, tipo de processamento e composição do resíduo (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; AGUEDO et al., 2012; GURAK et al., 2014; ALBUQUERQUE, M. et al., 2016).

De maneira a reduzir o impacto ambiental causado pelo resíduo gerado a partir do processamento de frutas, a utilização de subprodutos oriundos desse processamento é alvo de pesquisas devido à grande quantidade de compostos bioativos presentes nesse material vegetal. Entretanto, cada fruta produz um resíduo diferente, dependendo, ainda, da maneira em que a matéria-prima foi transformada e da origem da fruta processada (BUSTAMANTE et al., 2008; DEVESA-REY et al., 2011).

Planos de manejo de resíduos, atualmente, direcionam o tratamento dos subprodutos para a geração de energia, através da queima ou subsequente fermentação para a produção de álcool. Na maioria dos casos, os subprodutos de frutas são utilizados para a produção de ração animal. Há uma necessidade de incorporação desses resíduos de fruta para o consumo humano. Tal fato contribuiria não apenas para a questão da sustentabilidade, mas também ofereceria benefícios nutricionais e potencialmente funcionais aos seres humanos (AZEVEDO et al., 2014).

Os subprodutos de natureza fibrosa, como o bagaço do pedúnculo de caju e o bagaço oriundo da fabricação de vinho de uva tem potencial para servir como fonte energética para alguns microrganismos que podem fermentar os carboidratos presentes nesses resíduos. Os subprodutos de frutas podem, ainda, apresentar características prebióticas e a incorporação de resíduos de fruta para o desenvolvimento de um produto fermentado probiótico pode estimular um aumento na produção de vitaminas pelos microrganismos, sem comprometer a qualidade do produto final (ROBERFROID, 2007; ALBUQUERQUE, T. et al., 2016).

1.2.1. O caju e seus subprodutos

O caju (*Anacardium occidentale L.*) é um fruto originalmente brasileiro, com produção centralizada no nordeste do país. É composto, principalmente, de duas partes: a castanha, que é o principal produto de exportação, e o pedúnculo, de onde é fabricado o suco de caju e outros derivados, como doces e geleias (ABREU et al., 2013). Os resíduos provenientes da fabricação de polpa de caju para sucos são constituídos, após a secagem, principalmente de açúcar (dividido em fibras solúveis/insolúveis e demais açúcares) e proteínas. Entretanto, não há uma descrição para o conteúdo de vitaminas presentes nesses resíduos (SANTOS et al., 2007; LIMA et al., 2012; AKUBOR, 2016).

Segundo Lima et al. (2012), há um potencial no subproduto do processamento do caju para produção de etanol, devido à quantidade de açúcares e fibras presentes que podem ser fermentadas por microrganismos. A sua aplicação, entretanto, não se limita apenas ao uso por microrganismos. Barros et al. (2012) e Pinho et al. (2011) utilizaram o resíduo ou as fibras já separadas do caju para a produção de hambúrguer enriquecido com fibras. Schweiggert et al. (2016), por sua vez, utilizando pedúnculos de cores diferentes, verificaram a presença de antocianinas e carotenoides em sua casca. Sendo assim, esse subproduto fica mais disponível para outras aplicações que possam aproveitá-lo.

1.2.2. A uva e seus subprodutos

A uva (*Vitis spp.*) é um dos frutos mais cultivados ao redor do mundo, sendo que uma grande parcela da sua produção é destinada à produção de vinhos e sucos. Os subprodutos formados pelo processamento da uva para a fabricação de vinho apresentam uma concentração elevada de substâncias antioxidantes como polifenóis e antocianinas, assim como uma alta quantidade de fibras presentes (IORA, 2015).

A não utilização dos subprodutos da fabricação de vinho leva a um problema ambiental, diretamente relacionado ao manejo correto para o descarte, como aponta o estudo realizado por Devesa-Rey et al. (2011). Segundo os autores, é necessário que a indústria possa encontrar alternativas para o descarte desses produtos, trazendo inovações e impedindo que exista um impacto ambiental maior. Para Beres et al. (2017) existem várias alternativas que podem ajudar a indústria a aproveitar

melhor os subprodutos, tanto para a obtenção de certas substâncias quanto para o uso desses subprodutos como ingredientes funcionais.

De certa maneira, as diferentes variedades de vinhos irão produzir subprodutos com composições diferentes, apesar de semelhantes. Devesa-Rey et al. (2011) apontaram que os diversos resíduos provenientes da fabricação do vinho podem ser reutilizados. Rivera et al. (2009) observaram que a baga da uva tem um potencial para estimular a produção de ácido láctico por certos microrganismos.

1.3. *Alimentos funcionais probióticos, prebióticos e simbióticos*

Alimentos funcionais e enriquecidos são essencialmente distintos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define os alimentos enriquecidos como “aqueles que tem adicionado um ou mais nutrientes essenciais, contidos naturalmente ou não, no alimento com o objetivo de reforçar o seu valor nutritivo e ou prevenir ou corrigir deficiência demonstrada em um ou mais nutrientes, na alimentação da população ou em grupos específicos da mesma”. Por outro lado, um alimento funcional é aquele que apresenta um benefício cientificamente comprovado para a saúde do ser humano (ANVISA, 1999ab). Dentre os alimentos funcionais, destacam-se os alimentos probióticos, que estão presentes na alimentação humana há muito tempo (TAMIME; THOMAS, 2017). Outra categoria inserida no grupo dos alimentos funcionais, diz respeito aos prebióticos que, segundo Gibson et al. (2017) são “substratos que são seletivamente utilizados pelos microrganismos do hospedeiro conferindo um benefício à saúde”.

Algumas bactérias lácticas e probióticas possuem a capacidade de sintetizar vitaminas, principalmente do grupo B. Ao colonizarem a microbiota intestinal, as cepas probióticas produtoras de vitaminas podem produzir estes compostos no intestino humano pelo tempo que estiverem viáveis (THAKUR; TOMAR, 2016), contribuindo positivamente com o organismo humano. Entretanto, tal propriedade de produção é cepa-dependente e varia de acordo com as condições de cultivo da bactéria, podendo ser aumentada quando as condições adequadas são aplicadas (ALBUQUERQUE et al., 2016).

Os gêneros de bactérias lácticas que colonizam a microbiota intestinal humana, além de proporcionarem diversos benefícios ao organismo humano, como a regulação

da resposta imune e a proteção contra doenças inflamatórias e infecções, também podem converter compostos dietéticos em moléculas bioativas como vitaminas (LEBLANC et al., 2013).

Pacheco da Silva et al. (2016) isolaram bactérias lácticas de produtos caprinos, cuja capacidade em produzir folato e riboflavina foi determinada. É importante destacar que se faz necessária a seleção correta das cepas e/ou combinações de microrganismos, bem como adequar as condições de cultivo para propiciar o desenvolvimento de produtos com concentrações aumentadas de vitamina (LEBLANC et al, 2011).

1.4. Produto de soja fermentado

O produto de soja fermentado é um produto com características semelhantes ao iogurte, ou leite fermentado. Se congelado, forma um produto semelhante ao iogurte congelado, ou *frozen yogurt*, um produto que se assemelha ao sorvete que passa por um processo de fermentação inicial, transformando o açúcar em ácido láctico. Após a fermentação, os demais ingredientes são adicionados, seguido do batimento e congelamento simultâneos até adquirir uma consistência cremosa e macia (GONÇALVES; EBERLE, 2008).

Pelo baixo teor de gordura (entre 3,5% e 6%), produtos de soja fermentados podem ser considerados uma alternativa saudável aos alimentos fermentados lácteos tradicionais, principalmente para pessoas que sofrem com obesidade, doenças cardiovasculares e intolerância à lactose (LOPEZ; MEDINA; JORDANO, 2006)

Bedani, et al. (2013) trabalharam com a viabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 e *Lb. acidophilus* La-5 e *starters*, e sua sobrevivência em ensaio simulado de digestibilidade *in vitro*. Nesse estudo, foi possível observar que a sobrevivência dos microrganismos sofreu interferência da matriz de soja, aumentando sua capacidade de resistir o armazenamento, mantendo a concentração de 7-8 log UFC/g para BB-12 e 5 log UFC/g para La-5 e também a proteção oferecida pela matriz ao ambiente gástrico.

Em virtude dessas características e também da necessidade de aproveitar os materiais existentes e subutilizados na indústria do processamento de frutas, em um enfoque de sustentabilidade, é possível que um subproduto rico em carboidratos complexos, como os subprodutos de fruta, possa estimular a produção de vitaminas

por microrganismos probióticos durante processos fermentativos (Albuquerque, M. et al., 2016, 2017).

1.5. *Vitaminas e a riboflavina*

Compostos com atividade vitamínica que são conhecidos atualmente possuem poucas semelhanças entre si, embora de forma geral estejam divididos em dois grupos de acordo com sua solubilidade: vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K) e vitaminas hidrossolúveis (C, B₁, B₂, B₅, B₆, B₁₂, PP ou niacina, folatos, biotina, inositol e colina). Essa solubilidade determina a absorção no intestino e armazenamento nos tecidos (BALL, 1998; BOBBIO, 1989).

As vitaminas são micronutrientes essenciais, normalmente precursores de enzimas que são necessárias para reações bioquímicas vitais para a célula (LEBLANC et al., 2013). A atividade biológica de cada vitamina depende de diferentes compostos que são conhecidos como vitâmeros. Além disso, algumas vitaminas podem apresentar precursores ou pró-vitaminas, que são substâncias originais que serão convertidas em vitaminas pelo metabolismo normal do organismo (BALL, 1998).

Devido à grande importância das vitaminas no metabolismo humano e ao aumento do consumo de alimentos processados, a adição de vitaminas aos alimentos ganhou grande impulso. Cinco são os objetivos desta adição (BALL, 1998):

- Fortificação: adição a alimentos que tem um papel ideal como carreadores para cada vitamina;
- Restauração: recolocação total ou parcial de uma ou mais vitaminas perdidas durante o processamento;
- Padronização: adição para normalizar os teores naturais do alimento;
- Nutrição: formulação e fabricação de alimentos para substituir refeições;
- Tecnológicos: adição de vitaminas por funções de processamento específicos.

A Legislação Brasileira, pela Resolução RDC no. 360 de 23 de dezembro de 2003, define como optativa a declaração de vitaminas no rótulo dos produtos comercializados no país. Porém, a declaração nutricional para vitaminas só é permitida para aqueles alimentos que contenham estas em quantidade igual ou superior a 5% da ingestão diária recomendada (IDR) por porção indicada no rótulo (ANVISA, 2003).

A riboflavina é uma necessidade dietética para os seres humanos, já que o seu organismo não tem capacidade de produção desta vitamina (BURGESS; SMID; VAN SINDEREN, 2009).

A riboflavina ou vitamina B₂ foi descoberta na década de 1920 como fator de crescimento resistente a altas temperaturas presente em extrato de levedura. No início dessa década, este composto foi isolado da clara do ovo e, doze anos depois, a ovoflavina foi obtida desta matriz. Em 1932, Wagner-Jauregg isolou vitamina B₂ no leite e Warburg e Christian isolaram uma enzima amarela, contendo flavina na estrutura, a partir de extrato de levedura, que posteriormente foi identificada como a forma fosforilada da riboflavina (COOPERMAN, 1991; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003).

O termo vitamina B₂ é aplicado a três compostos com mesma atividade vitamínica: riboflavina, flavina mononucleotídeo ou riboflavina 5-fosfato (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo ou riboflavina 5'-adenosildifosfato (FAD) (COOPERMAN, 1991; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003).

Adicionalmente, a riboflavina é utilizada na produção de FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo) e FMN (Flavina Mononucleotídeo), que participam na cadeia transportadora de elétrons do metabolismo dos carboidratos e lipídeos. A riboflavina ainda é utilizada pelo organismo para o metabolismo de outras vitaminas, como o folato e a niacina (SOUZA et al., 2005).

A riboflavina é composta por uma molécula de isoaloxazina adicionada de cadeia lateral de ribitol, com nome sistemático *7,8-dimetil-10-(1'-D-ribitol)isoaloxazina* e peso molecular 376,36, com fórmula empírica C₁₇H₂₀N₄O₆. As outras formas da vitamina B₂, FMN e FAD, compartilham características físico-químicas semelhantes às da riboflavina, como a solubilidade (COOPERMAN, 1991; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003).

A maioria das vitaminas do complexo B atua como coenzima de enzimas envolvidas no catabolismo dos alimentos para produção de energia, ou seja, as vitaminas se ligam a proteínas enzimáticas para que essas possam ativar sua função catalítica (BALL, 1998). Na forma de suas coenzimas, FAD e FMN, a vitamina B₂ participa de reações de óxido-redução em várias vias metabólicas, atuando como intermediários na transferência de elétrons (COOPERMAN, 1991; BIANCHINI-

PONTUSCHKA, 2003). Ocorrendo falta de vitamina, a coenzima não pode ser formada bloqueando a via metabólica com consequente acúmulo de substrato e utilização de via metabólica alternativa, provocando desequilíbrio do metabolismo (BALL, 1998).

Os níveis de riboflavina recomendados para humanos variam de acordo com o sexo, a idade e o estado fisiológico. Adultos saudáveis precisam consumir entre 0,9 e 1,6 mg diariamente, pois o organismo humano não tem capacidade de armazenar essa vitamina (BALL, 2004).

As formas ligadas de FMN e FAD são liberadas das proteínas nas condições ácidas do estômago e hidrolisadas no intestino delgado a riboflavina livre, que é, então, absorvida por um canal de transporte ativo dependente de sódio. O fígado é o principal órgão de estocagem, com até um terço do total de flavinas do organismo, seguido dos rins e coração, com 70 a 90% da vitamina sendo estocada na forma de FAD. A excreção ocorre, principalmente, através da urina, podendo também ocorrer através da bile e do suor (COOPERMAN, 1991; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003).

A deficiência de riboflavina é associada com a deficiência visual, redução de taxa de crescimento, dano hepático, mudança no metabolismo cerebral e sintomas como hiperemia, edema de mucosa, entre outros (THAKUR; TOMAR; DE, 2016). Para combater essa deficiência, os alimentos podem ser enriquecidos diretamente com a riboflavina e assim ingeridos. Entretanto, é possível, também, utilizar bactérias lácticas para a produção de riboflavina e de outras vitaminas diretamente no alimento através da fermentação (ALBUQUERQUE, M. et al., 2016; STAHMANN; REVUELTA; SEULBERGER, 2000; THAKUR; TOMAR; DE, 2016).

1.5.1. Produção da riboflavina por microrganismos

A síntese de riboflavina por microrganismos envolve uma cadeia de processos mediados por enzimas específicas que atuam no metabolismo das purinas ou na via de pentose-fosfato (MAGNÚSDÓTTIR et al., 2015; STAHMANN; REVUELTA; SEULBERGER, 2000). Adaptada de Thakur, Tomar e De (2016), a figura 1 mostra as principais etapas da produção de riboflavina e seus genes correspondentes.

Figura 1 - Via da biossíntese de riboflavina em bactérias

Fonte: Adaptado de Thakur, Thomar e De (2016)

A riboflavina é produzida por diversos microrganismos, sendo que alguns vivem em comensalismo no lúmen intestinal (LEBLANC et al., 2013). Diversos fatores se combinam para limitar ou ampliar a produção dessa vitamina por esses microrganismos (YONG et al., 2013).

Em um ambiente como o lúmen intestinal, onde células são constantemente produzidas e repostas, há a necessidade de se repor também as vitaminas que são necessárias para esse processo de replicação e de energia, fundamentais para o bom funcionamento do órgão (LEE; CORFE; POWERS, 2013). Thakur, Tomar e De (2016) reuniram informações sobre diversas cepas produtoras de riboflavina, agrupando os grupos segundo a metodologia utilizada para identificar a produção e indicando o potencial dessas cepas de produção *in situ*. Yong et al. (2013) observaram que a maior produção da vitamina por bactérias se dá em valores de pH mais elevados (pH entre 8 e 9), que correspondem ao pH encontrado no lúmen intestinal, mas esse efeito pode ser dependente da cepa testada.

Guru e Viswanathan (2013) encontraram uma produção significativa de riboflavina na fermentação do leite por *Lactobacillus acidophilus* isolados de queijos e coalhada. Russo et al. (2014), por sua vez, identificaram cepas super-produtoras de

riboflavina entre 40 isolados de massa de pão e foram capazes de produzir um pão enriquecido naturalmente com a vitamina.

Arena et al. (2014) organizaram e agruparam informações sobre o potencial da aplicação de cepas *Lactobacillus plantarum* como produtoras de riboflavina *in situ*. Quando selecionadas por aplicação de roseoflavina, um análogo tóxico da riboflavina, as cepas de *Lb. plantarum* se mostraram super-produtoras da vitamina (BURGESS; SMID; VAN SINDEREN, 2009; RUSSO et al., 2014).

Thakur e Tomar (2016) identificaram cepas produtoras de riboflavina dentro de diversos nichos, como coalhada e fezes. Essas cepas isoladas foram capazes de sobreviver na ausência da vitamina e de produzir a vitamina em quantidades superiores às suas próprias necessidades, demonstrando o potencial para uso em substituição ao enriquecimento químico em produtos.

No estudo realizado por Capozzi et al. (2012), foram reunidas informações acerca de diversas cepas que tem o material genético necessário para produção de vitaminas do complexo B, incluindo folato e riboflavina, com um enfoque principal em produtos à base de grãos, onde as vitaminas desse grupo não estão em quantidades satisfatórias.

A incorporação de produtos probióticos na dieta do brasileiro tem aumentado conforme há maior divulgação desse tipo de produto e de seus benefícios. Embora existam produtos enriquecidos com vitaminas, o processamento necessário para fortificação química traz desvantagens, como o aumento do custo. Em virtude dessas características e também da necessidade de aproveitar os materiais existentes e subutilizados na indústria de alimentos, em um enfoque de sustentabilidade, a associação de um produto probiótico, contendo culturas lácticas com capacidade de bioenriquecimento com produção de vitaminas do complexo B, como a riboflavina, com um subproduto da indústria de frutas nos parece bastante promissor e poderá ser aplicado em um produto alimentício probiótico isento de lactose e proteínas do leite e rico em carboidratos complexos e bioenriquecido.

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo Geral*

- Avaliar a influência da adição de subproduto de fruta no bioenriquecimento de um produto de soja fermentado probiótico tipo *frozen yogurt* com riboflavina produzida pelos microrganismos a partir da fermentação.

2.2. *Objetivos Específicos*

- Selecionar cepas produtoras de riboflavina dentre as fornecidas pela Christian Hansen para o Projeto Temático BioSyn (processo FAPESP 2013/50506-8), utilizando meio desprovido de riboflavina;
- Avaliar a capacidade das cepas produtoras de riboflavina em fermentarem os resíduos de caju e uva;
- Selecionar as cepas que obtiveram os melhores resultados (fermentação dos resíduos de fruta e produção de riboflavina) para desenvolver o produto de soja fermentado tipo *frozen yogurt* com concentrações maiores de riboflavina;
- Avaliar o produto de soja fermentado probiótico tipo *frozen yogurt* ao longo do seu período de armazenamento quanto aos seus parâmetros microbiológicos, pH, acidez e quantidade de riboflavina, na presença e na ausência de subproduto de fruta em sua formulação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. *Preparação dos subprodutos*

O subproduto de uva foi cedido pela Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária (EMBRAPA), unidade Agroindústria de Alimentos, localizada em Guaratiba (Rio de Janeiro, RJ). É composto por uma mistura de resíduo de uva tipo Merlot (Bento Gonçalves, RS) e resíduo de uva tipo Alicante Bouschet (Petrolina, PE). O resíduo de caju foi cedido pela indústria de sucos *Delícia da Fruta*[®] (Natal, Rio Grande do Norte). Os resíduos de uva e caju foram transportados congelados e mantidos dessa forma até o processamento em laboratório conforme descrito por Albuquerque, M. et al. (2016).

De forma geral, para o processamento, os subprodutos foram descongelados a uma temperatura de 4 ± 2 °C por 48h. Em seguida, foi realizada a secagem do material em estufa de circulação de ar a 60 °C por 24h e, posteriormente, o resíduo seco foi reduzido a um pó fino e tamizado para granulação menor que 0,42 mm. De maneira a padronizar os resíduos de uva, ambas as variedades secas foram misturadas no processo de trituração e tamisação. Os resíduos foram, então, armazenados em sacos de polipropileno e estocados a -18 ± 2 °C até a utilização.

3.2. *Seleção das cepas probióticas*

As cepas fornecidas pela Christian Hansen (Christian Hansen, Hørsholm, Dinamarca) e DuPont Danisco (Dangé, França) para o Projeto Temático BioSyn (processo FAPESP 2013/50506-8) e descritas na tabela 1, foram testadas quanto à sua capacidade de produzir riboflavina. Para isso, cada cepa foi ativada nas condições descritas na tabela 1. Em seguida, uma alíquota do cultivo de cada cepa foi transferida para um microtubo estéril, centrifugada (10.000xg por 5 min) e lavada com solução salina estéril 0,85% (m/v). Este procedimento de lavagem foi repetido 3 vezes. Desta suspensão bacteriana, um volume de 120 µL foi transferido para um meio de cultura sem riboflavina (*Riboflavin Assay Medium* – RAM – Difco, EUA) e incubado a 37 °C por 24h. Após este período, as cepas que se multiplicaram no RAM foram centrifugadas e lavadas 3 vezes, utilizando solução salina 0,85 % (m/v). Novamente, uma alíquota de 120 µL foi transferida para um novo RAM e incubada a 37 °C por 24h.

Esta etapa de inoculação no RAM a partir do caldo MRS foi realizada por até sete vezes. Após as 7 passagens em RAM, os tubos aonde as cepas não conseguiram se multiplicar foram suplementados com 200µL de um padrão de riboflavina (SUPELCO, Merck, Darmstadt, Alemanha), na concentração de 1ng/ml, de maneira a verificar que a falha na multiplicação se deu pela ausência e incapacidade de produção da vitamina pelo microrganismo (JUAREZ DEL VALLE et al., 2016; CARRIZO et al., 2016).

Para os microrganismos que conseguiram sobreviver às sete etapas de passagem mencionadas anteriormente, do último RAM com crescimento microbiano, foi coletada, e congelada a -86 °C, uma alíquota para determinação de riboflavina extracelular e riboflavina intracelular, conforme descrito no item 3.6. Os microrganismos que apresentaram produção de vitamina nessa etapa foram escolhidos para a elaboração do produto fermentado de soja.

Tabela 1 - Cepas probióticas e starter testadas e respectivos meios de cultivo e condições de incubação

Cepas	Código	Meio de Cultura		Condições de Incubação
		Multiplicação	Contagem	
Streptococcus (St.) thermophilus ^s				
St. thermophilus	ST-M6*	HJ ¹	M17+Lactose ⁴	37 °C - Aerobiose
St. thermophilus	TH-4*			
St. thermophilus	TA-40**			
Lactobacillus (Lb.) spp. ^p				
Lb. acidophilus	LA-5*	MRS ³	MRS+Maltose ⁵	37 °C - Aerobiose
Lb. fermentum	PCC*		MRS ⁶	
Lb. reuteri	RC-14*			
Lb. paracasei subsp. paracasei L. casei	431*			37 °C - Anaerobiose ^a
Lb. paracasei subsp. paracasei	F-19*			
Lb. rhamnosus	GR-1*			37 °C - Aerobiose
Lb. rhamnosus	LGG*			
Bifidobacterium (B.) spp. ^p				
B. animalis subsp. lactis	BB-12*	MRS Cisteína	MRS LP ⁷	37 °C - Anaerobiose ^a
B. longum	BB-46*	(0,05%) ²		
B. longum subsp. infantis	BB-02*			

*Christian Hansen; **Danisco; ^sStarter; ^pProbiótico; ¹Caldo Hoggs-Jago com glicose; ²Caldo MRS (Oxoid, Basingstoke, UK) com L-cisteína (0.05% p/v, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); ³Caldo MRS (Oxoid); ⁴M17 ágar com lactose (Oxoid); ⁵MRS ágar modificado com maltose; ⁶MRS ágar (Oxoid); ⁷MRS ágar (Oxoid) suplementado com propionato de sódio e cloreto de lítio (VINDEROLA; REINHEINMER, 1999); ^aAnaeroGen™ Anaerobic System (Oxoid); Fonte: adaptado de Albuquerque, M. et al. (2016)

3.3. Ensaio de fermentabilidade dos subprodutos de frutas e determinação da capacidade de cada cepa em produzir riboflavina a partir da fermentação dos subprodutos de fruta

Um ensaio *in vitro* foi realizado para determinar a capacidade das cepas probióticas e *starter* selecionadas a partir dos resultados obtidos no item 3.2 em fermentar os subprodutos de uva e caju em pó. O ensaio foi realizado de acordo com Buriti et al. (2014).

Anteriormente, alíquotas dos subprodutos foram tratadas por irradiação no Instituto de Pesquisa sobre Energia Nuclear (IPEN, São Paulo, SP – Brasil) com uma dose de 25kGy, dose esta previamente descrita como suficiente para eliminar uma parcela de microrganismos contaminantes dos subprodutos de fruta (ALBUQUERQUE, M. et al., 2016). Adicionalmente, foi semeado um controle sem inoculação de microrganismos, de maneira a confirmar se não houve contaminação subsequente no subproduto.

Um caldo MRS modificado com vermelho de fenol e sem fonte de carboidratos foi preparado e suplementado com 1% de farinha irradiada de subproduto de uva ou caju. Em seguida, 5 mL do caldo MRS modificado suplementado com os resíduos foi distribuído em tubos estéreis e inoculados com cada cepa individualmente em uma quantidade que variou entre 10^4 e 10^5 UFC/mL. Os meios inoculados foram incubados a 37 °C por 48h (VIEIRA, et al., 2016). A contagem se deu nos tempos de 0h, 24h e 48h, por técnica de *drop plate* em ágar MRS (Oxoid), para *Lactobacillus fermentum* PCC, e ágar M17 com lactose (Oxoid), para *Streptococcus thermophilus* ST-M6, TH-04 e TA-40. A fim de determinar a capacidade de cada cepa em produzir riboflavina a partir da fermentação dos resíduos de fruta utilizados, alíquotas de 500 µL foram retiradas nos tempos 0 e 24h e misturadas a 500 µL de ácido acético a 1% para extração da riboflavina, fervidas a 100 °C por 5 min, mantidas em banho de gelo por 5 minutos e fervidas a 100 °C. Posteriormente, foram centrifugadas (10.000 xg por 5 min) e o sobrenadante coletado e armazenado assepticamente em ultra freezer a pelo menos -65°C. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

3.4. Preparação do produto fermentado de soja tipo frozen yogurt

As culturas foram previamente ativadas em 12,5 mL de caldo HJ, para *St. thermophilus* (ST-M6, TA-40, TH-4) ou MRS para *Lb. fermentum* PCC e incubadas a 37°C por 24h. Após este período, os 12,5 mL de caldo MRS foram transferidos para

250 mL de um novo caldo MRS e o meio foi novamente incubado a 37°C por 24h. Em seguida, os inóculos foram centrifugados (10.000 g por 10 min) e lavados duas vezes com solução salina 0,85% (m/v) estéril.

A tabela 2 mostra a proporção dos ingredientes que foram utilizados na fabricação do produto de soja fermentado tipo *frozen yogurt* (FY). Para a preparação do produto de soja fermentado (usado como base para o FY), foi utilizado 1 litro de extrato de soja UHT (Pura Soja, Mais Vita, Yoki). Em seguida, esse extrato foi adicionado de 1% de subproduto de fruta, conforme estabelecido no item 3. 3. Após o processo de pasteurização (90°C por 5 minutos), as misturas foram resfriadas até 37°C. A mistura recebeu, então, a combinação da cepa *Lactobacillus fermentum* PCC com cada uma das cepas *starter* individualmente, sendo que cada alíquota foi correspondente a 4-5 log UFC/mL (ALBUQUERQUE et al., 2017). Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* obtidos para cada microrganismo foram adicionados à mistura. Estas foram incubadas a 37°C até que fosse atingido um pH de 4,6, indicando o término da fermentação. A tabela 2, adaptada de Gonçalves e Eberle (2008), mostra os ingredientes necessários para a preparação da calda do FY.

Tabela 2 - Formulação dos ingredientes utilizados para o preparo do produto de soja tipo *frozen yogurt*

Ingredientes	F SS (g)	F CS (g)
Açúcar	10	9
Farinha de subproduto	0	1
Liga neutra para sorvete ¹	2	2
Estabilizante/Emulsificante ²	4	4
Cultura <i>Starter</i> +Probiótica ³	3	3
Gordura Vegetal	1,5	1,5
Extrato de Soja	79,5	79,5

SS: Sem subproduto; CS: Com subproduto; 1: mistura de açúcar e goma guar (Marvi, Ourinhos, SP); 2: Marvi Gel Plus (Marvi);³ Inóculo preparado com a combinação das culturas em concentração de 4-5 log UFC/mL; Fonte: adaptado de Gonçalves e Eberle, 2008

Após atingirem o pH estabelecido, os frascos contendo o produto fermentado foram armazenados em câmara fria a 4°C por um período de 24h. Em seguida, foi preparado o FY, adicionando-se os demais ingredientes (a liga neutra e o estabilizante/emulsificante), seguido da mistura e armazenamento em câmara fria, a 4 °C, durante 20h para a maturação. A mistura foi, então, colocada na sorveteira GEL 9 (TELME - Codogno, Italia) para congelamento e aeração (*overrun*) até atingir a

consistência desejada. O produto foi acondicionado em potes plásticos específicos para alimentos e armazenado a -18 ± 2 °C. Amostras foram retiradas, em triplicata, para realizar os ensaios nos dias 1 (produto final) e 15, 30 e 60 de armazenamento (GONÇALVES; EBERLE, 2008; MATIAS et al., 2016).

3.5. Quantificação dos microrganismos probióticos e starter no produto

Para a contagem de microrganismos probiótico e *starter*, foi realizada uma diluição da amostra na proporção de 1:10, utilizando água peptonada 0,1% (m/v) como diluente. Essa diluição (10^{-1}) deu origem às demais diluições seriadas de onde foram retirados 10 µL para inocular através da técnica de semeadura *drop plate* (HERIGSTAD, et al., 2001) em meio MRS ágar (Oxoid) para *Lb. fermentum* PCC e ágar M17 com lactose para as cepas de *St. thermophilus*.

3.6. Quantificação de riboflavina

Para a extração das amostras com fim de quantificação de riboflavina, foram separados 5 mL (ou 5 g) de amostra que foram adicionados a 45 mL de solução HCl 0,1 N, prosseguindo para a esterilização em autoclave a 121 °C durante 30 minutos. Após resfriamento, a solução teve seu pH ajustado para 4,6, utilizando-se uma solução de acetato de sódio 2,5 mol/L, em seguida corrigindo o volume total da solução para 100 mL com água destilada. Foram adicionados, então, 50 mg de Diastase fúngica (Merck, GE), seguido de incubação por 2 horas a 42 °C. A amostra foi, em seguida, filtrada em filtro PVDE 0,45 µm para a remoção de impurezas. Um volume de 1,5 mL da solução original foi desidratado em concentrador SpeedVac e ressuspendido em 200 µL de água deionizada purificada. Uma alíquota dessa amostra foi, então, inserida no sistema de cromatografia Shimadzu, com bomba isocrática LC-20AT e coluna C18 de fase reversa Luna C18(Phenomenex) esférica 5 µm (250/4.6 mm), acoplado a um detector de fluorescência em comprimento de onda 450 nm_{ex}/530 nm_{em} (RF-10AXL). Os resultados foram obtidos com referência de uma curva padrão de riboflavina (16ng – 1µg) e foram corrigidos para diluição e concentração, de acordo com a equação 1.

$$C = \frac{R * \left(\frac{FD}{FC}\right) * 1000}{V}$$

Equação 1: Resultado da conversão fluorimétrica provida pelo aparelho, onde C é a concentração em µg/mL, R é o resultado obtido da leitura, FD é o fator resultante da diluição, FC é o fator resultante da concentração e V é o volume de injeção no aparelho em µL

3.7. *Composição centesimal*

Para os subprodutos de fruta e para o produto final, foram realizadas determinações da composição centesimal. O teor de carboidratos foi calculado por diferença para se obter 100% no total. As determinações do teor de umidade (a partir de 5 g de amostra, em estufa a vácuo a 70 °C), teor de cinzas (a partir de 2 g de amostra), de gordura (metodologia Bligh-Dyer) e de proteínas (através do método de Kjeldahl) foram realizadas segundo descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

3.8. *Análise estatística*

A partir de uma distribuição normal, a comparação de resultados entre os diferentes tratamentos para cada amostra foi realizada através de análise de variância (ANOVA), com utilização do teste de Tukey, considerando-se um nível de significância $p < 0,05$ (BOWER, 1998a, 1998b).

4. Resultados e Discussão

4.1. Triagem de Microrganismos Probióticos e Starter

A partir da incubação de cada uma das cepas testadas em meio RAM, foi avaliada a sobrevivência de cada microrganismo após 7 passagens no meio desprovido de riboflavina conforme apresentado na tabela 3.

Tabela 3 - Multiplicação das cepas *starter* e probióticas em RAM

Cepas	Multiplicação após 1 incubação	Multiplicação após 3 incubações	Multiplicação após 7 incubações
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	+	-	-
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> BB-02	+	-	-
<i>Bifidobacterium longum</i> BB-46	+	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5	+	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i> PCC	+	+	+
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> F-19	+	-	-
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> L. casei 431	+	-	-
<i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14	+	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1	+	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LGG	+	-	-
<i>Streptococcus thermophilus</i> ST-M6	+	+	+
<i>Streptococcus thermophilus</i> TA-40	+	+	+
<i>Streptococcus thermophilus</i> TH-04	+	+	+

+: Multiplicação observada; -: Multiplicação não observada

A multiplicação microbiana observada no caldo RAM indica que a cepa testada pode ser capaz de produzir riboflavina. Desta forma, de 13 microrganismos, apenas 4 apresentaram multiplicação em RAM após 7 passagens: *Streptococcus thermophilus* TA-40, *Streptococcus thermophilus* TH-04, *Streptococcus thermophilus* ST-M6 e *Lactobacillus fermentum* PCC. Portanto, estes microrganismos foram selecionados para avaliar sua capacidade de fermentar os subprodutos de caju e uva e de produzir riboflavina a partir desta fermentação.

Apesar de existirem estudos que trazem espécies e cepas de *Lactobacillus* (ARENA et al., 2014; FLOROU-PANERI et al., 2013; CAPOZZI et al., 2012; OGUNTOYINBO e NARBAD, 2015) e *Bifidobacterium* (THAKUR, THOMAR e DE, 2016) como produtoras de vitaminas, ainda há a necessidade de estudar cada cepa para definir as propriedades de produção e exportação da vitamina para o meio de cultivo (IBRAHIM et al., 2014).

4.2. Fermentabilidade dos Subprodutos

A figura 2 apresenta os resultados que correspondem ao crescimento das cepas de *Streptococcus thermophilus* (TA-40, TH-4 e ST-M6) e *Lactobacillus fermentum* PCC no tempo 0h e após 24h e 48h de fermentação do caldo MRS modificado suplementado com o resíduo de caju.

Figura 2 – Populações iniciais (0h) e após 24 e 48 horas de incubação das cepas de *Streptococcus thermophilus* (TA-40, TH-4 e ST-M6) e *Lactobacillus fermentum* PCC em caldo MRS modificado com vermelho de fenol suplementado em 1% (m/v) de subproduto de caju

Dentre as bactérias selecionadas, apenas as cepas TA-40 e TH-04 de *Streptococcus thermophilus* não apresentaram multiplicação após 24h de incubação. Esse fato indica que essas cepas não foram capazes de fermentar o subproduto de caju e entraram em fase de declínio populacional, ou então, que tiveram sua multiplicação inibida pelo resíduo. Em contrapartida, após 24h, as cepas *St.*

thermophilus ST-M6 e *Lb. fermentum* PCC foram capazes de fermentar o resíduo, alcançando, respectivamente, 4,82 log UFC/mL e 8,25 log UFC/mL. Após 48h, a cepa *St. thermophilus* ST-M6 apresentou um aumento significativo de sua população (para 7,71 log UFC/mL) ($p < 0,05$), enquanto que *Lb. fermentum* PCC não diferiu do valor obtido no tempo 24h ($p > 0,05$).

Na figura 3, são apresentados os resultados que correspondem à multiplicação das cepas de *Streptococcus thermophilus* (TA-40, TH-4 e ST-M6) e *Lactobacillus fermentum* PCC no tempo 0h e após 24h e 48h de fermentação do caldo MRS modificado suplementado com o subproduto de uva.

Figura 3 - Populações iniciais (0h) e após 24 e 48 horas de incubação das cepas de *Streptococcus thermophilus* (TA-40, TH-4 e ST-M6) e *Lactobacillus fermentum* PCC em caldo MRS modificado com vermelho de fenol suplementado em 1% (m/v) de subproduto de uva

Todos os microrganismos foram capazes de fermentar o subproduto de uva, atingindo contagens superiores (ou ligeiramente inferiores) a 7,0 log UFC/mL após 24h de fermentação. Apenas a cepa *St. thermophilus* TH-4 apresentou um declínio populacional no tempo 48h. Provavelmente, esta cepa utilizou o subproduto como fonte de energia, mas devido à sua capacidade limitada de utilização do subproduto, não foi capaz de aproveitar todos os nutrientes disponíveis no meio.

As mesmas cepas utilizadas neste trabalho foram testadas por Vieira et al. (2017). Os autores avaliaram a capacidade de cada microrganismo em fermentar

diferentes resíduos de fruta (maracujá, laranja, acerola e manga) e observaram que, assim como observado no presente trabalho, o tipo de subproduto pode influenciar na multiplicação dos microrganismos, devido às suas diferentes composições e propriedades físico-químicas que poderiam facilitar ou interferir no processo. Na pesquisa realizada por Albuquerque M. et al. (2016), foi possível observar que a partir da fermentação de subprodutos de fruta, as mesmas cepas podem produzir folatos (vitamina B9) e que, além de ser cepa-dependente, a produção é influenciada pelas condições de cultivo.

A tabela 5 mostra a variação da população de microrganismos ($\Delta_{24}\log \text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$) a partir da fermentação dos subprodutos de caju e uva no tempo 24h. Nela é possível observar que, embora não tenha ocorrido um crescimento significativamente maior que o controle sem o resíduo, ainda assim houve um crescimento consistente ao exibido pelas figuras 2 e 3.

O crescimento em 24h de PCC e TH-4 para o subproduto de uva e para todas as cepas no subproduto de caju se mostrou significativamente distinto da fermentação controle ($p < 0,05$), o que indica que apesar de haver o crescimento das bactérias, o resíduo não é aproveitado inteiramente como fonte de energia. Adicionalmente, no caso das cepas TH-4 e TA-40, quando da fermentação do resíduo de caju, pode inclusive inibir o seu crescimento. É possível entender, a partir dessa comparação, que o subproduto de uva foi mais bem aceito como fonte de energia para as cepas estudadas. Sendo assim, o subproduto de uva foi selecionado para a aplicação no produto de soja fermentado tipo *frozen yogurt* (FY).

Tabela 4 - Diferenças na variação de populações entre 0 e 24h na fermentação do subproduto

	$\Delta_{24}\log \text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$		
	Resíduo de Uva 1% p/v	Resíduo de Caju 1% p/v	Controle Negativo*
<i>Streptococcus thermophilus</i>			
ST-M6	$3,95 \pm 0,31^A$	$0,85 \pm 0,33^B$	$3,76 \pm 0,20^A$
TA-40	$2,77 \pm 0,41^A$	$-0,43 \pm 0,29^B$	$3,24 \pm 0,01^A$
TH-4	$3,36 \pm 0,26^B$	$-0,52 \pm 0,22^C$	$5,55 \pm 0,37^A$
<i>Lactobacillus fermentum</i>			
PCC	$3,24 \pm 0,14^B$	$2,48 \pm 0,22^C$	$3,77 \pm 0,04^A$

$\Delta_{24}\log \text{UFC}/\text{ml}$ – Diferença da população entre T=0h e T=24h ($T_{24} - T_0$); *Fermentação sem o resíduo de caju ou uva; ^{A,B}: Letras distintas para cada linha são significativamente diferentes ($p < 0,05$);

4.3. Características físico-químicas do FY

A tabela 5 mostra a evolução do pH e acidez do FY ao longo do armazenamento para as diferentes formulações.

Tabela 5 – Valores de pH e acidez ao longo de 60 dias de armazenamento a -18 ± 2 °C dos FY

D	F1		F2		F3	
	pH	Acidez*	pH	Acidez*	pH	Acidez*
1	4.70 $\pm$ 0.02	0.62 $\pm$ 0.03	4.71 $\pm$ 0.03	0.59 $\pm$ 0.03	4.69 $\pm$ 0.02	0.62 $\pm$ 0.03
15	4.64 $\pm$ 0.01	0.65 $\pm$ 0.01	4.66 $\pm$ 0.01	0.62 $\pm$ 0.02	4.65 $\pm$ 0.01	0.62 $\pm$ 0.02
30	4.58 $\pm$ 0.02	0.66 $\pm$ 0.01	4.60 $\pm$ 0.02	0.64 $\pm$ 0.02	4.57 $\pm$ 0.02	0.63 $\pm$ 0.02
60	4.45 $\pm$ 0.03	0.67 $\pm$ 0.01	4.48 $\pm$ 0.02	0.64 $\pm$ 0.02	4.48 $\pm$ 0.01	0.64 $\pm$ 0.04
	F4		F5		F6	
	pH	Acidez*	pH	Acidez*	pH	Acidez*
1	4.69 $\pm$ 0.01	0.66 $\pm$ 0.04	4.70 $\pm$ 0.02	0.62 $\pm$ 0.04	4.70 $\pm$ 0.02	0.61 $\pm$ 0.05
15	4.66 $\pm$ 0.03	0.69 $\pm$ 0.02	4.63 $\pm$ 0.02	0.64 $\pm$ 0.02	4.64 $\pm$ 0.02	0.62 $\pm$ 0.03
30	4.59 $\pm$ 0.02	0.68 $\pm$ 0.03	4.60 $\pm$ 0.02	0.67 $\pm$ 0.01	4.58 $\pm$ 0.03	0.67 $\pm$ 0.01
60	4.49 $\pm$ 0.01	0.69 $\pm$ 0.02	4.49 $\pm$ 0.01	0.68 $\pm$ 0.02	4.49 $\pm$ 0.02	0.68 $\pm$ 0.02

FY: Produto fermentado de soja tipo *frozen yogurt*; D: Dias em armazenamento; *: Acidez expressa em g de ácido láctico por 100 g; F1 e F4: Formulações com aplicação de *St. thermophilus* ST-M6 e *Lb. fermentum* PCC, sem (F1) e com (F4) subproduto de uva; F2 e F5: Formulações com aplicação de *St. thermophilus* TA-40 e *Lb. fermentum* PCC, sem (F2) e com (F5) subproduto de uva; F3 e F6: Formulações com aplicação de *St. thermophilus* TH-4 e *Lb. fermentum* PCC, sem (F3) e com (F6) subproduto de uva.

Não foram observadas mudanças significativas na acidez titulável das formulações de FY, mas estas se mantiveram dentro dos níveis aceitáveis para iogurte tanto no Brasil (MAPA, 2007) quanto internacionalmente (CXS-243, 2003). Ao longo do armazenamento, houve um decréscimo significativo ($p < 0,05$) esperado de pH, também observado em outros trabalhos que lidam com produtos fermentados.

A tabela 6 mostra a composição centesimal obtida para as formulações preparadas após a sua fermentação e congelamento.

A literatura traz que *frozen yogurts*, de forma geral, apresentam um teor lipídico reduzido, quando comparados a formulações de sorvete comum, onde a concentração de lipídeos chega a ser o dobro do que foi encontrado, variando de 11 a 13% por exemplo (USDA, 2019). O conteúdo de açúcar das formulações chega a ser menos que a metade da quantidade encontrada em uma porção de *frozen yogurt* tradicional variando entre 26 e 27% entre diferentes marcas, segundo a tabela de composição

da USDA (2019), o nível de proteínas se mantém aproximados tanto para *frozen yogurts* quanto para sorvetes, entre 3 e 4%.

Tabela 6 - Composição centesimal das formulações de FY

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Umidade(%)	77,86 ±0,22	80,82 ±0,09	80,29 ±0,11	79,68 ±0,02	79,44 ±0,34	80,61 ±0,12
Lipídeos(%)	5,74 ±0,25	4,33 ±0,32	5,23 ±0,79	4,81 ±0,88	3,33 ±0,20	6,38 ±0,27
Proteínas(%)	4,39 ±0,01	3,75 ±0,01	3,72 ±0,10	3,75 ±0,14	3,52 ±0,13	3,88 ±0,07
Carboidratos(%)	11,29 ±0,51	10,52 ±0,43	10,15 ±1,01	11,13 ±1,05	13,03 ±0,68	8,46 ±0,46
Cinzas(%)	0,727 ±0,031	0,580 ±0,005	0,605 ±0,012	0,631 ±0,001	0,675 ±0,009	0,666 ±0,005

FY: Produto fermentado de soja tipo *frozen yogurt*; Resultados apresentados como “média ± erro padrão da média”; F1 e F4: Formulações com aplicação de *St. thermophilus* ST-M6 e *Lb. fermentum* PCC, sem (F1) e com (F4) subproduto de uva; F2 e F5: Formulações com aplicação de *St. thermophilus* TA-40 e *Lb. fermentum* PCC, sem (F2) e com (F5) subproduto de uva; F3 e F6: Formulações com aplicação de *St. thermophilus* TH-4 e *Lb. fermentum* PCC, sem (F3) e com (F6) subproduto de uva.

4.4. Sobrevivência ao processamento e armazenamento

De maneira geral, os microrganismos foram capazes de sobreviver nas condições de armazenamento, sendo que a menor população encontrada ao longo de 60 dias foi de 7,06 log UFC na formulação que combina *St. thermophilus* ST-M6 e *Lb. fermentum* PCC sem a utilização do subproduto de uva (F1). A tabela 7 agrupa as observações de sobrevivência durante o período de armazenamento dos produtos.

Tabela 7 - Evolução das populações de microrganismos ao longo do armazenamento a -18±2 °C por até 60 dias

Combinação	log UFC/mL							
	SS				CS			
	1	15	30	60	1	15	30	60
PCC	9,37 ±0,26 ^A	7,06 ±0,11 ^D	8,13 ±0,07 ^{B,C}	8,34 ±0,31 ^B	9,15 ±0,14 ^A	7,88 ±0,51 ^C	8,38 ±0,04 ^B	8,32 ±0,11 ^{B,C}
ST-M6	12,04 ±0,63 ^A	7,75 ±0,14 ^E	8,38 ±0,1 ^D	9,39 ±0,12 ^C	10,87 ±0,42 ^B	7,75 ±0,42 ^{D,E}	8,38 ±0,08 ^D	8,31 ±0,07 ^{D,E}
PCC	9,26 ±0,16 ^A	7,87 ±0,14 ^{C,D}	8,07 ±0,11 ^{B,C}	8,01 ±0,14 ^{B,C}	9,66 ±0,57 ^A	7,47 ±0,31 ^D	8,26 ±0,13 ^{B,C}	8,35 ±0,03 ^B
TA-40	9,60 ±0,46 ^A	8,39 ±0,28 ^C	8,43 ±0,13 ^C	8,14 ±0,14 ^{C,D}	9,17 ±0,13 ^B	7,46 ±0,05 ^E	7,78 ±0,22 ^{D,E}	8,02 ±0,09 ^{C,D}
PCC	8,24 ±0,17 ^{B,C}	8,43 ±0,42 ^C	7,96 ±0,15 ^C	8,01 ±0,05 ^C	8,99 ±0,21 ^A	7,11 ±0,06 ^D	8,40 ±0,07 ^B	8,32 ±0,06 ^{B,C}
TH-04	8,20 ±0,43 ^B	8,64 ±0,24 ^B	7,56 ±0,15 ^D	8,28 ±0,05 ^{B,C}	9,03 ±0,16 ^A	7,47 ±0,22 ^D	8,15 ±0,17 ^C	7,97 ±0,06 ^C

SS: Sem subproduto de uva; CS: Com subproduto de uva; ^{A,B}: Médias marcadas com letras distintas para cada linha são significativamente diferentes (p < 0,05)

Entre as populações observadas, excluindo a combinação de PCC e TH-04 sem a aplicação do subproduto, foi observado um declínio da viabilidade dos microrganismos, mostrando um choque inicial ao armazenamento congelado.

Entretanto, houve uma recuperação parcial desses microrganismos nos períodos de armazenamento subsequentes, em 30 e 60 dias. Essas observações são melhor visualizadas na tabela 8, que agrupa as variações nas populações de microrganismos após os diferentes períodos de armazenamento em relação ao inóculo inicial ($t=0$), antes do processo de fermentação.

Tabela 8 - Variações das populações no produto ao longo do armazenamento a -18 ± 2 °C por até 60 dias em relação ao inóculo inicial ($t = 0$)

Combinação	$\Delta \log \text{UFC/mL}$							
	SS				CS			
	1	15	30	60	1	15	30	60
PCC	$3,08 \pm 0,26^A$	$0,77 \pm 0,11^D$	$1,84 \pm 0,07^{B,C}$	$2,05 \pm 0,31^B$	$2,86 \pm 0,14^A$	$1,59 \pm 0,51^C$	$2,09 \pm 0,04^B$	$2,03 \pm 0,11^{B,C}$
ST-M6	$5,21 \pm 0,63^A$	$0,91 \pm 0,14^E$	$1,54 \pm 0,1^D$	$2,56 \pm 0,12^C$	$4,04 \pm 0,42^B$	$1,41 \pm 0,42^{D,E}$	$1,55 \pm 0,08^D$	$1,48 \pm 0,07^{D,E}$
PCC	$3,39 \pm 0,16^A$	$2,00 \pm 0,14^{C,D}$	$2,20 \pm 0,11^{B,C}$	$2,14 \pm 0,14^{B,C}$	$3,79 \pm 0,57^A$	$1,60 \pm 0,31^D$	$2,39 \pm 0,13^{B,C}$	$2,48 \pm 0,03^B$
TA-40	$3,88 \pm 0,46^A$	$2,67 \pm 0,28^C$	$2,71 \pm 0,13^C$	$2,42 \pm 0,14^{C,D}$	$3,45 \pm 0,13^B$	$1,75 \pm 0,05^E$	$2,06 \pm 0,22^{D,E}$	$2,30 \pm 0,09^{C,D}$
PCC	$2,33 \pm 0,17^{B,C}$	$2,52 \pm 0,42^C$	$2,05 \pm 0,15^C$	$2,10 \pm 0,05^C$	$3,09 \pm 0,21^A$	$1,20 \pm 0,06^D$	$2,49 \pm 0,07^B$	$2,41 \pm 0,06^{B,C}$
TH-04	$2,33 \pm 0,43^B$	$2,77 \pm 0,24^B$	$1,70 \pm 0,15^D$	$2,41 \pm 0,05^{B,C}$	$3,17 \pm 0,16^A$	$1,60 \pm 0,22^D$	$2,29 \pm 0,17^C$	$2,10 \pm 0,06^C$

SS: Sem subproduto de uva; CS: Com subproduto de uva; ^{A,B}: Médias marcadas com letras distintas para cada linha são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Levando em consideração essa variação nas populações de microrganismos, constatou-se, portanto, que a viabilidade dos microrganismos não diminuiu, quando comparada ao inóculo inicial de fermentação, mostrando, ainda, a recuperação ao longo do armazenamento dos produtos. O processo de congelamento e subsequente armazenamento a frio leva em consideração a velocidade do congelamento, afetando a formação dos cristais de gelo. Assim sendo, um congelamento mais rápido em temperaturas mais baixas causa a formação de cristais menores e que promovem menos danos a estruturas celulares (FELLOWS, 2006). As bactérias, por sua vez, apresentam mecanismos para lidar com temperaturas mais baixas. Adicionalmente, cada cepa se comporta de maneira distinta frente ao frio, podendo envolver mecanismos de hibernação, quiescência, mudanças na membrana, acumulação de polióis e produção de proteínas “cold-shock” (WALKER, et al., 2006). No presente trabalho, os microrganismos estudados foram capazes de sobreviver ao estresse do congelamento e armazenamento congelado.

Condições similares ao experimento foram observadas e descritas no trabalho publicado por Davidson et al. (2000) com *frozen yogurt*. Os autores observaram que

as cepas de *St. thermophilus* e de *Lb. bulgaricus* também apresentaram um decréscimo em sua população nos primeiros dias de armazenamento, seguido por uma recuperação e estabilidade ao longo de 11 semanas de armazenamento a -20 °C.

Wang, et al. (2019) estudaram a aplicação de crioprotetores, como trehalose, glicerol e leite desnatado, para melhorar a sobrevivência de *Lb. plantarum* e *Lb. casei* no armazenamento em congelamento. Os autores constataram que os crioprotetores testados poderiam ser aplicados nesse caso, para impedir o decréscimo da população no armazenamento em curto prazo consequente ao congelamento e descongelamento de produtos como sorvetes ou produtos congelados, mas principalmente no próprio armazenamento de culturas puras.

O trabalho de Terpou et al. (2019), com *frozen yogurt* probiótico, mostrou que a imobilização celular também é uma alternativa para perdas durante o armazenamento, indicando uma sobrevivência de 97% ao longo de 90 dias, com cerca de 3 log UFC/g para *Lb. bulgaricus* (não imobilizado) e mais que 9 log UFC/g para a cepa de *Lb. casei* (imobilizado), quando comparado nas mesmas condições de armazenamento em uma formulação onde não houve o processo de imobilização, preservando a viabilidade no produto em cerca de 7 log UFC/g para *Lb. casei* e 3 log UFC/g para *Lb. bulgaricus*. Ao contrário do que foi observado no presente trabalho, os autores não observaram recuperação das populações não imobilizadas. Ainda assim houve um decréscimo após as primeiras duas semanas de armazenamento para as cepas não imobilizadas, segundo os autores.

Dessa maneira, a aplicação de todos os microrganismos testados se mostrou efetiva na fabricação de produto tipo *frozen yogurt* probiótico de soja, alcançando populações desejáveis e mantendo um nível populacional adequado durante o período de armazenamento estudado.

4.5. Quantificação da riboflavina

A quantificação da riboflavina por HPLC é uma metodologia que traz resultados confiáveis, com alta sensibilidade e precisão. Apesar disso, existe uma variação observável entre as amostras no período observado, mas sem ligação significativa com a população de microrganismos. A figura 4 mostra a diferença entre as concentrações de riboflavina presentes nos produtos fabricados, a comparação entre os resultados se dá entre as formulações sem resíduo e as com resíduo, para a mesma combinação de microrganismos.

Figura 4 - Concentração da riboflavina ao longo do armazenamento dos produtos a -18 ± 2 °C por até 60 dias

F1 e F4: Formulações com aplicação de *St. thermophilus* ST-M6 e *Lb. fermentum* PCC, sem (F1) e com (F4) subproduto de uva; F2 e F5: Formulações com aplicação de *St. thermophilus* TA-40 e *Lb. fermentum* PCC, sem (F2) e com (F5) subproduto de uva; F3 e F6: Formulações com aplicação de *St. thermophilus* TH-4 e *Lb. fermentum* PCC, sem (F3) e com (F6) subproduto de uva.

Conforme poderá ser constatado na figura 4, o aumento de riboflavina na formulação F4, quando comparados com a quantidade presente na formulação de contrapartida F1, ou seja, sem subproduto de uva, mostram que a presença do subproduto ocasionou um impacto positivo significativo ($p < 0,05$) na produção da riboflavina pela co-cultura analisada. Entretanto, as outras combinações produziram mais, durante 60 dias, nas formulações sem resíduo ($p < 0,05$), mostrando como é importante a associação correta de microrganismos para o melhor aproveitamento do subproduto.

É possível observar as diferenças que existem entre cepas do mesmo grupo de microrganismos, onde a co-cultura é responsável pela produção da riboflavina. Ainda que não seja possível mostrar o papel de cada microrganismo na produção da vitamina, existe uma tendência de ambos trabalharem em protocooperação, como também foi descrito por Albuquerque et al. (2017). Os autores observaram que a produção de folato pela co-cultura de *St. thermophilus* TH-4 e *Lb. rhamnosus* LGG foi

de até 1800 ng/mL de folatos, enquanto a produção das cepas individualmente, para esses mesmos microrganismos foi entre 1100-1300 ng/mL para TH-4 e entre 100-400 ng/mL para LGG. Hugenschmidt, et al. (2011), trabalhando com cepas de *Lb. plantarum* e *Propionibacterium freudenreichii* em co-cultura, conseguiram produção de 800 ng/mL de folatos e 620 ng/mL de vitamina B12, entretanto testes para a quantificação individualizada para cada cepa não foram realizados.

As maiores concentrações de riboflavina foram as encontradas nas formulações 2 e 3 (sem subproduto e, respectivamente, com *St. thermophilus* TA-40 e com TH-4, ambas em co-cultura com *Lb. fermentum* PCC) no dia 60 do armazenamento, com 8,4 e 8,0 µg/mL, respectivamente ($p < 0,05$). Por outro lado, a formulação 1 (sem subproduto e com *St. thermophilus* ST-M6, também em co-cultura com *Lb. fermentum* PCC) revelou a menor concentração de riboflavina, atingindo apenas 2,3 e 2,8 µg/mL em 15 e 30 dias de armazenamento, respectivamente ($p < 0,05$).

No estudo descrito por Pacheco da Silva et al. (2016), para cepas produtoras de riboflavina isoladas de queijo de cabra, onde há abundância da vitamina no meio, a produção ficou reduzida, entre apenas 100-400 ng/mL de riboflavina. Por outro lado, no presente trabalho, para a produção pela co-cultura no FY de soja, onde há uma carência de riboflavina, foi possível conseguir produção de valores elevados da vitamina – de 2 a 8 µg/mL. É importante ressaltar que os valores obtidos são comparáveis àqueles relatados para produções induzidas pela seleção de mutantes superprodutores pela incubação com roseoflavina, um análogo tóxico da vitamina B2 (RUSSO, et al., 2014; JUAREZ DEL VALLE, et al., 2014). Isso é indicativo de que a co-cultura pode estimular a expressão desses mutantes naturais em ambientes onde há ausência ou quantidades reduzidas da vitamina.

Trabalhos envolvendo outras vitaminas também descrevem a importância de co-culturas adequadas (ALBUQUERQUE, M. et al., 2016; HUGENSCHMIDT, et al., 2016; SURVASE, et al., 2015). A presença ou ausência do resíduo de fruta na fermentação do produto mostra que há uma importância da qualidade da co-cultura utilizada. Para o aproveitamento dessa matéria-prima, certas co-culturas aproveitam o resíduo de fruta de maneira distinta, trazendo benefícios diferentes para a sua aplicação.

Associando esses resultados de quantificação aos resultados obtidos da sobrevivência ao processamento, temos que a tendência de decréscimo e

recuperação também é observada na produção da vitamina na F1, provavelmente ligado à própria recuperação das bactérias durante o armazenamento. Por atuar no mecanismo energético, a presença da riboflavina é essencial para o processo de recuperação após o armazenamento.

Ainda que não exista a influência na produção da vitamina em todos os ensaios, a presença do subproduto de uva faz com que os microrganismos mantenham melhor sua população e recuperação ao longo do armazenamento, proporcionando outra fonte de substrato. Ainda assim, o potencial prebiótico do subproduto de uva não foi explorado nesses ensaios. De fato, esse tipo de caracterização envolveria diversos testes que caracterizam o produto como prebiótico e, para essa definição, ensaios *in vivo* seriam necessários para a verificação de benefícios à saúde (ROBERFROID, et al., 2007, GIBSON, et al., 2017).

De acordo com os resultados obtidos, a quantidade de riboflavina presente em uma porção (120 mL ou aproximadamente 80 g) de produto de soja tipo *frozen yogurt* alcançaria entre 200-1000 µg da vitamina e poderia suprir entre 26 e 80% da necessidade diária de um indivíduo saudável, que varia entre 1,4 mg para homens e 1,2 mg para mulheres (BALL, 2004). Entretanto, é importante ressaltar que, apesar da riboflavina ser absorvida prontamente pelo organismo (THAKUR, THOMAR e DE, 2015), assim como a maior parte das substâncias ingeridas oralmente, uma certa perda pode ser esperada.

5. Conclusão

As cepas de *Streptococcus thermophilus* (ST-M6, TA-40 e TH-4) e a cepa de *Lactobacillus fermentum* PCC apresentaram capacidade de produção de riboflavina em RAM. Entre os subprodutos estudados, o subproduto de uva se mostrou mais capaz de estimular a multiplicação das cepas testadas, em relação ao subproduto de caju, que não estimulou a multiplicação para as cepas TH-4 e TA-40.

As combinações de cepa *starter* (ST-M6, TA-40 e TH-4) com a cepa probiótica PCC no produto de soja tipo *frozen yogurt* (FY), com ou sem subproduto de uva, apresentaram sobrevivência expressiva no armazenamento, atingindo cerca de 8,4-8,5 log UFC/mL ao final do período de 60 dias de armazenamento sob congelamento, tanto para a cepa PCC como para as cepas *starter*.

As formulações de FY foram capazes de atingir concentrações de riboflavina de 8,40 e de 5,18 µg/mL (combinando TA-40 e PCC) em 60 dias, respectivamente sem e com o subproduto de uva. Já a associação de ST-M6 e PCC com o subproduto resultou atingiu 5,62 µg/mL, aproximadamente o dobro da concentração se comparada com a formulação sem subproduto (2,30 µg/mL). A aplicação do subproduto de uva para estimular a produção de riboflavina só foi efetiva, portanto, para a formulação que combinou *St. thermophilus* ST-M6 e *Lb. fermentum* PCC.

Referências Bibliográficas ¹

- ABREU, F. P. de; DORNIER, M.; DIONISIO, A. P.; CARAIL, M.; CARIS-VEYRAT, C.; DHUIQUE-MAYER, C. Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from by-product of juice processing: A focus on carotenoids. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 25–31, 2013
- AGUEDO, M.; KOHNEN, S.; RABETAFIKA, N.; VANDEN BOSSCHE, S.; STERCKX, J.; BLECKER, C.; BEAUVE, C.; PAQUOT, M. Composition of by-products from cooked fruit processing and potential use in food products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 27, n. 1, p. 61–69, 2012.
- AKUBOR, P. I. Chemical composition, functional and pasting properties of cashew pomace and wheat flours. **International Journal of Agricultural and Veterinary Sciences**, v. 2, n. 1, p. 28–37, 18 mar. 2016.
- ALBUQUERQUE, M. A. C. de; BEDANI, R.; VIEIRA, A. D. S.; LEBLANC, J. G.; SAAD, S. M. I. Supplementation with fruit and okara soybean by-products and amaranth flour increases the folate production by starter and probiotic cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 236, p. 26–32, 2016
- ALBUQUERQUE, M. A. C.; BEDANI, R.; LEBLANC, J. G.; SAAD, S. M. I. Passion fruit by-product and fructooligosaccharides stimulate the growth and folate production by starter and probiotic cultures in fermented soymilk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 261, n. August, p. 35–41, 2017
- ALBUQUERQUE, T. G.; SANTOS, F.; SANCHES-SILVA, A.; BEATRIZ OLIVEIRA, M.; BENTO, A. C.; COSTA, H. S. Nutritional and phytochemical composition of *Annona cherimola* Mill. fruits and by-products: Potential health benefits. **Food Chemistry**, v. 193, p. 187–195, 2016
- ANGMO, K.; KUMARI, A. S.; BHALLA, T. C. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 428–435, 2016

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360 de 23 de dezembro de 2003, **Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados**, 2003. Disponível em http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0360_23_12_2003.pdf/5d4fc713-9c66-4512-b3c1-afee57e7d9bc

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RES nº 18, de 30 de abril de 1999, **Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos**, 1999^a. Disponível em http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RES_18_1999_COMP.pdf/dd30fd35-e7ea-4f8d-be72-ae2e439191b0

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RES nº 19, de 30 de abril de 1999, **Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem**, 1999b. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RES_19_1999_COMP.pdf/311b03f5-c2f5-4b97-89a8-30331f8145f3

ARENA, M. P.; FIOCCO, F.; MASSA, S.; CAPOZZI, V.; RUSSO, P.; SPANO, G. *Lactobacillus plantarum* as a Strategy for an In situ Production of Vitamin B2. **Journal of Food & Nutritional Disorders**, v. s1, n. 01, p. 1–5, 2014

ARENA, M. P.; RUSSO, P.; CAPOZZI, V.; LÓPEZ, P.; FIOCCO, D.; SPANO, G. Probiotic abilities of riboflavin-overproducing *Lactobacillus* strains: a novel promising application of probiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 17, p. 7569–7581, 2014

AZEVÊDO, J. C. S. de; FUJITA, A.; DE OLIVEIRA, E. L.; GENOVESE, M. I.; CORREIA, R. T. P. Dried camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. McVaugh) industrial residue: A bioactive-rich Amazonian powder with functional attributes. **Food Research International**, v. 62, p. 934–940, 2014

- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006
- BALL, G. . F. M. **Vitamins: Their Role in the Human Body**. Blackwell Publishing Ltd, 2004
- BALL, G. **Bioavailability and analysis of vitamins in foods**. 1st. ed. London: Chapman & Hall, 1998
- BARROS, N. V. dos A.; COSTA, N. Q.; PORTO, R. G. C. L.; MORGANO, M. An.; ARAÚJO, M. A. da M.; MOREIRA-ARAÚJO, R. S. dos R. Elaboration of hamburger enriched with cashew fibers (*Anacardium occidentale* L.). **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 315–325, 2012
- BERES, C.; COSTA, G. N. S.; CABEZUDO, I.; DA SILVA-JAMES, N. K.; TELES, A. S. C.; CRUZ, A. P. G.; MELLINGER-SILVA, C.; TONON, R. V; CABRAL, L. M. C.; FREITAS, S. P. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. **Waste Management**, v. 68, p. 581–594, 2017
- BIANCHINI-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M. V. C. Vitamina B2. In: PENTEADO, M. DE V. C. (Ed.). **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. Barueri: Manole, p. 279–316, 2003
- BOBBIO, F.; BOBBIO, P. (ed.). **Introdução à química de alimentos**. 2. ed. 1989
- BOWER, J. A. Statistics for food science V: ANOVA and multiple comparisons (Part B). **Nutrition & Food Science**, v. 98, n. 1, p. 41–48, fev. 1998a
- BOWER, J. A. Statistics for food science - V part C: non-parametric ANOVA. **Nutrition & Food Science**, v. 98, n. 2, p. 102–108, 1998b
- BURGESS, C. M.; SMID, E. J.; VAN SINDEREN, D. Bacterial vitamin B2, B11 and B12 overproduction: An overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, n. 1–2, p. 1–7, 2009

- BURITI, F. C. A.; FREITAS, S. C.; EGITO, A. Ô. S.; DOS SANTOS, K. M. O. Effects of tropical fruit pulps and partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds on the dietary fibre content, probiotic viability, texture and sensory features of goat dairy beverages. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 196–203, 2014.
- BUSTAMANTE, M. A.; MORAL, R.; PAREDES, C.; PÉREZ-ESPINOSA, A.; MORENO-CASELLES, J.; PÉREZ-MURCIA, M. D. Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. **Waste management (New York, N.Y.)**, v. 28, n. 2, p. 372–80, jan. 2008
- CAPOZZI, V.; RUSSO, P.; DUEÑAS, M. T.; LÓPEZ, P.; SPANO, G. Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 6, p. 1383–1394, 2012
- CARRIZO, S. L.; MONTES DE OCA, C. E.; LAIÑO, J. E.; SUAREZ, N. E.; VIGNOLO, G.; LEBLANC, J. G.; ROLLÁN, G. Ancestral Andean grain quinoa as source of lactic acid bacteria capable to degrade phytate and produce B-group vitamins. **Food Research International**, v. 89, p. 488–494, 2016
- COOPERMAN, J. M.; LOPEZ, R. Riboflavin. In: MACHLIN, L. J. (Ed.). **Handbook of Vitamins**. 2. ed. New York: M. Dekker, p. 299–328, 1991
- CXS243-2003. **STANDARD FOR FERMENTED MILKS**. Disponível em: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX%2BSTAN%2B243-2003%252FCXS_243e.pdf.
- DAVIDSON, R. H.; DUNCAN, S. E.; HACKNEY, C. R.; EIGEL, W. N.; BOLING, J. W. Probiotic Culture Survival and Implications in Fermented Frozen Yogurt Characteristics. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 4, p. 666–673, 2000.

- DEVESA-REY, R.; VECINO, X.; VARELA-ALENDE, J. L.; BARRAL, M. T.; CRUZ, J. M.; MOLDES, A. B. Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. **Waste Management**, v. 31, n. 11, p. 2327–2335, nov. 2011.
- FELLOWS, P. J. (ed.). **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e práticas**. 2. ed. artmed, 2006.
- FLOROU-PANERI, P.; CHRISTAKI, E.; BONOS, E. Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients. In: KONGO, M. (Ed.). **Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes**. InTech, p. 589–614, 2013
- GIBSON, G. R.; HUTKINS, R.; SANDERS, M. E.; PRESCOTT, S. L.; REIMER, R. A.; SALMINEN, S. J.; SCOTT, K.; STANTON, C.; SWANSON, K. S.; CANI, P. D.; VERBEKE, K.; REID, G. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491–502, 2017
- GONÇALVES, A. A.; EBERLE, I. R. Frozen Yogurt Com Bactérias Probióticas. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 3, p. 291–297, 2008
- GURAK, P. D.; DE BONA, G. S.; TESSARO, I. C.; MARCZAK, L. D. F. Jaboticaba pomace powder obtained as a co-product of juice extraction: A comparative study of powder obtained from peel and whole fruit. **Food Research International**, v. 62, p. 786–792, 2014
- GURU, V., VISWANATHAN, K. Riboflavin Production in Milk Whey Using Probiotic Bacteria- *Lactobacillus acidophilus*. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**, v. 3, n. 4, p. 169–176, 2013
- HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, n. 2, p. 121–129, 2001
- HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document: The International Scientific

Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014

HUGENSCHMIDT, S.; SCHWENNINGER, S. M.; LACROIX, C. Concurrent high production of natural folate and vitamin B12 using a co-culture process with *Lactobacillus plantarum* SM39 and *Propionibacterium freudenreichii* DF13. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1063–1070, 2011

IBRAHIM, G. A.; EL-SHAFAEI, K.; EL-SAYED, H. S.; SHARAF, O. M. Isolation, Identification and Selection of Lactic Acid Bacterial Cultures for Production of Riboflavin and Folate. **Middle East Journal of Applied Sciences**, v. 4, n. 4, p. 924–930, 2014

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-químicos para análise de alimentos**. 4^a ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

IORA, S. R. F.; MACIEL, G. M.; ZIELINSKI, A. A. F.; DA SILVA, M. V.; PONTES, P. V. de A.; HAMINIUK, C. W. I.; GRANATO, D. Evaluation of the bioactive compounds and the antioxidant capacity of grape pomace. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 1, p. 62–69, 2015

JUAREZ DEL VALLE, M.; LAIÑO, J. E.; DE MORENO DE LEBLANC, A.; SAVOY DE GIORI, G.; LEBLANC, J. G. Soyamilk fermented with riboflavin-producing *Lactobacillus plantarum* CRL 2130 reverts and prevents ariboflavinosis in murine models. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 07, p. 1229–1235, 2016

LEBLANC, J. G.; LAIÑO, J. E.; DEL VALLE, M. J.; VANNINI, V.; VAN SINDEREN, D.; TARANTO, M. P.; DE VALDEZ, G. F.; DE GIORI, G. S.; SESMA, F. B-Group vitamin production by lactic acid bacteria - current knowledge and potential applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 6, p. 1297–1309, 2011

LEBLANC, J. G.; MILANI, C.; DE GIORI, G. S.; SESMA, F.; VAN SINDEREN, D.; VENTURA, M. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 160–168, 2013

- LEE, E.-S.; CORFE, B. M.; POWERS, H. J. Riboflavin depletion of intestinal cells in vitro leads to impaired energy generation and enhanced oxidative stress. **European Journal of Nutrition**, v. 52, n. 5, p. 1513–1521, 6 ago. 2013.
- LIMA, F. C. dos S.; SILVA, F. L. H. da; GOMES, J. P.; NETO, J. M. da S. Chemical Composition of the Cashew Apple Bagasse and Potential Use for Ethanol Production. **Advances in Chemical Engineering and Science**, v. 02, n. 04, p. 519–523, 2012.
- LOPEZ, M. C.; MEDINA, L. M.; JORDANO, R. Survival of Lactic Acid Bacteria in Commercial Frozen Yogurt. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 4, p. 706–708, 2006
- MAGNÚSDÓTTIR, S.; RAVCHEEV, D.; DE CRÉCY-LAGARD, V.; THIELE, I. Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests cooperation among gut microbes. **Frontiers in Genetics**, v. 6, 2015.
- MAPA, Ministério da Agricultura e Pecuária, Instrução Normativa nº46. 2007, **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**, p. DOU de 24/10/2007 (nº 205, Seção 1, pág. 4).
- MATIAS, N. S.; PADILHA, M.; BEDANI, R.; SAAD, S. M. I. In vitro gastrointestinal resistance of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 in soy and/or milk-based synbiotic apple ice creams. **International Journal of Food Microbiology**, v. 234, p. 83–93, 2016
- OGUNTOYINBO, F. A.; NARBAD, A. Multifunctional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from fermented cereal foods. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 621–631, 2015
- PACHECO DA SILVA, F. F.; BISCOLA, V.; LEBLANC, J. G.; FRANCO, B. D. G. de M. Effect of indigenous lactic acid bacteria isolated from goat milk and cheeses on folate and riboflavin content of fermented goat milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 155–161, 2016
- PINHO, L. X.; AFONSO, M. R. A.; CARIOCA, J. O. B.; COSTA, J. M. C. da; RAMOS, A. M. The use of cashew apple residue as source of fiber in low fat hamburgers. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 4, p. 941–945, 2011.

- RIVERA, Ó. M. P.; TORRADO, A. M.; MOLDES, A. B.; DOMÍNGUEZ, J. M. Minerals and Organic Nitrogen Present in Grape Marc Hydrolyzates Enhance Xylose Consumption by *Lactobacillus pentosus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, n. 2, p. 262–274, 26 fev. 2009.
- ROBERFROID, M. Prebiotics: the concept revisited. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3 Suppl 2, p. 830S–7S, 2007
- RUSSO, P.; CAPOZZI, V.; ARENA, M. P.; SPADACCINO, G.; DUEÑAS, M. T.; LÓPEZ, P.; FIOCCO, D.; SPANO, G. Riboflavin-overproducing strains of *Lactobacillus fermentum* for riboflavin-enriched bread. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 8, p. 3691–3700, 2014.
- SALMINEN, S.; WRIGHT, A. von (ed.). **Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects, Third Edition**. 3rd. ed, 2004
- SANTOS, R. P.; SANTIAGO, A. A. X.; GADELHA, C. A. A.; CAJAZEIRAS, J. B.; CAVADA, B. S.; MARTINS, J. L.; OLIVEIRA, T. M.; BEZERRA, G. A.; SANTOS, R. P.; FREIRE, V. N. Production and characterization of the cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse ashes. **Journal of Food Engineering**, v. 79, n. 4, p. 1432–1437, 2007
- SCHWEIGGERT, R. M.; VARGAS, E.; CONRAD, J.; HEMPEL, J.; GRAS, C. C.; ZIEGLER, J. U.; MAYER, A.; JIMÉNEZ, V.; ESQUIVEL, P.; CARLE, R. Carotenoids, carotenoid esters, and anthocyanins of yellow-, orange-, and red-peeled cashew apples (*Anacardium occidentale* L.). **Food Chemistry**, v. 200, p. 274–282, 2016
- SOUZA, A. C. S. de; FERREIRA, C. V.; JUCÁ, M. B.; AOYAMA, H.; CAVAGIS, A. D. M.; PEPPELENBOSCH, M. P. Riboflavina: uma vitamina multifuncional. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 887–891, 2005
- STAHMANN, K.-P.; REVUELTA, J. L.; SEULBERGER, H. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 509–516, 2000

- SURVASE, A. S.; BAJAJ, B. I.; SINGHAL, S. R. Biotechnological Production of Vitamins Biotechnological Production of Vitamins. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. October, p. 381–396, 2015.
- TAMIME, A. Y.; THOMAS, L. V. (ed.). **Probiotic Dairy Products**. Second Edition. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017.
- TERPOU, A.; PAPADAKI, A.; BOSNEA, L.; KANELAKI, M.; KOPSAHELIS, N. Novel frozen yogurt production fortified with sea buckthorn berries and probiotics. **LWT**, v. 105, p. 242–249, 2019
- THAKUR, K.; TOMAR, S. K.; DE, S. Lactic acid bacteria as a cell factory for riboflavin production. **Microbial Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 441–451, 2016
- USDA Food Composition Databases**. Disponível em: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>.
- VIEIRA, A. D. S.; BEDANI, R.; ALBUQUERQUE, M. A. C.; BISCOLA, V.; SAAD, S. M. I. The impact of fruit and soybean by-products and amaranth on the growth of probiotic and starter microorganisms. **Food Research International**, v. 97, p. 356–363, 2017
- VINDEROLA, C. .; REINHEIMER, J. . Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yogurt bacteria. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 8, p. 497–505, 1999
- WALKER, V. K.; PALMER, G. R.; VOORDOUW, G. Freeze-Thaw Tolerance and Clues to the Winter Survival of a Soil Community. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1784–1792. 2006
- WANG, G.; YU, X.; LU, Z.; YANG, Y.; XIA, Y.; LAI, P. F.-H.; AI, L. Optimal combination of multiple cryoprotectants and freezing-thawing conditions for high lactobacilli survival rate during freezing and frozen storage. **LWT**, v. 99, p. 217–223, 2019
- YONG, Y. C.; CAI, Z.; YU, Y. Y.; CHEN, P.; JIANG, R.; CAO, B.; SUN, J. Z.; WANG, J. Y.; SONG, H. Increase of riboflavin biosynthesis underlies enhancement of extracellular electron transfer of *Shewanella* in alkaline microbial fuel cells. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 763–768, 2013

ANEXOS

ANEXO A – Currículo Lattes

Curriculo do Sistema de Currículos Lattes (Luiz Henrique Groto Garutti)

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizaev.do?id=K4324625E7>

Luiz Henrique Groto Garutti

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/3123971392785992>

Última atualização do currículo em 19/04/2019

Possui graduação em Farmácia pela Universidade Federal do Amazonas (2016). Possui atuação em pesquisas realizadas em Manaus - Amazonas, na linha de Desenvolvimento de produtos fermentados utilizando a microbiota, enzimas e vegetais da biodiversidade amazônica e Desenvolvimento de produtos a partir de matéria-prima Amazônica. Atualmente faz mestrado em Ciência dos Alimentos, sob orientação da prof.^a Dr.^a Susana Marta Isay Saad, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome Luiz Henrique Groto Garutti
Nome em citações bibliográficas GARUTTI, L. H. G.

Endereço

Endereço Profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Cidade Universitária Butantã, 05508900 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30913121

Formação acadêmica/titulação

2017 Mestrado em andamento em Ciências dos Alimentos (Conceito CAPES 7).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Orientador: 🧐 Susana Marta Isay Saad.
Coorientador: Jean Guy Joseph LeBlanc.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
Grande área: Ciências Agrárias
2011 - 2016 Graduação em Farmácia.
Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Brasil.
Título: TCC: Aproveitamento da placenta do fruto do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) como fonte de pectina para uso industrial.
Orientador: Dra Maria de Aguiar Oliveira.
2008 - 2010 Curso técnico/profissionalizante.
Colégio Prof. Luiz Martinez, CPLM, Brasil

Formação Complementar

2016 - 2016 Oficina de Atualização nas Ações de Controle da Tuberculose. (Carga horária: 4h).
Secretaria Municipal de Saúde (AM), SEMSA-AM, Brasil.
2015 - 2015 I Curso Teórico-Prático de Hematologia - Interpretação de Hemogramas. (Carga horária: 8h).
Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo Institucional 2017 - Atual
Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aluno de Mestrado, Carga horária: 20, Regime: Dedicação exclusiva.

Vínculo Institucional 2018 - 2018
Outras informações Vínculo: Colegador, Enquadramento Funcional: Estágio PAE, Carga horária: 8
Estágio na disciplina Tecnologia de Alimentos

Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Brasil.

Vínculo Institucional 2011 - 2016
Vínculo: Institucional, Enquadramento Funcional: Estudante de graduação

Atividades 11/2012 - 11/2016
Outras atividades técnico-científicas, Retora, Reitora.
Atividade realizada

11/2013 - 03/2014
PET - Programa de Educação Tutorial.
Outras atividades técnico-científicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
Atividade realizada

Monitoria da disciplina de Bromatologia.
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA, Brasil.

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Luiz Henrique Groto Garutti)

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizaav.do?id=K4324625E7>

Vínculo institucional

2012 - 2013

Vínculo: Voluntário, Enquadramento Funcional: Estudante de Iniciação Científica, Carga horária: 20

Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, FHEMOAM, Brasil.

Vínculo institucional

2012 - 2012

Vínculo: Institucional, Enquadramento Funcional: Estágio(Voluntário), Carga horária: 10

Projetos de pesquisa

2017 - Atual

Influência da adição de subproduto de fruta em produto de soja potencialmente probiótico tipo frozen yogurt sobre o bioenriquecimento com riboflavina

Descrição: 1. Objetivo Geral Avaliar a influência da adição de subproduto de fruta no bioenriquecimento de um produto de soja fermentado probiótico tipo frozen yogurt com riboflavina produzida pelos microrganismos a partir do processo fermentativo. 2. Objetivos Específicos Selecionar cepas produtoras de riboflavina dentre as fornecidas pela Christian Hansen para o Projeto Temático BioSyn (processo FAPESP 2013/50506-8), utilizando meio desprovido de riboflavina (Riboflavin Assay Medium - RAM); Avaliar a capacidade das cepas produtoras de riboflavina em fermentarem os resíduos de caju e uva; Determinar a produção de riboflavina pelas cepas selecionadas a partir da fermentação dos resíduos de caju e uva; Selecionar as cepas que obtiveram os melhores resultados (fermentação dos resíduos de fruta e produção de riboflavina a partir dessa fermentação) para desenvolver o produto de soja fermentado tipo frozen yogurt com concentrações maiores de riboflavina; Avaliar o produto de soja fermentado probiótico tipo frozen yogurt ao longo do seu período de armazenamento quanto aos seus parâmetros microbiológicos, pH, acidez e quantidade de riboflavina, na presença e na ausência de subproduto de fruta em sua formulação.

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1) .

Integrantes: Luiz Henrique Groto Garutti - Integrante / Susana Marta Issay Saad - Coordenador / Jean Guy Joseph LeBlanc - Integrante.

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Auxílio financeiro.

2014 - 2016

APROVEITAMENTO DA PLACENTA DO FRUTO DO CUPUAÇU (THEOBROMA GRANDIFLORUM SCHUM) COMO FONTE DE PECTINA PARA USO INDUSTRIAL

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) .

Integrantes: Luiz Henrique Groto Garutti - Integrante / Ila Maria de Aguiar Oliveira - Coordenador.

Projetos de extensão

2014 - 2015

Boas Práticas de Fabricação nos Restaurantes Universitários da Universidade Federal do Amazonas ? UFAM ? 3a fase

Descrição: Projeto que visou realizar o controle da qualidade dos restaurantes universitários, realizando inspeções e treinamentos para melhoria do ambiente e serviço..

Situação: Concluído; Natureza: Extensão.

Alunos envolvidos: Graduação: (8) .

Integrantes: Luiz Henrique Groto Garutti - Integrante / ÂNGELA LÍBIA MELO PEREIRA CARDOSO - Coordenador / Samantha dos Santos Tufic - Integrante / Valéria dos Santos de Carvalho Nobrega - Integrante / Anderson Kehl Pereira - Integrante / Carlos Klinger Rodrigues Serrão - Integrante / Lorena Martins Sampaio - Integrante / Mariana Brasil de Andrade Figueira - Integrante / Daniele Pereira de Souza - Integrante.

2013 - 2013

Jornal O Extrato - Extrair o melhor da notícia na Faculdade de Ciências Farmacológicas

Situação: Concluído; Natureza: Extensão.

Alunos envolvidos: Graduação: (10) .

2013 - 2013

Integrantes: Luiz Henrique Groto Garutti - Coordenador / Maíre Carvalho de Vasconcelos - Integrante.

XI Semana de Farmácia da FCF/UFAM

Situação: Concluído; Natureza: Extensão.

Alunos envolvidos: Graduação: (15) .

2013 - 2013

Integrantes: Luiz Henrique Groto Garutti - Coordenador / Alcina Furtado Farias - Integrante.

Manipulação de Produtos Probióticos para o Curso de Estética e Higiene no Centro de Convivência da Família Magdalena Arce Daou

Situação: Concluído; Natureza: Extensão.

Alunos envolvidos: Graduação: (8) .

2012 - 2013

Integrantes: Luiz Henrique Groto Garutti - Coordenador / Ellen Regina de Costa Paes - Integrante.

Ação Saúde: A Universidade levando informação a rádio comunitária

Descrição: Consiste em levar um pouco do conhecimento adquirido na universidade a população ouvinte de uma rádio comunitária "A Voz das Comunidades" na cidade de Manaus..

Situação: Concluído; Natureza: Extensão.

Alunos envolvidos: Graduação: (10) .

Integrantes: Luiz Henrique Groto Garutti - Coordenador / Crithya Jamile Frithz Brandão de Oliveira - Integrante / Erick Frota Gomes Figueiredo - Integrante / Marcos Henrique Gungel Rodrigues - Integrante / Bárbara Batista Salgado - Integrante / Artur Roberto Barbosa da Costa Filho - Integrante / Roberto Fernandes Soares Neto - Integrante / Lívia Laura dos Santos Rocha - Integrante / Marcela Rebouças Gouveia - Integrante / Miguel César de Almeida Negrinhos - Integrante / Keyffson Braga dos Santos - Integrante..

Projetos de desenvolvimento

2013 - 2014

DESENVOLVIMENTO DE CACHAÇA A PARTIR DA CASTANHA-DO-BRASIL (BERTHOLETIA EXCELSA H.B.K.)

Descrição: Desenvolvimento de metodologia de produção de destilado aromatizado pré-enzimático.

Situação: Concluído; Natureza: Desenvolvimento.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) -

Integrantes: Luiz Henrique Groto Garutti - Integrante / Ariane Mendonça Kuczkowski - Coordenador.

Áreas de atuação

1.	Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia.
2.	Grande área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Ciência de Alimentos.
3.	Grande área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Tecnologia de Alimentos.
4.	Grande área: Ciências Exatas e da Terra / Área: Ciência da Computação / Subárea: Sistemas de Computação.

Idiomas

Inglês	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Português	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Espanhol	Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

Produções

Produção bibliográfica

- Resumos publicados em anais de congressos**
1. KLUCZKOWSKI, A. M. ; LIMA, N. P. C. ; **GARUTTI, L. H. G.** . BRAZIL NUT ?MILK? TOXICOLOGY: INFLUENCE OF SPRAY DRYING CONDITIONS ON THE AFLATOXIN AND SELENIUM CONTENT. In: 9th Congress of Toxicology in Developing Countries XIX Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2015, Natal - RN. Applied Research in Toxicology, 2015. v. 1.
- Apresentações de Trabalho**
1. **GARUTTI, L. H. G.**. Apresentação do Manual de ACC. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. Vamos Publicar. 2016. (Oficina).
2. 9th Congress of Toxicology in Developing Countries XIX Congresso Brasileiro de Toxicologia. BRAZIL NUT ?MILK? TOXICOLOGY: INFLUENCE OF SPRAY DRYING CONDITIONS ON THE AFLATOXIN AND SELENIUM CONTENT. 2015. (Congresso).
3. XXXIII CONIC. Desenvolvimento de Cachaça a partir da castanha-do-Brasil (Bertholletia excelsa H.B.K.). 2014. (Congresso).
4. Hantavirus-induced immunopathogenesis. 2013. (Seminário).
5. X semana de Farmácia da UFAM. 2011. (Congresso).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. LIMA, A. A. N. ; **GARUTTI, L. H. G.** ; FIGUEIREDO, E. F. G. ; RODRIGUES, M. H. G. ; SALGADO, B. B. ; NOBREGA, V. S. C. ; VALENTIM, C. Q. ; BASTOS, N. C. ; ROLIM, F. N. A. ; SILVA, M. R. G. ; OLIVEIRA, N. F. ; NOGUEIRA, W. N. L. ; ANTONY, L. P. ; RODRIGUES, A. J. C. ; SOUSA, L. B. . I Fórum Dia da Farmacêutico - 20 de Janeiro. 2013. (Outro).
2. **GARUTTI, L. H. G.**. XI Semana de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2013. (Congresso).
3. **GARUTTI, L. H. G.**. III Fórum Farmacêutico - Farmacêutico em alimentos: inovações e atualidades. 2013. (Outro).

Inovação

Projeto de desenvolvimento tecnológico

Educação e Popularização de C & T

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. LIMA, A. A. N. ; **GARUTTI, L. H. G.** ; FIGUEIREDO, E. F. G. ; RODRIGUES, M. H. G. ; SALGADO, B. B. ; NOBREGA, V. S. C. ; VALENTIM, C. Q. ; BASTOS, N. C. ; ROLIM, F. N. A. ; SILVA, M. R. G. ; OLIVEIRA, N. F. ; NOGUEIRA, W. N. L. ; ANTONY, L. P. ; RODRIGUES, A. J. C. ; SOUSA, L. B. . I Fórum Dia da Farmacêutico - 20 de Janeiro. 2013. (Outro).

ANEXO B – Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9131 - 10275886/1 - Luiz Henrique Groto Garutti

Email:	luiz.garutti@usp.br
Data de Nascimento:	08/09/1992
Cédula de Identidade:	RG - 38.779.353-7 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico - Universidade Federal do Amazonas - Amazonas - Brasil - 2016

Curso:	Mestrado
Programa:	Ciência dos Alimentos
Área:	Bromatologia
Data de Matrícula:	06/03/2017
Início da Contagem de Prazo:	06/03/2017
Data Limite para o Depósito:	06/09/2019
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Susana Marta Isay Saad - 06/03/2017 até o presente. Email: susaad@usp.br
Co-orientador:	Prof(a). Dr(a). Jean Guy Joseph Leblanc - 10/10/2017 até o presente. Email:
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 06/03/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 19/04/2018
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 06/03/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2019

Impresso em: 19/04/2019 10:34:03

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9131 - 10275886/1 - Luiz Henrique Groto Garutti

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBA5892-6/1	Processos Deteriorantes de Alimentos pelo Desenvolvimento de Microrganismos	08/03/2017	18/04/2017	60	0	-	-	N	Turma cancelada
FBA5757-1/2	Tópicos Avançados em Microbiologia de Alimentos	03/04/2017	07/05/2017	30	2	75	A	N	Concluída
FBA5746-1/5	Tópicos Avançados em Qualidade e Inocuidade de Alimentos	10/05/2017	16/05/2017	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5747-1/2	Tópicos Avançados em Qualidade e Inocuidade de Alimentos II	22/05/2017	28/05/2017	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5728-4/4	Aprimoramento Pedagógico	30/05/2017	26/06/2017	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5752-1/4	Probióticos em Alimentos e Suas Implicações na Saúde Humana	22/08/2017	02/10/2017	60	4	91	A	N	Concluída
ICB5752-1/3	Como Comunicar Sua Ciência: Melhorando a Oratória e a Empatia com o Público (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	16/10/2017	29/10/2017	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBT5776-5/6	Tópicos Especiais de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica II	16/10/2017	29/10/2017	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5870-8/1	Tópicos em Ciência dos Alimentos e Nutrição I	26/02/2018	07/05/2018	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5905-2/1	Planejamento Experimental e Análise Multivariada	27/02/2018	19/06/2018	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5892-6/2	Processos Deteriorantes de Alimentos pelo Desenvolvimento de Microrganismos	05/03/2018	16/04/2018	60	4	100	B	N	Concluída
FBT5781-5/3	Culturas Probióticas: Aplicações Tecnológicas	20/08/2018	10/09/2018	60	4	89	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	30
Estágios:			
Total:	0	25	30

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

ANEXO C - Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1. Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1. Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2. Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 05 de maio de 2017.

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento
Presidente da CPG/FCF/USP