UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Alimentos

Desenvolvimento de sobremesa simbiótica à base de arroz

Daniel Massayuki Kakinoki

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Susana Marta Isay Saad

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

K13d Kakinoki, Daniel Masayuki
Desenvolvimento de sobremesa simbiótica a base de arroz /
Daniel Masayuki Kakinoki. -- São Paulo, 2010.
62p

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Saad, Susana Marta Isay

1. Alimentos : Processamento : Tecnologia 2. Sobremesas
geladas 3. Microbiologia de alimentos I. T. II. Saad, Susana Marta
Isay, orientador.

664 CDD

Daniel Massayuki Kakinoki

Desenvolvimento de sobremesa simbiótica à base de arroz

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, dezembro de 2010.

À minha mãe Yukie por todo o carinho e apoio em todas as
minhas decisões, e ao meu pai Francisco pelo suporte,
amizade e incentivo.

A sabedoria não se transmite, é preciso que nós a descubramos fazendo uma caminhada que ninguém pode fazer em nosso lugar e que ninguém nos pode evitar, porque a sabedoria é uma maneira de ver as coisas.

Proust

Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida

Sócrates

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Susana Saad, que desde o início gentilmente atendeu à minha casual solicitação de ajuda para desenvolver um projeto de pesquisa para uma bolsa no Japão. E este projeto então se transformou em um trabalho de mestrado e, graças a sua atenção, paciência, confiança e amizade esta dissertação se tornou possível. Obrigado, professora.

Aos meus pais, que sempre permitiram eu ir adiante com todas as minhas escolhas, dando o suporte necessário e sempre me incentivando, não importando no que seja. E, além disso, me educaram e me fizeram tornar a pessoa que sou hoje.

À minha querida Pah, pela incondicional paciência, compreensão, por acreditar na minha capacidade e por estar sempre presente em todas as minhas decisões mesmo a muitos quilômetros de distância.

À Cíntia, por todos os conselhos, e pelos incondicionais esforços de sempre me ajudar, desde o preparo da qualificação, até a fase final, no preparo da dissertação e artigos científicos.

Ao Bruno, companheiro de todas as horas, pelos conselhos, e todas as atividades extracurriculares que fazíamos e, principalmente, pelas corridas que fazíamos pelo campus da USP para aliviar a tensão diária do laboratório.

Às colegas Juliana e Flávia, as quais eu admiro muito, e que hoje tomaram diferentes rumos, mas que sempre me ajudaram no desenvolvimento do meu trabalho.

Aos meus colegas de laboratório: Regina, Natália, Cris, Martha, Raquel, Graziela e Clara por todo o suporte e paciência que tiveram comigo. Desde explicações teóricas, ajudas durante as produções, análises e principalmente com a organização do laboratório.

À Profa. Dra. Cynthia Jurkiewicz Kunigk, minha orientadora do trabalho de graduação na Escola de Engenharia Mauá. Sem ela, não existiria este trabalho.

À Profa. Dra. Inar Alves de Castro, pelo suporte nas análises estatísticas e na análise sensorial. Grande parte das discussões foi abordada graças à sua ajuda.

A todos os meus amigos do departamento, pelo convívio diário, e a todos os amigos

que conheci nos últimos 30 meses e que tornaram meus dias mais prazerosos.

A Deus por ter me dado a felicidade de ter uma família perfeita, e amigos fiéis e compreensíveis.

A todos os meus amigos, do colegial, da graduação e do atletismo, que sempre me apoiaram e me acompanharam nessa caminhada, em todos os momentos, tanto nos de felicidade quanto nos momentos em que tive mais dificuldades e que graças a Deus foram poucos.

À Maria Crystina, que foi a responsável pelo meu ingresso no mestrado. Sem ela não teria nem passado pela cabeça a idéia de me tornar pesquisador.

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio por ser um exemplo de pessoa e pesquisador, e por me direcionar em vários momentos, além de propor as sugestões durante o exame de qualificação.

À Dra. Haíssa Cardarelli, também pelas sugestões de melhoria do trabalho, e por ser um exemplo de pessoa para mim.

Aos funcionários Ivani (por cuidar tão bem de mim), Alexandre e Nilton (pelas risadas e conversas informais, principalmente sobre futebol), Elza, Miriam, Glédson, Juarez e Fátima por todo o suporte, além da amizade em todo esse tempo. E ao Renato, Márcio e Auriluce pelo suporte técnico na informática.

Ao Jorge e Elaine pela simpatia e pela amizade durante todo esse tempo.

A todos os voluntários participantes da análise sensorial.

À FAPESP, pela bolsa (processo FAPESP 08/54016-1) e auxílio financeiro.

A CAPES pelo auxílio financeiro – PROAP, e bolsa nos primeiros meses do mestrado.

Às empresas Yakult, Clariant, National, Orafiti, Purac, Duas Rodas, RAI, Vitta Flavor e Christian Hansen, pelo fornecimento de parte dos recursos materiais empregados nesta pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Alimentos Funcionais, Probióticos e Prebióticos	1
1.2. Arroz: Propriedades, Mercado e Produção.....	6
1.3. Intolerância à Lactose	9
1.3.1. Deficiência Primária	11
1.3.2. Deficiência Secundária.....	11
1.3.3. Deficiência Neonatal	12
1.3.4. Deficiência Congênita	12
1.4. As sobremesas como veículos de probióticos e prebióticos	12
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Ingredientes adicionados à formulação desenvolvida	16
3.2. Elaboração da sobremesa de arroz.....	19
3.3. Fabricação do preparado de fruta sabor maçã	21
3.4. Delineamento experimental.....	22
3.5. Embalagem, armazenamento e períodos de amostragem	22
3.6. Análises físico-químicas	23
3.7. Análises microbiológicas	23
3.8. Determinação da composição centesimal da sobremesa.....	25
3.9. Análise sensorial	26
3.10. Análise estatística.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1. Composição centesimal das sobremesas	27
4.2. Evolução dos parâmetros físico-químicos ao longo do armazenamento das sobremesas	28
4.3. Comportamento dos microrganismos probióticos e da cultura <i>starter</i> ao longo do armazenamento das sobremesas	31
4.4. Microrganismos indicadores de contaminação	38
4.5. Análise Sensorial	42
5. CONCLUSÃO	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção e consumo nos 10 principais países, em 2009 (em mil t)	8
Tabela 2. Produção por região e principais estados produtores (em mil t)	8
Tabela 3. Formulação definitiva da sobremesa à base de arroz	17
Tabela 4. Formulação definitiva do preparado de fruta sabor maçã empregada para elaboração das sobremesas.....	18
Tabela 5. Formulação definitiva do preparado de fruta sabor maçã empregada para elaboração das sobremesas.....	18
Tabela 6. Composição centesimal e umidade (média $\pm$ desvio padrão)* obtidos para as três formulações de sobremesa simbiótica à base de arroz	27
Tabela 7. Valores médios de pH e de firmeza obtidos para os diferentes tratamentos de sobremesa à base de arroz durante o seu armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$	28
Tabela 8. Viabilidade* de <i>Bifidobacterium animalis</i> nas sobremesas T1 e T2, durante o seu armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$	31
Tabela 9. Viabilidade* de <i>Lactobacillus acidophilus</i> nas sobremesas T1 e T2, durante armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$	32
Tabela 10. . Viabilidade* de <i>Streptococcus thermophilus</i> nas sobremesas T1 e T2, durante armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$	33
Tabela 11. <i>Coliformes totais</i> detectados nas sobremesas T1, T2 e T3, durante armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$	38
Tabela 12. <i>Staphylococcus</i> spp. detectados nas sobremesas T1, T2 e T3, durante armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$	39
Tabela 13: Viabilidade de bolores e leveduras nos tratamentos de sobremesa T1, T2 e T3, durante armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$	41
Tabela 14. Notas de aceitabilidade da sobremesa de arroz, coletadas através de análises sensoriais durante o período de armazenamento.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma contendo o procedimento de produção da sobremesa de arroz.....	20
Figura 2: Fluxograma do processo de obtenção do preparado de fruta.....	21
Figura 3: Populações de La-5, Bb-12 e <i>S. thermophilus</i> obtidas em sobremesa à base de arroz T1 (não fermentada) e T2 (fermentada), durante o período de armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ e respectivos valores de pH	34
Figura 4: Resultados de aceitabilidade obtida na análise sensorial de sobremesa simbiótica à base de arroz.	42
Figura 5: Distribuição das notas atribuídas para os diferentes tratamentos avaliados.	43
Figura 6: Frequência das notas obtidas para as sobremesas T1 (não fermentada), T2 (fermentada) e T3 (controle) na análise sensorial por período (7, 14 e 21 dias de armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$).	45
Figura 7: Principais atributos apontados pelos voluntários como positivos (acima da abscissa), e negativos (abaixo da abscissa), durante a análise sensorial.	47

RESUMO

Os alimentos funcionais probióticos e/ou prebióticos estão em grande expansão no mercado e encontram-se disponíveis em diversas formas de apresentação, principalmente como produtos lácteos, na forma de iogurtes e leites fermentados. Porém, aproximadamente 70% da população mundial tem seu consumo ameaçado, em virtude da incapacidade de produzir a enzima β -galactosidase em quantidades suficientes para a digestão de lactose, característica esta que torna esses indivíduos intolerantes a esse açúcar. O arroz (*Oryza sativa*) é um cereal consumido por cerca de dois terços da população mundial, que apresenta um baixo sabor residual e que faz parte da cultura alimentar de diversos países, inclusive o Brasil. Suas propriedades favorecem o seu uso em géis, pudins e sobremesas, principalmente devido à sua aparência, sabor suave, além de resultar em certos efeitos benéficos à saúde, como prevenção e controle de doenças crônicas, também consequentes da presença de proteínas hipoalergênicas. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um produto novo que sirva de alternativa para indivíduos intolerantes à lactose - uma sobremesa não láctea potencialmente simbiótica à base de arroz, elaborada com a adição da cultura ABT (composta dos microrganismos comprovadamente probióticos *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e da cultura starter *Streptococcus thermophilus*) e com os ingredientes prebióticos inulina e fruto-oligossacarídeo (FOS) e enriquecida com cálcio e com isolado protéico de soro de leite.

Três tratamentos foram realizados (em triplicata): T1 (sobremesa não fermentada), na qual o produto final foi diretamente resfriado, sem a sua fermentação prévia, T2 (sobremesa fermentada) na qual se aguardou a fermentação por parte da cultura adicionada (a 37 °C/ 2 horas) e T3 (controle), sem a adição da cultura. Os produtos foram mantidos a 4-5 °C por até 21 dias. As sobremesas foram avaliadas sensorialmente por provadores não treinados, após 7, 14 e 21 dias de armazenamento, através de teste de aceitabilidade, com escala hedônica de nove pontos. Também foram monitorados o pH, a firmeza instrumental (em analisador de textura TA-XT2) e a viabilidade de Bb-12, La-5 e *Streptococcus thermophilus* e a população de contaminantes, no produto recém-preparado (1 dia) e após 7, 14 e 21 dias de armazenamento. Adicionalmente, a determinação de pH foi realizada durante a elaboração dos produtos e a composição centesimal foi efetuada no produto mantido congelado.

A sobremesa T1 (não fermentada) apresentou redução de pH durante os 21 dias de armazenamento, enquanto que T2 (fermentada) e T3 (controle) não diferiram significativamente ($p>0,01$). A firmeza de T2 foi ligeiramente menor (entre 0,46 N – dia 1 e 0,23 N – dia 21) que a de T1 (entre 0,55 N – dia 1 e 0,25 N – dia 21). A avaliação sensorial revelou que as sobremesas desenvolvidas obtiveram notas entre 6,4 e 7,4, sendo que não foram detectadas diferenças significativas ($p<0,05$) na preferência entre os diferentes tratamentos realizados e para os diferentes dias de armazenamento, com exceção do tratamento T3 ao 14º dia, o qual obteve notas significativamente inferiores aos demais. A viabilidade de Bb-12 foi superior à de La-5 em ambos os tratamentos adicionados de cultura ABT. Entretanto, a fermentação influenciou cada microrganismo de modo distinto. A viabilidade de La-5 foi maior em T1, tendo diminuído de 8,1 log UFC/g (dia 1 – pH 5,1) para 7,3 log UFC/g (dia 21 – pH 4,9), enquanto que Bb-12 apresentou viabilidade ligeiramente superior em T2, tendo diminuído de 8,8 log UFC/g (dia 1 – pH 4,7) para 8,1 log UFC/g (dia 21 – pH 4,5). Em T2, a população de La-5 foi inferior a 5,0 log UFC/g após 21 dias de armazenamento. A população de *S. thermophilus* se manteve superior a 8,0 log UFC/g durante todos os períodos, em ambos os tratamentos. A sobremesa não láctea à base de arroz potencialmente simbiótica desenvolvida apresenta boas perspectivas como alimento funcional e obteve boa aceitação por parte dos provadores. A fabricação do produto não fermentado poderia ser a sobremesa de escolha, de preparo mais curto, levando-se em consideração as questões econômicas envolvidas durante a sua produção. O estudo sugere que cada cepa deve ser testada separadamente, quanto ao comportamento no produto, em diferentes condições. Sugere, ainda, que a inclusão da etapa fermentativa na preparação de uma sobremesa pode afetar diferentemente cepas probióticas distintas.

ABSTRACT

Functional foods containing probiotic strains and/or prebiotic ingredients are available in different forms, and most of them are dairy products, such as yogurts and fermented milk. Nevertheless, the milk content in these products may restrict their intake by a considerable proportion (approximately 70%) of the worldwide population that is incapable of producing β -galactosidase in enough quantity for digesting lactose. Rice (*Oryza sativa*) is an alternative crop with low residual taste, which is extremely abundant, being the basic food for more than half of world's population. Its properties favor its use in puddings and desserts, mainly due to its appearance, light taste, and resulting in certain beneficial effects to health, such as prevention and control of chronic diseases, also due to the hypoallergenic proteins present. This study aimed to develop a new product to serve as an alternative for individuals who are lactose intolerant - a non-dairy rice-based potentially synbiotic dessert, prepared with the addition of an ABT culture (containing *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, *Lactobacillus acidophilus* La-5, and *Streptococcus thermophilus*), with inulin and fructo-oligosaccharide (FOS), and enriched with calcium and milk whey protein isolate.

Three different trials were prepared (in triplicates): T1 – without the previous fermentation stage after the addition of the ABT culture, and directly cooled for storage; T2 – desserts were previously fermented, at 37 °C for 2h, after the addition of the culture; and T3 (control) – without the addition of culture. The products were stored at 4-5 °C for up to 21 days. The desserts were submitted to sensory evaluation by an untrained panel, employing the acceptability test, with a 9-point structured hedonic scale, after 7, 14 and 21 days of storage. Moreover, pH, and instrumental firmness (TA-XT2 texture analyzer), and viability of Bb-12, La-5, and *Streptococcus thermophilus*, and populations of contaminants were also monitored during the storage period (days 1, 7, 14, and 21 of storage) for each trial. In addition, pH was also determined during production, and chemical composition proceeded from frozen samples.

Trial T1 (non fermented) showed a decrease in pH during the whole storage period of 21 days, whereas T2 (fermented), and T3 (control) did not change significantly ($p>0,01$). T2 presented a slightly lower firmness (between 0.46 N – day 1, and 0.23 N – day 21) than T1 (between 0.55 N – day 1, and 0.25 N – day 21). The sensory evaluation revealed that the desserts obtained grades between 6.4 and 7.4, and no differences ($p<0,05$) for sensory acceptability between the trials, and the different days of storage were observed, except for trial T3 on the 14th day, which obtained significantly lower grades, when compared to the others. Viability of Bb-12 was higher than of La-5 in both trials with ABT culture. Nevertheless, the fermentation stage had implications on growth in different ways for each microorganism. Viability of La-5 was significantly higher ($p<0.05$) in T1, decreasing from 8.1 log cfu/g (day 1 – pH 5.1) to 7.3 log cfu/g (day 21 – pH 4.9), whereas viability of Bb-12 was just slightly higher in T2, decreasing from 8.8 log cfu/g (day 1 – pH 4.7) to 8.1 log cfu/g (day 21 – pH 4.5). Trial T2 revealed La-5 populations below 5.0 log cfu/g, after 21 days of storage. *S. thermophilus* maintained population above 8.0 log cfu/g during all storage times for both trials. This study indicated that the non-dairy rice-based potentially synbiotic dessert developed has a great potential as a functional food, and was well accepted by the panelists. The production of the non-fermented dessert could be the best choice, for economical questions and because of the shorter time during the production. This study suggests each strain must be evaluated independently for a specific product and condition. Moreover, the inclusion of a fermentation stage during production may affect the viability of probiotic strains in different ways.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Alimentos Funcionais, Probióticos e Prebióticos

Com o aumento na expectativa de vida da população, aliado ao crescimento dos custos médicos hospitalares, a sociedade necessita vencer novos desafios, através do desenvolvimento de conhecimentos científicos e tecnologias que resultem em modificações importantes no estilo de vida das pessoas. A nutrição precisa se adaptar a esses desafios, através do desenvolvimento desses novos conceitos. A nutrição otimizada é um desses conceitos atuais, dirigida no sentido de maximizar as funções fisiológicas de cada indivíduo, de maneira a assegurar tanto o bem estar quanto à saúde, como também o risco mínimo de desenvolvimento de doenças ao longo da vida. Nesse contexto, os alimentos funcionais, especialmente os probióticos e prebióticos, são conceitos inovadores e estimulantes (SAAD, 2006).

Alimento funcional é aquele semelhante em aparência ao alimento convencional, consumido como parte de uma alimentação normal, capaz de produzir efeitos metabólicos ou fisiológicos desejáveis na manutenção da saúde. Adicionalmente às suas funções nutricionais como fonte de energia e de substrato para a formação de células e tecidos, possui, em sua composição, uma ou mais substâncias capazes de agir no sentido de modular os processos metabólicos, melhorando as condições de saúde, promovendo o bem-estar das pessoas e prevenindo o aparecimento precoce de doenças degenerativas, que levam a uma diminuição da longevidade (ARVANITOYANNIS & VAN-HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLU, 2005; SHAH, 2007).

O termo 'Alimentos Funcionais' foi inicialmente proposto no Japão, em meados de 1980, principalmente em função de uma população sempre crescente de idosos e da preocupação, tanto da população em geral como do governo, na prevenção das doenças crônicas e degenerativas. Em 1980, foi observada uma crescente sensibilização da sociedade com relação ao que eles chamavam de estilo de vida relacionado a doenças, através de hábitos alimentares em sua vida diária. Em 1991, o Ministério da Saúde e Bem Estar permitiu o livre comércio de alimentos funcionais com a denominação de "Foods for specified health uses" (FOSHU). Atualmente, alterações com relação à legislação vêm sendo constantemente realizadas, devido à classificação correta dos produtos quanto aos efeitos, funções e à segurança (ARAI et al, 2001; OHAMA et al, 2006; ARAI et al, 2008). Segundo

ROBERFROID (2002), um alimento funcional pode ser classificado de acordo com o alimento em si ou conforme os componentes bioativos nele presentes, como, por exemplo, os probióticos, as fibras, os fitoquímicos, as vitaminas, os minerais, as ervas, os ácidos graxos ômega 3 (ω -3), além de determinados peptídeos e proteínas (KOMATSU et al, 2008).

Há alguns anos, países europeus também começaram um minucioso estudo, de tal maneira que ocupam uma posição de destaque na moderna biociência. Não apenas o estudo acadêmico, mas o governo e as indústrias japonesas também estão buscando novas informações sobre os alimentos funcionais (ARAI et al, 2001). Em 1990, a Suécia se tornou o primeiro país com regulamentação sobre as alegações (*claims*) em alimentos, denominado Código de Prática (Code of Practice). Desde então, o interesse pelos alimentos funcionais se expandiu através da Europa (LANDTROM et al, 2009).

Quanto à legislação, não se sabe ao certo como classificar os alimentos funcionais. Cabe ao órgão regulador classificá-los como alimentos, suplementos alimentares ou drogas. Diversos países possuem suas legislações a respeito, porém apenas no Japão, Reino Unido, Estados Unidos e nos países escandinavos se percebe algum progresso (ARVANITOYANNIS & VAN-HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLU, 2005). Até o final de 2007, os alimentos classificados como FOSHU eram divididos em 11 categorias de *claims* e 703 produtos funcionais, no total. O crescimento no número de produtos demonstra o reflexo do avanço de diversos fatores sobre o alimento funcional, como a presença de flavonóides, carotenóides, oligossacarídeos, oligopeptídeos e outros componentes não nutritivos (ARAI et al, 2008).

A definição atualmente aceita internacionalmente de probióticos é que eles são microorganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; SANDERS, 2003). A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência aos patógenos. Assim, a utilização de culturas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002).

As principais espécies utilizadas e as que se acredita terem as melhores características probióticas são *L. acidophilus*, *L. casei* e *Bifidobacterium* spp. Até 2007, 56 espécies do gênero *Lactobacillus* e 29 do gênero *Bifidobacterium* foram reconhecidos como sendo probióticos (SHAH, 2007). A verificação da compatibilidade e adaptabilidade entre as cepas selecionadas e os referidos veículos é fundamental, de modo que cepas selecionadas com base em sua resistência a ácidos podem ser úteis em aplicações probióticas e apresentar sobrevivência aumentada, tanto nas condições ambientais do hospedeiro quanto em produtos alimentícios. Entretanto, é importante salientar que um produto probiótico deve conter uma ou mais cepas definidas e bem caracterizadas, no sentido de compreender os fatores determinantes sobre a funcionalidade probiótica e os benefícios do hospedeiro, já que os efeitos probióticos são específicos para determinadas cepas em especial. A seleção de cepas probióticas deve ser direcionada aos efeitos desejáveis para o produto específico ou para a população-alvo daquele produto (KOMATSU et al, 2008).

No caso específico de um alimento à base de cereais, como o arroz, deve-se atentar, também, com a composição do grão, uma vez que substratos com alto teor de fibras estimulam a multiplicação de microrganismos probióticos. Além disso, as propriedades sensoriais e a restrição nutricional do produto devem ser levadas em consideração na formulação do produto final (LAMSAL & FAUBION, 2009).

As principais características dos microrganismos probióticos são: resistência à acidez e à bile, ligação com as células epiteliais humanas, colonização no intestino humano, produção de substâncias antimicrobianas e alto potencial de multiplicação (ZUBILLAGA et al, 2001).

Entre os benefícios atribuídos à saúde do hospedeiro, destacam-se: controle da microbiota intestinal, estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos, promoção da resistência gastrointestinal à colonização de patógenos, diminuição da população de patógenos consequente à produção de ácidos acético e láctico, de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos, estimulação do sistema imune, aumento da absorção de sais minerais e produção de vitaminas. Embora ainda não comprovados, outros efeitos atribuídos a essas culturas são a diminuição de riscos de câncer de cólon e de doença cardiovascular (SAAD, 2006).

Tradicionalmente, microrganismos probióticos têm sido utilizados em iogurtes e outros produtos lácteos fermentados. Entretanto, nos dias atuais vem crescendo a

demanda pelo consumo de produtos não lácteos probióticos, cujas cepas são incorporadas principalmente em bebidas e produtos à base de cereais e carnes (PRADO et al, 2008; GOBBETTI et al, 2010; RIVERA-ESPINOZA & GALLARDO-NAVARRO, 2010).

Previamente, prebióticos eram definidos como componentes alimentares não digeríveis capazes de afetar benéficamente a saúde do hospedeiro por estimularem a proliferação ou atividade de populações desejáveis no cólon (GIBSON & ROBERFROID, 1995). Essa definição foi atualizada em 2004, onde se definiu prebióticos como ingredientes seletivamente fermentativos capazes de permitir mudanças específicas em relação à composição e/ou atividade na microbiota gastrointestinal, conferindo benefícios sobre o bem estar e à saúde do hospedeiro (GIBSON et al, 2004). Adicionalmente, o prebiótico pode inibir a multiplicação de patógenos, garantindo benefícios adicionais à saúde. Atualmente, são identificados como carboidratos não digeríveis a lactulose, a inulina e diversos oligossacarídeos que as bactérias benéficas do cólon, geralmente lactobacilos e bifidobactéria, são capazes de fermentar (GILILAND, 2001; MATILLA-SANDHOLM et al, 2002; SAAD, 2006; ROBERFROID, 2007b).

Os mecanismos de ação ainda precisam ser adequadamente definidos. Entretanto, aparentemente, as modificações na microbiota intestinal devido à ingestão de prebióticos podem resultar na interação com os componentes imunológicos do intestino. Essa interação pode resultar, não somente em efeitos de proteção gastrintestinais, mas também em efeitos sistêmicos, que podem conferir proteção a outras superfícies, como a pele e o trato respiratório, provendo, dessa forma, um amplo espectro de benefícios sistêmicos (SAAVEDRA & TSCHERNIA, 2002; WANG, 2009).

Os critérios para a classificação de um alimento como sendo prebiótico são: a resistência à acidez gástrica, a hidrólise por enzimas dos mamíferos e a não absorção gastrintestinal superior; a fermentação pela microbiota intestinal; a estimulação seletiva da multiplicação e/ou atividade de bactérias intestinais que contribuem para o bem estar do hospedeiro (ROBERFROID, 2007b; WANG, 2009).

Os prebióticos avaliados em humanos constituem-se dos frutanos e galactanos. A maioria dos dados da literatura científica sobre efeitos prebióticos relaciona-se aos fruto-oligossacarídeos (FOS) e à inulina e diversos produtos comerciais estão disponíveis há vários anos (PUUPPONNEN-PIMIÄ et al, 2002;

SAAD, 2006). O uso de inulina e FOS são utilizados pela indústria também como agentes de textura e sabor. Esses tipos de fibras alimentares são prontamente fermentáveis por bactérias benéficas, aumentando, dessa maneira, sua população, com a produção de ácidos graxos de cadeia curta. Esses ácidos, geralmente constituídos de butirato, acetato e propionato, proporcionam energia metabólica para o hospedeiro e a acidificação do intestino (SGHIR et al, 1998; WANG, 2009).

A inulina e a oligofrutose pertencem a uma classe de carboidratos denominados frutanos e são considerados ingredientes funcionais, uma vez que exercem influência sobre processos fisiológicos e bioquímicos no organismo, resultando em melhoria da saúde e redução no risco de aparecimento de diversas doenças. As principais fontes de inulina e oligofrutose na indústria de alimentos são a chicória (*Cichorium intybus*) e a alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus*) (KAUR & GUPTA, 2002; ROSSI et al, 2005).

Não há uma dose pré-determinada de frutanos para resultar em efeitos prebióticos. No entanto, a população inicial de bifidobactéria influencia tais efeitos nos hospedeiros, que possuem características distintas quanto à composição do trato gastrointestinal. Desse modo, cada indivíduo irá determinar a eficácia do prebiótico de maneira distinta, lembrando que os benefícios são diretamente dependentes das espécies presentes (ROBERFROID, 2007a).

Entretanto, os ingredientes prebióticos devem ser estáveis quimicamente a tratamentos térmicos de processamento de alimentos industrializados, como o calor, baixo pH e reação de Maillard. Caso contrário, o prebiótico degradado não será capaz de estimular os microrganismos benéficos, uma vez que sua estrutura não poderá ser aproveitada por estes metabolismos (WANG, 2009).

Um produto com características probióticas e prebióticas combinadas é denominado simbiótico. A interação *in vivo* pode ser favorecida por uma adaptação do probiótico ao substrato prebiótico anterior ao consumo. Isto pode, em alguns casos, resultar em uma vantagem competitiva para o probiótico, caso ele seja consumido juntamente com o prebiótico. Assim, o efeito poderá ser direcionado a diferentes regiões do trato gastrointestinal. O consumo de probióticos e de prebióticos apropriados pode aumentar os efeitos benéficos de cada um deles, uma vez que o estímulo de cepas probióticas conhecidas leva à escolha dos pares simbióticos substrato-microrganismo ideais (BIELECKA et al, 2002; HOLZAPFEL & SCHILLINGER, 2002; MATILLA-SANDHOLM et al, 2002; PUUPONNEN-PIMIÄ et al,

2002). VITALI et al (2010) concluíram que o consumo de produtos simbióticos leva à modulação das atividades metabólicas do intestino, através da manutenção de suas bioestruturas, com o aumento da quantidade de estruturas como ácidos graxos de cadeia curta e metil-acetato, promovendo, dessa forma, a saúde do consumidor.

1.2. Arroz: Propriedades, Mercado e Produção

O arroz cultivável (*Oryza sativa* L.) vem sendo consumido pelos humanos há cerca de 5000 anos. Atualmente, ele faz parte da cultura alimentar de cerca de dois terços da população mundial, que a consome de diversas maneiras. Sua composição é, basicamente, carboidratos (64%) e proteínas (7%), contendo também lipídios, fibras e cinzas. Dos carboidratos, quase a sua totalidade é composta de amido (amilose e amilopectina). A propriedade de inchaço do arroz provém da amilopectina, mas a amilose pode atuar tanto como um agente diluente quanto um inibidor ao inchaço, sendo este um bom indicador de dureza do gel na pasta de farinha de arroz (WANG et al, 2010). Entretanto, a composição dos grãos varia de acordo com a variedade, variação ambiental, de manejo, de processamento e armazenamento (ZHOU et al, 2002). As proteínas do arroz, embora em pequena quantidade em comparação aos outros cereais, é um importante fator a ser estudado, devido ao grande volume de arroz consumido, além de ter influências estruturais, funcionais e nutricionais. Estão em maior quantidade a glutenina, albumina, prolamina e globulina, cada um solúvel em um tipo de solvente (JU et al, 2001; SHIH, 2004).

Diversos componentes do arroz presentes no farelo e/ou no endosperma têm sido relacionados a diferentes efeitos no organismo. Pesquisadores relatam efeitos benéficos à saúde, como auxílio no controle da glicose sanguínea, redução dos lipídios séricos e da pressão arterial, entre outros, auxiliando na prevenção e no controle de doenças crônicas, como diabetes e doenças cardiovasculares (WALTER et al, 2008). Os efeitos benéficos atribuídos ao grão integral de arroz devem-se à presença de carboidratos complexos, vitaminas, minerais e outros componentes fitoquímicos. Recentemente, QIU et al (2009) estudaram a composição de componentes antioxidantes de arroz e seus resultados revelaram a presença destes em todas as variedades estudadas, principalmente de compostos fenólicos.

O número de produtos à base de arroz em pudins, sorvetes e géis tem aumentado muito, devido às suas propriedades nutricionais, aparência e gosto

suave (JU et al, 2001). De acordo com WANG et al, (1999), o farelo de arroz é considerado uma boa fonte de proteínas hipoalergênicas, podendo ser utilizado em formulações de produtos infantis, uma vez que frequentemente esse segmento da população possui algum tipo de alergia a alimentos.

O arroz se destaca pela produção e área de cultivo, desempenhando um papel estratégico, tanto no aspecto econômico quanto social. Cerca de 150 milhões de hectares são cultivados anualmente no mundo, produzindo 590 milhões de toneladas, sendo que mais de 75% desta produção é oriunda do sistema de cultivo irrigado. É considerado o cultivo alimentar de maior importância em muitos países em desenvolvimento, principalmente na Ásia e Oceania, onde vivem 70% da população total dos países em desenvolvimento e cerca de dois terços da população subnutrida mundial. É alimento básico de cerca de 2,4 bilhões de pessoas e, segundo estimativas, até 2050 haverá uma demanda para atender o dobro dessa população. Aproximadamente 90% de todo o arroz do mundo é cultivado e consumido na Ásia (EMBRAPA, 2002).

A América Latina ocupa o segundo lugar em produção e terceiro lugar em consumo de arroz. Assim como na Ásia, o arroz é um produto importante na economia de muitos dos países latino-americanos, pelo fato de ser um item básico na dieta da população. Essa importância sob o ponto de vista econômico ocorre especialmente no caso do Brasil, Colômbia e Peru ou por ser um produto importante no comércio internacional para o Uruguai, Argentina e Guiana, como exportadores, e para o Brasil, México e Cuba, como importadores (EMBRAPA, 2002).

De acordo com a Tabela 1, o Brasil se destaca como sendo o maior produtor de arroz fora do continente Asiático. Em 2009, a produção brasileira representou 1,9% do total mundial. A lavoura orizícola tem grande importância econômica para o Brasil (EMBRAPA, 2002). Segundo a CNA (Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, 2008), em 2007, a produção no valor de R\$ 6,45 bilhões, representou 4,7% do valor bruto da produção agrícola nacional (R\$ 136,61 bilhões). Já a soja, o milho, o café, a cana-de-açúcar e a laranja representam um valor bruto maior que a orizicultura.

A região Sul do Brasil é responsável pela maior produção nacional, que corresponde a mais de 60% da produção total desse cereal. Nas demais regiões, as produções de arroz irrigado não são significativas, conforme mostra a tabela 2.

De acordo com a FAPRI (Food and Agricultural Policy Research Institute), o Brasil apresentará um aumento de produtividade e uma moderada queda no consumo *per capita* de arroz ao longo do período projetado (2006/2007 a 2016/2017). O país permanecerá na posição de importador líquido de arroz até 2016 (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2008).

Tabela 1. Produção e consumo nos 10 principais países, em 2009 (em mil t)

	Produção	Consumo*
China	197.257,2	130.778,0
Índia	131.274,0	92.400,0
Indonésia	64.398,8	36.940,0
Bangladesh	45.075,0	31.000,0
Vietnã	38.895,5	19.150,0
Tailândia	31.462,9	9.500,0
Mianmar	30.500,0	9.950,0
Filipinas	16.266,4	13.150,0
Brasil	12.604,8	8.810,0
Japão	10.592,5	8.370,0
Total Mundial	678.688,3	432.039,0

Fonte: FAOSTAT / IRRI 2009

* Valores estimados para o ano de 2008.

Tabela 2. Produção por região e principais estados produtores (em mil t)

REGIÃO/UF	2007/08
NORTE	1.036,6
PA	310,3
TO	421,7
NORDESTE	1.176,7
MA	699,7
PI	226,7
CENTRO-OESTE	1.068,7
MT	683,4
SUDESTE	239,2
MG	143,5
SUL	8.552,8
SC	1.018,1
RS	7.361,7
Total Brasil	12.074,0

FONTE: CONAB 2009

Assim como a produção, o consumo de arroz no mundo concentra-se nos países do sudeste asiático. Intimamente agregado à cultura da região, o consumo *per capita* de arroz nos países do sudeste asiático é muito superior aos dos demais países, ocidentais. Segundo dados da FAOSTAT (2009), o consumo brasileiro de arroz é de aproximadamente 49,8 quilogramas por habitante por ano (base casca). Apesar de ser inferior ao consumo mundial médio por habitante (79,4 kg/hab/ano), esse valor é considerado alto, se comparado com o consumo *per capita* dos países desenvolvidos (16,7 kg/hab/ano).

O consumo alimentar do arroz ocorre, basicamente, na forma de grãos inteiros, sofrendo pequena transformação na agroindústria. No Brasil, esse cereal é consumido principalmente na forma de arroz polido, arroz parbolizado e arroz integral. Porém, existe uma variação maior das formas em que o arroz também é consumido no Brasil e no mundo. Essa diversidade de formas decorre principalmente em função da cultivar produzida ou do processo de beneficiamento (BARATA, 2005).

1.3. Intolerância à Lactose

Intolerância à lactose é ocasionada pela incapacidade ou capacidade limitada que certos indivíduos têm de produzirem a enzima β -galactosidase (também denominada de lactase) no intestino delgado. Consequentemente, a concentração dessa enzima é muito baixa, causando má digestão do dissacarídeo lactose. A enzima lactase se localiza nas microvilosidades do intestino delgado e sua atividade varia conforme a etnia, origem, idade e, possivelmente, o sexo. Quando a taxa de enzima é baixa ou nula (hipolactasia), açúcares não absorvidos osmoticamente atraem ácidos graxos de cadeia curta para o trato intestinal. O volume destes é aproximadamente o triplo do montante previsto baseado na osmose do conteúdo do açúcar sozinho, gerando um aumento de volume do trato gastrointestinal. Os dissacarídeos não conseguem ser absorvidos pela parede do intestino, fazendo com que passem intactos pelo cólon. A lactose não absorvida é fermentada por atividade bacteriana, o que resulta na formação de gases (na sua maioria H_2 , havendo também CO_2 e CH_4), gerando desconfortos abdominais e flatulência. Adicionalmente, em conjunto com outros açúcares não digeridos, como sorbitol, manitol e xilitol, a presença de lactose e sua fermentação aumentam a pressão osmótica no cólon. Outros fatores são conhecidos por influenciarem a má absorção

de lactose: a quantidade de lactose ingerida, os componentes ingeridos junto com o açúcar, a taxa de digestão gástrica, o tempo de trânsito gastrointestinal, entre outros (VRESE et al, 2001; SWARGERTY et al, 2002; LAW et al, 2010).

Uma função vital das bactérias lácticas na microbiota intestinal é produzir a enzima β -D-galactosidase, auxiliando na quebra da lactose no intestino. Essa ação é fundamental, particularmente no caso de indivíduos com intolerância à lactose, os quais são incapazes de digerir a lactose adequadamente, o que resulta em desconforto abdominal em grau variável (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001). Diversas evidências mostraram que o consumo, em quantidades adequadas, de cepas apropriadas de bactérias lácticas (incluindo bactérias lácticas não probióticas, como *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) é capaz de aliviar os sintomas de intolerância à lactose. No entanto, o mecanismo de como o processo ocorre ainda não é bem entendido. Acredita-se que a modificação de pH intestinal, devido à presença de β -galactosidase, pode trazer efeitos positivos sobre as funções intestinais e sobre a microbiota intestinal (ROBERFROID, 2000; KOPP-HOOLIHAN, 2001; HE et al, 2008).

Existem diversos métodos de diagnosticar a intolerância e todos se baseiam no teste de exalação de hidrogênio. Para a realização do teste, os pacientes são expostos a uma leve ingestão de lactose (aproximadamente 25 g) e, em seguida, a sua respiração é examinada. Após 15 a 20 minutos, a quantidade de hidrogênio exalada é medida em ppm, utilizando-se cromatografia gasosa e a intolerância é detectada caso haja um aumento de, pelo menos, 20 ppm, em relação ao padrão. Com relação aos intolerantes, a microbiota intestinal metaboliza a lactose em hidrogênio (H_2) e em ácidos graxos de cadeia curta. O hidrogênio consegue atravessar a mucosa intestinal e ser absorvido pela circulação, onde é expelido pelas vias aéreas. No entanto, diversos autores contestam a eficiência desse tipo de teste, devido à sua baixa precisão (BEYERLEIN et al, 2008; HOVDE & FARUP, 2009; LAW et al, 2010).

HE et al. (2008) verificaram os efeitos da suplementação de *Bifidobacterium animalis* em iogurte sobre a intolerância à lactose em pacientes chineses. Os autores concluíram que esses probióticos foram capazes de modificar a atividade sobre a lactose no trato gastrointestinal, diminuindo, assim, os sintomas de intolerância.

A bebida à base de soja é a principal alternativa para o indivíduo intolerante à lactose, sendo muito consumida mundialmente. Porém, é importante ressaltar que algumas marcas produtoras desse tipo de bebida não possuem em sua composição cálcio e vitamina D. JACKSON e SAVAIANO (2001) concluíram que a maioria dos dados existentes indica a hipótese de que a intolerância à lactose é um fator que contribui para a baixa ingestão de cálcio e, conseqüentemente, a osteoporose. Alguns países em desenvolvimento também têm como tradição e economia, limitar o uso de produtos lácteos fermentados, promovendo o consumo de produtos alternativos (PRADO et al, 2008).

Há vários tipos de classificações da deficiência na enzima lactase. Essa deficiência pode afetar não somente adultos, mas adolescentes e crianças.

1.3.1. Deficiência Primária

Aproximadamente 70% da população mundial sofre com a deficiência primária de lactase. Na America do Sul, África e Ásia a taxa é acima de 50%, podendo alcançar quase 100% em alguns países asiáticos. Nos Estados Unidos, a percentagem é de 15% entre brancos, 53% entre os mexicano-americanos e 80% entre os negros. Em contrapartida, na Europa a percentagem é de 2% na Escandinávia e cerca de 70% na Sicília. Australianos e Neozelandeses têm taxas de 6% e 9%, respectivamente (VEESA et al, 2000).

A deficiência primária é atribuída à relativa ou absoluta ausência de lactase, que se desenvolve durante a infância, variando conforme a idade e raça, sendo a forma mais comum de intolerância à lactose. Estudos revelam que um polimorfismo do RNA mensageiro relacionado à produção de lactase pode ser o responsável pela falta de sua produção. Como sintomas a essa intolerância, estão incluídos a diarreia, dores abdominais, flatulências e náuseas (SWALLOW, 2003; HEYMAN, 2006).

1.3.2. Deficiência Secundária

A deficiência secundária é causada por um dano na mucosa intestinal (geralmente de crianças) e a conseqüente falta de produção de lactase. Esse dano na mucosa intestinal geralmente é causado por doenças, como gastroenterite, Doença de Crohn, desnutrição, crescimento bacteriano excessivo, entre outros (FARIAS & NETO, 2005; HEYMAN, 2006).

Estudos revelam que a maioria dos casos em crianças com gastroenterite aguda não é clinicamente grave. Se, durante episódios de diarreia infecciosa e outras infecções virais, a criança não sofrer desidratação, ela pode, então, seguramente, continuar com a lactação, através de leite e outras fontes de lactose. Em países em desenvolvimento, a desnutrição está associada com a má absorção de lactose e outros carboidratos que, por sua vez, também está relacionada ao crescimento da pobreza nesses países. O tratamento dessa deficiência não requer a eliminação de lactose da dieta. Uma vez resolvido o problema, leite e outros produtos com lactose podem ser consumidos normalmente, pois são excelentes fontes de cálcio e de outros nutrientes essenciais à saúde (HEYMAN, 2006).

1.3.3. Deficiência Neonatal

Ocorre até pelo menos 34 semanas de gestação, quando o trato gastrointestinal é prematuro. Porém, estudos mostram que o consumo de produtos com lactose, ou com teor reduzido do dissacarídeo, não afeta a saúde do recém-nascido. A lactose ingerida pode trazer benefícios ao recém-nascido, como o aumento de bactérias benéficas ao hospedeiro (*Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp.) (HEYMAN, 2006).

1.3.4. Deficiência Congênita

A deficiência congênita é uma rara desordem intestinal que ocorre no recém-nascido. Tão logo a lactose é introduzida ao lactente, uma forte diarreia a sucede. Biópsias revelam o baixo ou nulo teor de lactase no intestino delgado nesses casos. O tratamento consiste na remoção ou substituição da lactose da dieta (HEYMAN, 2006).

1.4. As sobremesas como veículos de probióticos e prebióticos

Os alimentos probióticos estão cada vez mais aparecendo no mercado mundial e diversas pesquisas estão voltadas ao desenvolvimento de novos produtos, tais como leites fermentados e iogurtes. Estes são os principais produtos comercializados no mundo, contendo culturas probióticas. Outros produtos comerciais incluem o leite em pó desnatado para recém-nascidos, sorvetes, sobremesas à base de leite, *frozen yogurts* e, principalmente, laticínios, além de produtos na forma de pó para serem dissolvidos em bebidas frias, alimentos de

origem vegetal e maionese (STANTON et al, 1998; GARDINER et al, 1999; INGHAM, 1999; DAVIDSON et al, 2000; OLIVEIRA et al, 2002; STANTON et al, 2003).

Quanto ao setor de queijos e sobremesas, pesquisas vêm sendo realizadas por nosso grupo de pesquisa, viabilizando a suplementação com culturas probióticas em diversos tipos de produtos, na grande maioria de origem láctea, como queijos minas frescal (BURITI et al, 2005 a, b; BURITI et al, 2007d; SOUZA et al, 2008), queijo fresco cremoso (BURITI et al, 2007 a, b; BURITI et al, 2008), queijo *petit-suisse* (MARUYAMA et al, 2006; CARDARELLI et al, 2007; CARDARELLI et al, 2008b) e sobremesas, como musses e manjar (BURITI et al, 2007c; ARAGON-ALEGRO et al, 2007; CARDARELLI et al, 2008a; CORRÊA et al, 2008; BURITI et al, 2010a,b).

Estudos realizados comprovam que a cultura de *Lactobacillus paracasei*, agindo em combinação com inulina, revelou um efeito vantajoso na musse de chocolate, melhorando as propriedades sensoriais (textura, sabor e consistência), além de enriquecer o produto. Durante o período de refrigeração do produto (28 dias), a população se manteve estável, entre $7,27 \log.\text{ufc.g}^{-1}$ e $7,35 \log.\text{ufc.g}^{-1}$ (ARAGON-ALEGRO et al, 2007; CARDARELLI et al, 2008a). Outro produto que pode ser, de certa maneira, considerado como uma sobremesa láctea é o queijo *petit-suisse*, muito consumido pelo público infantil. Também foi observado que os prebióticos inulina e oligofrutose, em conjunto com as culturas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* e *Lactobacillus acidophilus* transformam o queijo *petit-suisse* em um produto potencialmente simbiótico. Com a presença desses prebióticos a população de *Bifidobacterium animalis* aumentou de 7,20 para $7,69 \log.\text{ufc.g}^{-1}$ e a de *Lactobacillus acidophilus* aumentou de 6,08 para $6,99 \log.\text{ufc.g}^{-1}$, durante o armazenamento refrigerado do produto (CARDARELLI et al, 2007; CARDARELLI et al, 2008b).

Os gelados comestíveis e sorvetes também são produtos com grande potencial como veículo para as culturas probióticas, tendo, ainda, a vantagem de serem consumidos por pessoas de todas as idades. No entanto, para se manter essas culturas viáveis, deve-se controlar alguns fatores, como a escolha adequada da cultura e sua concentração, em qual etapa ela será adicionada ao produto e o estrito controle de temperatura, principalmente durante o transporte do produto. Se confirmados esses cuidados, os gelados comestíveis podem ter a vantagem de

manter a cultura probiótica viável por grande período de tempo, quando comparado a iogurtes e leites fermentados (CRUZ et al, 2009).

Culturas contendo microorganismos probióticos vêm sendo utilizadas também em sobremesas não lácteas. Foi testada a incorporação de culturas probióticas de *Lactobacillus* spp. em uma sobremesa à base de soja congelada e os resultados foram promissores (HEENAN et al, 2004). Para atender um determinado setor da população intolerante à lactose, acredita-se que os próximos alvos dos microrganismos probióticos sejam os alimentos isentos de lactose, ou seja, bebidas à base de frutas e vegetais e sobremesas não lácteas estão ganhando cada vez mais força. Porém, uma das dificuldades encontradas seria como manter a estabilidade dos microrganismos em um produto com alta acidez e pH muito baixo (MATILLA-SANDHOLM et al, 2002; HEENAN et al, 2004; PRADO et al, 2008).

Os desafios enfrentados atualmente no setor estão relacionados, principalmente, com a estabilidade e viabilidade dos microrganismos probióticos nos produtos. Como fazer para as culturas probióticas se manterem o mais estável possível durante a vida de prateleira, ou ainda, qual a cultura mais adequada para determinados produtos. Acredita-se muito no sinergismo entre prebióticos e probióticos, com o objetivo de que o produto resulte em um potencial funcional muito maior (MATILLA-SANDHOLM et al, 2002).

Dentre os suplementos empregados para melhorar a viabilidade de microrganismos probióticos, além dos prebióticos, estão os componentes derivados do leite, como concentrado protéico de soro (WPC – *Whey Protein Concentrate*) e concentrado de caseína (CMP – *Casein Macropeptide*). Esses derivados lácteos têm sido utilizados por pesquisadores na suplementação de alimentos contendo *Bifidobacterium* spp. (BURY et al, 1998; JANER et al, 2004; ANTUNES et al, 2005) e *Lactobacillus acidophilus* (BURITI et al, 2010). Esses componentes contêm nitrogênio disponível para a multiplicação bacteriana e amino-açúcares, como ácido siálico e a N-acetilgalactosamina, que também podem ser fermentados pelos microrganismos probióticos.

Com relação ao mercado, os produtos lácteos ainda dominam o setor de alimentos adicionados de culturas probióticas. De acordo com dados da CARGILL (2009), 33% do mercado de alimentos funcionais é composta de alimentos probióticos lácteos, enquanto que os alimentos à base de cereais compõem 22% desse mercado. Apesar de o iogurte dominar o mercado probiótico, sucos de frutas,

sobremesas e produtos à base de cereal podem ser meios considerados favoráveis à adição de microrganismos probióticos. Essa característica poderá ocorrer, desde que se faça modificações que favoreçam a multiplicação ou sobrevivência desses microrganismos, como ajuste de pH, e que contenham, em sua formulação, componentes como minerais, vitaminas, fibras e antioxidantes (GRANATO et al, 2010).

O desenvolvimento de um produto alimentício à base de arroz e adicionado de nutrientes presentes no leite, como o cálcio e parte de suas proteínas, representa uma alternativa que poderá contribuir com os indivíduos intolerantes à lactose, privados do consumo de leite e de seus derivados, na busca por uma alternativa de alimento para ser consumido como sobremesa. A suplementação desse produto enriquecido com cálcio com culturas *starter* e probióticas, além de ingredientes prebióticos, é deveras promissora, uma vez que também poderá contribuir com o equilíbrio da microbiota intestinal e com a suplementação da dieta com cálcio. Poderá, ainda, resultar na melhoria dos sintomas de má absorção à lactose em indivíduos intolerantes a este açúcar, consequente à produção de enzima β -galactosidase, tanto no produto em si quanto no organismo dos indivíduos intolerantes.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- Desenvolver um produto funcional probiótico e prebiótico (simbiótico), destinado a consumidores portadores de intolerância à lactose;
- Utilizar o arroz como matéria-prima e base nutritiva, devido a sua disponibilidade no mercado e a grande aceitação por parte dos consumidores, e enriquecê-lo, de modo a aumentar o seu valor nutritivo;
- Verificar a influência da inclusão ou não da etapa fermentativa durante a elaboração do produto sobre a viabilidade dos probióticos e as características do produto;
- Avaliar a aceitabilidade do produto sob o ponto de vista sensorial e suas características físico-químicas e microbiológicas durante o seu armazenamento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Ingredientes adicionados à formulação desenvolvida

Por se tratar de um produto novo no mercado brasileiro, e não se ter uma base já formulada no país, planejou-se formular um produto com as características mais próximas possíveis às de um produto lácteo, mantendo os componentes essenciais que ele possui, mas com o mínimo teor de lactose. A farinha de arroz foi utilizada como base da sobremesa, por favorecer o seu preparo. Porém, a retrogradação, em conjunto com a precipitação dos sólidos presentes seria um fator que poderia dificultar a solubilização da farinha, após o preparo da sobremesa (YEH, 2004). Sendo assim, optou-se por utilizar uma farinha de arroz própria para utilização em sobremesas (adicionados de amido de arroz e pó de xarope de arroz), para facilitar o seu preparo (Nutriz ML, Leuven-Wijgmaal, Bélgica).

O procedimento adotado para a produção da sobremesa está de acordo com a formulação de uma sobremesa industrializada comercializada em Singapura (National Starch & Chemical Ltd., Singapura). Entretanto, devido à adição de ingredientes diversos para o seu enriquecimento, houve dificuldade na homogeneização da sobremesa, durante o seu preparo. A consistência do produto se apresentou muito firme e o aroma se apresentou demasiadamente forte.

Durante a realização dos ensaios preliminares, além da procura pela formulação mais adequada, foram testadas, também, diferentes concentrações de cultura probiótica (cultura ABT, composta dos microrganismos probióticos – *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e da cultura starter *Streptococcus thermophilus* – Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca). A ausência ou a presença da etapa de fermentação (a 37 °C/ 2 h), por parte dessas culturas, durante a obtenção da sobremesa, e sua influência sobre as características do produto final também foram estudadas.

Para enriquecer o produto, foram adicionados: cálcio (lactato de cálcio, Purac, AA Gorichem, Holanda), os prebióticos inulina Beneo® GR (Orafti, Oreye, Bélgica) e fruto-oligossacarídeo (FOS) Beneo® P95 (Orafti, Oreye, Bélgica) e isolado protéico de soro (IPS - Lacprodan DI-9224; Arla Foods Ingredients, São Paulo, Brasil - cerca de 90% de proteína – Tabela 3). Foram utilizadas, ainda, as gomas guar e xantana (Grindsted Guar 178 B e Xanthan 80, Danisco, Redhill, Reino Unido), como agentes

espessantes, e sacarose (açúcar refinado especial União, São Paulo, Brasil), conforme descrito na Tabela 4, a qual apresenta a formulação definitiva do produto.

Tabela 3. Composição de aminoácidos presentes no Isolado Protéico de Soro

Aminoácido	mg AA/g prot.
Alanina	47
Arginina	19
Ácido aspártico	110
Cisteína	24
Ácido Glutâmico	167
Glicina	17
Histidina	19
Isoleucina	61
Leucina	102
Lisina	92
Metionina	18
Fenilalanina	30
Prolina	58
Serina	50
Treonina	73
Triptofano	17
Tirosina	37
Valina	59

Fonte: Arla Foods

De acordo com KIM e YOO (2006), a adição de goma xantana, atuando em conjunto com a goma guar, aumenta a gelatinização do produto e, em contrapartida, a retrogradação por parte do amido presente no arroz é diminuída. A sinerese do amido é uma propriedade indesejável, tanto na indústria alimentícia quanto na não alimentícia e, também, pode representar um índice de retrogradação do amido a baixas temperaturas. A sinerese em diferentes variedades de arroz varia entre 22,9% e 46,4% sob armazenamento a 20 °C (WANG et al, 2010).

Tabela 4. Formulação definitiva da sobremesa à base de arroz.

Ingredientes:	g/ 100 g
Farinha de arroz	10,0
Açúcar	2,0
Inulina	2,0
FOS*	2,0
IPS*	1,0
Lactato de cálcio	0,3
Goma Guar	0,3
Goma Xantana	0,3
Água	82,1
Total	100,0

* FOS: Frutooligossacarídeo; IPS: isolado protéico de soro

Para a aromatização do produto, foi necessário o desenvolvimento de um preparado de fruta para ser adicionado ao produto. Foram realizados ensaios preliminares com o sabor de maçã, por apresentar características mais favoráveis ao desenvolvimento do produto, o que posteriormente iria se confirmar durante todo o trabalho. Dessa maneira, a formulação do preparado de maçã foi constituída de suco concentrado de maçã a 45° Brix (Yakult, São Paulo, Brasil), amido modificado (Novation Prima 600 - National Food & Starch; Nova Jersey, EUA), sacarose, e aroma idêntico ao natural de maçã (Vitta Flavor, Barueri, Brasil), conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Formulação definitiva do preparado de fruta sabor maçã empregada para a elaboração das sobremesas.

Ingredientes	g/ 100 g
Suco de Maçã	60,0
Sacarose	37,0
Amido modificado	3,0
Total	100,0

Para a aromatização da sobremesa, foi utilizada a dosagem de 15,0% do preparado de fruta (Fluxograma do processo no item 3.2.) e 0,8% do aroma idêntico ao natural de maçã.

3.2. Elaboração da sobremesa de arroz

O processo de produção da sobremesa se deu em misturador Geiger UMMSK-12 (Geiger, Pinhais, PR, Brasil), de acordo com o processo descrito na Figura 1, a qual ilustra as etapas de elaboração da sobremesa de arroz. A cada produção, foram obtidos 4 kg de sobremesa.

Figura 1: Fluxograma de elaboração da sobremesa de arroz.
*IPS: isolado protéico de soro.

A variável estudada foi a fermentação ou não por parte da cultura ABT (contendo as cepas probióticas La-5 e Bb-12 e a cultura *starter*). Sendo assim, após definida a formulação final, três tratamentos distintos foram testados, em triplicata, a saber:

- **Tratamento 1 (T1):** O produto final foi diretamente resfriado a 4 ± 1 °C;
- **Tratamento 2 (T2):** A mistura foi mantida em estufa a 37 °C por 2 horas, a fim de que ocorresse a sua fermentação prévia, sendo o produto final posteriormente resfriado a 4 ± 1 °C;
- **Tratamento 3 (T3):** Produto controle – sem a adição de cultura – o produto final foi diretamente resfriado a 4 ± 1 °C.

A quantidade de cultura ABT adicionada à sobremesa variou conforme o tratamento, de modo que a concentração no produto final atingisse a concentração mínima recomendada para a sobremesa, no entanto, sem alterar suas características. Desse modo, para T1, adicionou-se 0,5% e para T2, 0,3% de cultura ABT.

3.3. Fabricação do preparado de fruta sabor maçã

Para o preparado de fruta, conforme indicação do fabricante do amido modificado, foi realizado o cozimento do amido modificado em suco concentrado de maçã, por 25 minutos a 90 °C. Em seguida foi adicionada a sacarose até a sua completa solubilização, conforme apresentado na figura 2.

Figura 2: Fluxograma do processo de obtenção do preparado de fruta

3.4. Delineamento experimental

O delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado, utilizando um esquema fatorial 3x4, constituído de 3 tratamentos (T1 = fermentado; T2 = não fermentado; T3 = controle) e 4 tempos (1, 7, 14 e 21 dias após o processamento), com 3 repetições cada.

3.5. Embalagem, armazenamento e períodos de amostragem

A sobremesa foi embalada (em porções de 40g) em potes de polipropileno próprios para alimentos – dimensões 60 mm x 32 mm (diâmetro x altura) (Tries Aditivos Plásticos Ltda., São Paulo, Brasil), previamente sanitizados com hipoclorito de sódio, selados com tampa metálica, em seladora Delgo N° 1968 (Delgo Metalúrgica, Cotia, Brasil) e armazenados sob refrigeração ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$). As determinações dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos foram realizadas em triplicata, após 1 (produto final), 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado. Adicionalmente, as medições de pH também foram realizadas durante a elaboração do produto. A determinação da firmeza do produto foi realizada em quintuplicata nos mesmos períodos que as análises anteriores. A determinação de composição centesimal das sobremesas foi realizada, em triplicata, a partir das amostras

mantidas congeladas a -18 °C e, posteriormente, liofilizadas após congelamento a -60 °C, em liofilizador Edwards L4KR Modelo 118 (BOC Edwards, São Paulo, Brasil), com o sistema de vácuo operando com pressão de 10^{-1} mbar e com a temperatura do condensador mantida em -40 °C. A temperatura final do processo de secagem manteve-se entre 10 e 15 °C.

A análise sensorial da sobremesa foi realizada a partir do 7º dia de armazenamento, e após 14 e 21 dias de fabricação, a partir de produtos mantidos sob refrigeração a 4 ± 1 °C até o momento da análise.

3.6. Análises físico-químicas

Decorridos os períodos de armazenamento descritos no item 3.5, foram realizadas as seguintes análises físico-químicas:

- pH: em medidor de pH Orion, Modelo *Three Stars* (Analyser Comércio e Indústria Ltda., São Paulo, Brasil), empregando-se um Eletrodo tipo Penetração modelo 2AO4 GF (Analyser);
- Textura instrumental: O parâmetro firmeza de textura foi determinado em analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems, Haslemere, Reino Unido), através de teste de compressão simples em 40 g de amostra contidas nas embalagens plásticas, utilizando um cilindro de acrílico de 25 mm de diâmetro (*probe*). Os dados foram coletados através do programa “Texture Expert for Windows” – versão 1.20 (Stable Micro Systems). Para a realização das análises, os seguintes parâmetros foram empregados: amostras de 40 g de sobremesa em embalagens plásticas, distância e velocidade de compressão de 10 mm e 2 mm/s, respectivamente.

3.7. Análises microbiológicas

Decorridos os períodos de armazenamento descritos no item 3.5, foram realizadas, em triplicata, as contagens das populações dos microrganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* e do starter *Streptococcus thermophilus*, presentes na cultura ABT (Christian Hansen) e de possíveis indicadores de contaminação (coliformes e *Escherichia coli*; *Staphylococcus* spp. e bolores e leveduras). Para este fim, porções de 25 g de

produto (em condições de assepsia) foram homogeneizadas em 225 ml de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}), utilizando-se um Bag Mixer (Interscience, St. Nom, França). Diluições subsequentes foram preparadas, utilizando o mesmo diluente.

L. acidophilus foi enumerado, utilizando-se técnica da semeadura em profundidade (*pour plate*). Para tal, 1,0 mL de cada diluição foram transferidas para placas de Petri estéreis e adicionadas de ágar de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) formulado, modificado pela substituição de glicose por maltose, de acordo com INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1995). As placas foram incubadas a 37°C, em aerobiose, por 72 horas, conforme descrito por DAVE & SHAH (1998), VINDEROLA & REINHEIMER (1999) e SHAH (2000).

Para a contagem de *Bifidobacterium animalis*, utilizando-se técnica da semeadura em profundidade, alíquotas de 1 ml de cada diluição das amostras foram transferidas para placas de Petri estéreis. Em seguida, foi adicionado ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), acrescido de propionato de sódio (0,3 mg/mL) e cloreto de lítio (0,2 mg/mL) - ágar MRS-LP, de acordo com LAPIERRE *et al.* (1992) e VINDEROLA & REINHEIMER (1999, 2000). Após a homogeneização e o endurecimento do ágar, as placas foram incubadas a 37°C por 72 horas em anaerobiose (Sistema de Anerobiose Anaerogen, Oxoid), conforme descrito pelos autores citados.

Para a contagem de *S. thermophilus*, alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas posteriormente adicionadas de ágar M17 (Oxoid), adicionado de 5,0% de solução estéril de lactose (Oxoid), fundido e resfriado a 45 °C, conforme instruções do fabricante. Após homogeneização e endurecimento do ágar, as placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas.

Para a enumeração de contaminantes, alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas Petrifilm™ Staph Express (3M Microbiology, St. Paul, MMN, EUA) para a contagem de *Staphylococcus* spp., para placas Petrifilm™ Yeasts and Moulds Count Plates (3M), para a contagem de bolores e leveduras, e para placas Petrifilm™ EC (3M), para a contagem de coliformes e de *E. coli*, todas de acordo com as instruções do fabricante. A incubação das placas Petrifilm™ Staph Express e de Petrifilm™ EC foi realizada a 35°-37°C por 24 e por 48 horas, respectivamente. A incubação das placas de Petrifilm™ YM foi realizada a 25 °C, por 5 dias.

Adicionalmente, a partir de amostras provenientes de cada uma das produções dos 3 tratamentos de sobremesa (T1, T2 e T3) mantidas congeladas, e após os diferentes tempos de armazenamento estudados (7, 14, 21 dias), foram realizadas análises para a verificação de microrganismos patogênicos. Sendo assim, foi efetuada análise microbiológica para a contagem de *Bacillus cereus* e a verificação da presença/ ausência de *Salmonella* spp., de acordo com as exigências da legislação para sobremesas lácteas pasteurizadas e refrigeradas, característica esta que mais se assemelha com a sobremesa do presente trabalho, a qual também estabelece limites para a presença de coliformes a 45 °C (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001). As análises foram realizadas pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. A metodologia adotada nestas análises encontra-se descrita no laudo em anexo.

3.8. Determinação da composição centesimal da sobremesa

As amostras destinadas às análises para a determinação da composição centesimal foram preparadas após o primeiro dia de armazenamento a 4 ± 1 °C após a produção e armazenadas a -18 ± 3 °C, até serem tratadas, conforme procedimento descrito no item 3.5.

As análises de composição centesimal foram realizadas em triplicata a partir de amostras de cada lote produzido. Foram feitas as seguintes determinações, de acordo com as normas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2005) para produtos à base de cereais, amiláceos e extrato solúvel de soja.

- umidade - a partir de 5 g de amostra triturada, a 70 °C, em estufa a vácuo modelo 440/D (Nova Ética, São Paulo, Brasil);
- gordura - através de extração com éter etílico, em Soxhlet;
- proteínas - através de análise do conteúdo de nitrogênio pelo método micro-Kjeldahl, utilizando fator de conversão 5,95; adaptado de ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (2003a,b);
- cinzas - determinada gravimetricamente através de incineração de 2g de amostra a 550 °C, até a eliminação completa de matéria orgânica;
- teor de carboidratos - calculado por diferença para se obter 100% da composição total.

3.9. Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada aos 7, 14 e 21 dias de armazenamento dos produtos a 4 ± 1 °C, conforme descrito no item 3.5, tendo em vista a comparação nos diferentes períodos de armazenamento da amostra. A escolha desses períodos teve como base o período mínimo necessário para a estabilização dos componentes da formulação e para uma possível comercialização de produtos similares disponíveis no comércio (7 dias) e o máximo que garantiria a segurança dos provadores (21 dias). Já o período de 14 dias representou um período intermediário entre os períodos extremos mencionados. Foi empregado o teste de aceitabilidade, utilizando uma escala hedônica de nove pontos, com variação de gostei muitíssimo, ou 9 pontos, a desgostei muitíssimo, ou 1 ponto (LAWLESS & HEYMANN, 1999).

No total, foram realizadas 450 avaliações, distribuídas em 9 períodos de análises, sendo que em cada período participaram 50 voluntários adultos (provadores), de ambos os sexos. Esses voluntários saudáveis eram constituídos de alunos de graduação e de pós-graduação, docentes e funcionários da Universidade de São Paulo e outros voluntários saudáveis dispostos a participar do estudo. Para a triagem dos provadores, foi aplicado o critério de inclusão a saber: possuir entre 18 e 60 anos, de ambos os sexos. Já os critérios de exclusão adotados incluíram: possuir histórico de manifestação de alergia, intolerância a alimentos ou doença crônica (como diabetes, hipotireoidismo, hipertireoidismo, hipertensão ou outras); estar fazendo tratamento médico; estar gripado, resfriado ou indisposto; ter entrado em contato, há menos de 1 hora, com materiais, alimentos ou cosméticos de cheiro forte.

Para a avaliação sensorial dos diferentes tratamentos de sobremesa estudados (T1, T2 e T3), amostras de aproximadamente 40 g, codificadas com 3 algarismos, aleatoriamente, foram oferecidas aos provadores monadicamente. As amostras, acondicionadas em potes devidamente higienizados, foram servidas em 3 períodos distintos (7, 14 e 21 dias). Cada tratamento foi apresentado a 50 provadores não treinados em cada período.

A condução da análise sensorial foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Protocolo CEP número 489 de 2008, em anexo – Anexo III).

3.10. Análise estatística

Todos os resultados foram submetidos a teste de homogeneidade de variância, através do teste de Hartley, Cochran e Bartlett, adotando-se $\alpha=0,05$.

A comparação dos resultados para os parâmetros físico-químicos e microbiológicos entre os diferentes tratamentos para cada período de armazenamento e entre cada período de armazenamento para cada tratamento foi realizada através de análise de variância para medidas repetidas, com posterior aplicação do teste de Tukey HSD, com nível de significância de 0,05 (GOMES et al, 1998; BARROS NETO et al, 2003; CALLEGARI-JACQUES, 2003).

Para os resultados obtidos na análise sensorial, os dados foram avaliados por análise de variância de efeitos principais, com o objetivo de se verificar o consenso entre as respostas dos provadores. A comparação entre as respostas obtidas, para os diferentes tratamentos em cada período de armazenamento e entre os diferentes períodos de armazenamento para cada tratamento, foi realizada a análise de variância por medidas repetidas, utilizando o teste de Tukey e nível de significância de 0,05. Os resultados obtidos foram analisados, utilizando o pacote estatístico Statistica, versão 9.1 para Windows (Statsoft Inc.).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Composição centesimal das sobremesas

A tabela 6 apresenta a composição centesimal da sobremesa simbiótica à base de arroz.

Tabela 6: Composição centesimal e umidade (média $\pm$ desvio padrão)* obtidos para as três tratamentos de sobremesa simbiótica à base de arroz

	T1 (Não Fermentado - %)	T2 (Fermentado - %)	T3 (Controle - %)
Proteínas	1,48 $\pm$ 0,06 ^a	1,3 $\pm$ 0,2 ^a	1,5 $\pm$ 0,8 ^a
Lipídios	**	**	**
Cinzas	0,420 $\pm$ 0,019 ^b	0,467 $\pm$ 0,001 ^c	0,322 $\pm$ 0,001 ^a
Carboidratos	19,0 $\pm$ 0,4 ^b	22,3 $\pm$ 0,5 ^c	17,3 $\pm$ 0,2 ^a
Umidade	79,1 $\pm$ 0,4 ^b	75,8 $\pm$ 0,9 ^a	80,7 $\pm$ 0,1 ^c

* valores médios obtidos em triplicata para cada tratamento da sobremesa à base de arroz.

** os valores obtidos para a determinação de lipídios não são significativos ou são considerados nulos.

^{a,b,c} sobrescritas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes tratamentos.

Com exceção do teor de proteínas, houve grande variação de todos os componentes presentes entre os três tratamentos estudados, o que leva à conclusão de que tanto a incorporação de culturas probióticas quanto à atividade fermentativa realizada por elas poderia ter influenciado na composição centesimal das sobremesas. Com relação às proteínas, ressalta-se que estas foram incorporadas durante a produção, em decorrência da adição do isolado protéico de soro. Apesar da baixa atividade proteolítica dos microrganismos probióticos, apenas uma pequena quantidade de aminoácidos é necessária para garantir a sua multiplicação.

Não foi detectada presença de lipídios na sobremesa, o que aumenta ainda mais o valor agregado do produto e, consequentemente, seu apelo ao consumidor, tendo em vista a procura crescente por alimentos com menor teor de gordura.

Apesar da composição centesimal da sobremesa consistir, em sua maioria, de carboidratos, este pode ser um fator positivo à sobremesa uma vez que, além de serem fonte de energia, a presença de ingredientes prebióticos (FOS e inulina) certamente irá contribuir para o apelo funcional da sobremesa.

4.2. Evolução dos parâmetros físico-químicos ao longo do armazenamento das sobremesas

A Tabela 7 apresenta a evolução dos valores de pH e de firmeza instrumental das sobremesas T1, T2 e T3 – não fermentado, fermentado e controle, respectivamente – durante o armazenamento refrigerado.

A sobremesa T1 (não fermentada) apresentou redução de pH durante os 21 dias de armazenamento, enquanto que T2 (fermentada) e T3 (controle) não diferiram significativamente ($p > 0,01$). Comparando os diferentes tratamentos adicionados da cultura ABT, T2 apresentou valores menores de pH, em relação ao tratamento T1, devido à maior produção de ácido láctico por parte dos microrganismos presentes na cultura ABT, mais especificamente de *S. thermophilus*.

T3 apresentou valores de pH significativamente maiores ($p < 0,01$), quando comparado a T1 e T2. A redução de pH é um processo decorrente da produção contínua de ácido láctico e outros ácidos orgânicos, principalmente pela cultura *starter* de *Streptococcus thermophilus* e, complementarmente, pelas culturas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis*, presentes na cultura ABT. Dessa forma, a atividade fermentativa em T2 certamente contribuiu para a queda de pH da sobremesa, o que prejudicou a multiplicação principalmente da cultura de *L.*

acidophilus (ver item 4.3).

Tabela 7. Valores médios de pH e de firmeza obtidos para os diferentes tratamentos de sobremesa à base de arroz durante o seu armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$

Tratamentos	Armazenamento (dias)	pH*	Firmeza** (N)
T1 (Não fermentado)	1	$4,90 \pm 0,06^e$	$0,55 \pm 0,03^g$
	7	$4,76 \pm 0,02^{bc}$	$0,50 \pm 0,02^f$
	14	$4,83 \pm 0,03^{ce}$	$0,37 \pm 0,02^d$
	21	$4,64 \pm 0,07^a$	$0,30 \pm 0,04^c$
T2 (Fermentado)	1	$4,64 \pm 0,02^{abc}$	$0,45 \pm 0,02^e$
	7	$4,98 \pm 0,01^{abc}$	$0,33 \pm 0,03^c$
	14	$4,63 \pm 0,03^{ab}$	$0,26 \pm 0,03^b$
	21	$4,56 \pm 0,03^{ab}$	$0,23 \pm 0,02^b$
T3 (Controle)	1	$5,24 \pm 0,01^d$	$0,80 \pm 0,03^h$
	7	$5,22 \pm 0,04^d$	$1,01 \pm 0,03^a$
	14	$5,28 \pm 0,03^d$	$1,03 \pm 0,02^a$
	21	$5,27 \pm 0,04^d$	$1,04 \pm 0,03^a$

* Média de 9 repetições; **Média de 15 repetições.

a,b,c...: sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,01$) entre os diferentes tratamentos e períodos de armazenamento.

Adicionalmente, cepas de *Bifidobacterium* são capazes de metabolizar fibras prebióticas como a inulina, resultando na produção de diversos ácidos orgânicos, os quais resultam na diminuição do pH dos alimentos onde essas cepa estão inseridas (MENDOZA et al, 2000; MEYER & STASSE-WOLTHIUS, 2009). Tal fato também pode ter ocorrido no presente trabalho, auxiliando na queda de pH nos tratamentos T1 e T2.

Assim como no presente trabalho, KAILASAPATHY et al (2008) utilizaram em seu estudo com iogurte batido adicionado de frutas apenas a cultura de *Streptococcus thermophilus* como cultura *starter*, não utilizando *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, a qual geralmente é utilizada nos iogurtes comerciais, para auxiliar no processo fermentativo. Segundo os autores, a utilização desta segunda cultura está diretamente relacionada com a diminuição de pH em iogurtes durante o seu armazenamento. No entanto, apesar de não ter sido utilizado *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, foi observada queda de pH na

sobremesa T1, durante o seu armazenamento, possivelmente devido à fermentação contínua por parte da cultura *starter* empregada, apesar de não estarem em condições ótimas para que tal atividade ocorresse.

HELLAND et al (2004) compararam o pH de formulações de pudim de cereal à base de leite e de água e constataram, que apesar da presença de maior quantidade de ácido láctico no pudim à base de leite, a redução de pH foi maior na formulação à base de água, após 21 dias de armazenamento. Os autores sugeriram que esse fato poderia ser atribuído à baixa capacidade tamponante da sobremesa com água. O mesmo pode ter ocorrido no presente trabalho, uma vez que houve grande redução dos valores de pH e este pode ter sido um fator limitante à sobrevivência e/ou multiplicação dos microrganismos probióticos (item 4.3.).

O comportamento da firmeza das sobremesas adicionadas de cultura probiótica foi semelhante ao obtido para o pH. Ambas as sobremesas (T1 e T2) apresentaram diminuição significativa da firmeza ($p < 0,01$) durante os 21 dias de armazenamento. A firmeza de T2 (fermentado) foi relativamente menor que T1, devido ao fato dos microrganismos terem atuado na fermentação, alterando, dessa forma, a estrutura molecular da sobremesa. Para o tratamento T3 (controle), os valores de firmeza observados foram estatisticamente superiores durante todo o período de armazenamento analisado ($p < 0,01$), o que certamente está relacionado aos seus valores significativamente superiores de pH ($p < 0,01$). A presença de inulina nos 3 tratamentos de sobremesa possivelmente contribuiu para a maior firmeza de T3, com valores superiores de pH. O referido ingrediente é capaz de se ligar à água em alimentos, contribuindo para a formação de géis, que, por sua vez, irão contribuir para uma maior firmeza no alimento. A inulina ainda é capaz de interagir com as proteínas do soro do leite, modificando a textura do alimento (GOKAVI et al, 2005; HERCEG et al, 2007).

Por outro lado, os tratamentos T1 e T2 apresentaram um comportamento da firmeza diferente de T3, uma vez que os valores foram menores para as formulações adicionadas de culturas probióticas. Comparando-se essas formulações, observou-se que T2 apresentou valores de firmeza estatisticamente menores ($p < 0,01$) que T1. Tal fato pode estar relacionado à metabolização de glicose no processo fermentativo e, eventualmente, de FOS e inulina, especificamente por parte da cepa de *B. animalis* em T2, resultando na geração de ácidos orgânicos e, conseqüentemente, na redução do pH do produto e, possivelmente na redução da sua firmeza (KAPLAN

& HUTKINS, 2000).

Curiosamente, apesar de T3 (controle) apresentar uma firmeza mais elevada em comparação aos tratamentos adicionados de cultura probiótica, seu teor de umidade foi significativamente maior ($p < 0,05$), principalmente quando comparado ao tratamento T2 (fermentado), indicando, dessa maneira, um maior potencial de retenção de água para o tratamento controle.

A percepção pelo alimento não somente é caracterizada por fatores como o olfato, paladar e sensações de textura, mas sim a interação de todos esses fatores, aliado ao valor nutricional, contribui para a imagem e qualidade transmitida ao consumidor. As definições da textura são importantes, no sentido de se compreender os efeitos que cada ingrediente possui em determinado alimento (LOBATO et al, 2009; TOURNIER et al, 2009). Segundo FOX et al (2000), a firmeza é a força necessária para realizar uma determinada deformação, podendo ser definida também como a força requerida para comprimir o alimento entre os dentes molares ou entre a língua e o palato.

Em alimentos, os agentes utilizados com a função de espessar, estabilizar, encorpar, conferir viscosidade, elasticidade e dar textura são geralmente as gomas, também chamadas de hidrocolóides (MARUYAMA et al, 2006). No queijo *petit-suisse* potencialmente probiótico testado pelos autores, foram utilizadas duas gomas que atuam em sinergismo, conferindo maior característica de corpo ao produto.

A goma xantana funciona muito bem como estabilizante em produtos à base de água, já que é uma goma solúvel e altamente higroscópica; também possui comportamento pseudoplástico quando em solução, capaz de manter estáveis o pH, a maciez e a estética visual do produto (KATZMAUER, 1998). A goma guar é capaz de formar soluções viscosas com alta capacidade de retenção de umidade, de estabilizar suspensões, evitando a depreciação (MUNHOZ et al, 2004).

4.3. Comportamento dos microrganismos probióticos e da cultura *starter* ao longo do armazenamento das sobremesas

As Tabelas 8 e 9 mostram a evolução das populações médias e respectivos desvios-padrões de *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*, durante os 21 dias de armazenamento das sobremesas T1 e T2 a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

Tabela 8. Viabilidade* de *Bifidobacterium animalis* nas sobremesas T1 e T2, durante o seu armazenamento a 4±1°C.

Dias	População de <i>Bifidobacterium animalis</i> (log UFC/g)	
	Sobremesas	
	T1 (Não fermentada)	T2 (Fermentada)
1	8,73 ± 0,10 ^{Ad}	8,84 ± 0,01 ^{Ad}
7	8,23 ± 0,08 ^{Ac}	8,51 ± 0,08 ^{Bc}
14	7,99 ± 0,12 ^{Ab}	8,17 ± 0,05 ^{Bb}
21	7,80 ± 0,18 ^{Aa}	8,08 ± 0,06 ^{Ba}

* Médias de 3 repetições

^{A,B} sobrescritas maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05) entre as diferentes sobremesas.

^{a,b} sobrescritas minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes períodos de armazenamento de cada sobremesa.

Tabela 9. Viabilidade* de *Lactobacillus acidophilus* nas sobremesas T1 e T2, durante armazenamento a 4±1°C

Dias	População de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (log UFC/g)	
	Sobremesas	
	T1 (Não fermentada)	T2 (Fermentada)
1	8,15 ± 0,16 ^{Bd}	7,75 ± 0,16 ^{Ad}
7	7,87 ± 0,09 ^{Bc}	7,30 ± 0,20 ^{Ac}
14	7,66 ± 0,13 ^{Bb}	6,80 ± 0,11 ^{Ab}
21	6,98 ± 0,29 ^{Ba}	5,84 ± 0,11 ^{Aa}

* Médias de 3 repetições

^{A,B} sobrescritas maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05) entre as diferentes sobremesas.

^{a,b} sobrescritas minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes períodos de armazenamento de cada sobremesa.

A população de *B. animalis* foi significativamente mais elevada (p<0,05) para a sobremesa fermentada (T2) entre os dias 7 e 21. Para cada sobremesa, quando considerada individualmente, houve uma diminuição significativa (p<0,05) de

aproximadamente 0,8 log ufc/g da população para o produto fermentado (T2) ao longo do armazenamento. Já para o produto não fermentado (T1), essa diminuição foi de praticamente 1 ciclo log após 21 dias de armazenamento, tendo sido significativa ($p < 0,05$). Os resultados apontam uma possível melhor adaptação por parte da cultura de *B. animalis* em T2 (fermentado).

Ao contrário do que ocorreu para *B. animalis*, as populações de *L. acidophilus* foram significativamente inferiores ($p < 0,05$) para as sobremesas fermentadas (T2) em todos os períodos analisados. A diminuição foi significativa para ambas as sobremesas, ao longo do armazenamento. Em T1, a população do microrganismo se manteve acima de 6,0 log UFC/g durante todo o período de armazenamento, o que não ocorreu a partir do 21º dia em T2, cuja população foi bem reduzida (5,84 log UFC/g).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina que a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 8,00 a 9,00 log UFC na recomendação diária do produto pronto para consumo (ANVISA, 2008). Desse modo, com o consumo de 110 g de sobremesa consegue-se chegar a esta quantidade, com exceção de T2 no dia 21 de armazenamento.

A Tabela 10 mostra a evolução das populações médias e respectivos desvios-padrões de *Streptococcus thermophilus*, durante os 21 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C das sobremesas T1 e T2.

Tabela 10. Viabilidade* de *Streptococcus thermophilus* nas sobremesas T1 e T2, durante armazenamento a 4 ± 1 °C

Dias	População de <i>Streptococcus thermophilus</i> (log UFC/g)	
	Sobremesas	
	T1 (Não fermentada)	T2 (Fermentada)
1	$8,95 \pm 0,11^{Aa}$	$8,87 \pm 0,05^{Aa}$
7	$8,56 \pm 0,13^{Ab}$	$8,32 \pm 0,22^{Bb}$
14	$8,45 \pm 0,11^{Ac}$	$8,31 \pm 0,33^{Abc}$
21	$8,22 \pm 0,05^{Ad}$	$8,05 \pm 0,19^{Bc}$

* Médias de 3 repetições

^{A,B} sobrescritas maiúsculas distintas na mesma linha indicam

diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes sobremesas.

^{a,b} sobrescritas minúsculas distintas na mesma coluna indicam

diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes períodos de armazenamento de cada sobremesa.

Embora tenham sido detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as sobremesas nos dias 7 e 21 de armazenamento quanto à viabilidade da cultura *starter*, essas diferenças são de pouca importância microbiológica, uma vez que eram de apenas 0,17 e 0,24 log. Em todos os períodos de armazenamento, a população se manteve acima de 8,0 log UFC/g, indicando boa viabilidade do microrganismo em ambos os tratamentos.

A cultura *starter* de *Streptococcus thermophilus* é largamente utilizada na produção de leites fermentados, em virtude de sua capacidade de produção de ácido láctico, consequente à quebra da lactose, além de contribuir com as propriedades sensoriais do produto. Algumas cepas de bactérias lácticas requerem fontes exógenas de peptídeos para a sua multiplicação, uma vez que não são capazes de sintetizar diversos aminoácidos. No caso de microrganismos probióticos, quando em co-cultura com *S. thermophilus*, são estimulados pela cultura *starter*, uma vez que as cepas probióticas possuem baixa atividade proteolítica (KOMATSU et al, 2008; GALIA et al, 2009).

Com a finalidade de agrupar os diferentes dados obtidos, a Figura 3 ilustra os resultados obtidos para viabilidade dos microrganismos contidos na cultura ABT, bem como o pH da sobremesa à base de arroz.

Figura 3. Populações de La-5, Bb-12 e *S. thermophilus* obtidas em sobremesa à base de arroz T1 (não fermentada) e T2 (fermentada), durante o período de armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ e respectivos valores de pH. BB = Bb-12; LA = La-5; ST = *S. Thermophilus*

Os resultados obtidos revelaram que *Bifidobacterium animalis* apresentou maior viabilidade, em comparação à cultura de *Lactobacillus acidophilus*, em ambas as sobremesas (T1 e T2). Os microrganismos presentes na cultura ABT apresentaram diferentes adaptações à sobremesa de arroz, uma vez que *B. animalis* teve melhor adaptação em T2 (fermentado), enquanto a cepa de *L. acidophilus* sobreviveu melhor em T1 (não fermentado). As maiores populações observadas para *B. animalis* para T1 e T2, quando comparadas às populações de *L. acidophilus* podem estar relacionadas às presenças dos ingredientes prebióticos (inulina e FOS), que podem ser fermentados facilmente por *B. animalis*. Por outro lado, *L. acidophilus* possuem menor capacidade de fermentar tais compostos (KAPLAN & HUDKINS, 2000; NORIEGA et al, 2004; MAKRAS & DE VUYST, 2006).

A escolha da cepa é essencial para que se obtenha uma boa viabilidade probiótica durante toda a vida de prateleira de um produto específico, além de ser diretamente responsável pelas propriedades sensoriais do produto. Para a manutenção dessas cepas, é fundamental o conhecimento dos nutrientes disponíveis que serão consumidos pelos microrganismos, fatores de inibição e de crescimento, o tempo de fermentação e a temperatura de armazenamento do produto, entre outros (SACARRO et al, 2009).

Diversos autores reportaram que um dos mais importantes fatores que contribuem para a perda da viabilidade de células é a queda de pH durante o armazenamento (pós-acidificação) e o consequente aumento de ácidos orgânicos (SHAH, 2000; KAILASAPATHY et al, 2008). No presente trabalho, de fato houve o decréscimo do pH durante o armazenamento, o que acarretou na queda de viabilidade de ambas as culturas probióticas, sendo mais acentuado com relação ao *L. acidophilus*.

A suplementação do produto com determinados ingredientes, como o isolado protéico de soro, pode aumentar essa capacidade de sobrevivência e/ou multiplicação das culturas probióticas (BURY et al, 1998). Apesar da baixa concentração de IPS na sobremesa, sua presença pode ter aumentado a sobrevivência principalmente de *B. animalis* presente na sobremesa.

O estresse sofrido pela cepa probiótica frente a diferentes condições, como a adaptação à liofilização, a formulação do alimento ao qual ela será exposta e durante a passagem pelo trato gastrointestinal humano devem ser levados em consideração para a manutenção da viabilidade da cepa probiótica, quando

adicionada em determinado alimento (SAARELA et al, 2009). Sabe-se que a resistência à passagem através do trato gastrointestinal é um dos requisitos básicos para o microrganismo probiótico. Segundo MARAGKOUidakis et al (2006), o pH do estômago humano varia de 1, durante o jejum, a 4,5, após as refeições e cuja digestão pode durar 3h. Ainda segundo os autores, cepas de *Lactobacillus* possuem pH ótimo de sobrevivência em torno de 4,6, valor este ligeiramente inferior ao apresentado pelas sobremesas aqui desenvolvidas.

A utilização da cultura ABT pode ser vantajosa, no sentido de se obter interações de duas ou mais cepas, resultando, por exemplo, no aumento da sobrevivência à passagem pelo trato gastrointestinal. Dessa maneira, é importante o estudo dessas interações entre diversos microrganismos, na escolha das cepas a serem inoculadas em determinados produtos. No entanto, VINDEROLA et al (2002), testaram 48 culturas diferentes de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium* spp. Os autores observaram que, de uma maneira geral, os microrganismos probióticos estudados revelaram apresentar maiores efeitos inibitórios entre si, frente às culturas *starter* testadas. Dentre os microrganismos probióticos estudados pelos pesquisadores, *L. acidophilus* se mostrou mais sensível, tendo sido inibido, em maior ou menor grau, por todas as cepas de *Bifidobacterium* estudadas.

Para melhorar a viabilidade das culturas probióticas empregadas na elaboração das sobremesas no presente trabalho, particularmente de *L. acidophilus* La-5 na sobremesa fermentada (T2), a microencapsulação das cepas probióticas poderia ser um processo vantajoso. Adicionalmente, de acordo com DEL PIANO et al (2010), este processo permite uma diminuição em cinco vezes da quantidade de culturas probióticas necessárias para se obter a mesma quantidade de células ao final da passagem pelo trato gastrointestinal.

Já HOMAYOUNI et al (2008) analisaram o efeito da microencapsulação de culturas de *L. casei* e *B. lactis* Bb-12 em sorvete não fermentado contendo amido resistente e comparou suas viabilidades em relação à cultura sem a crioproteção. Semelhante ao presente trabalho, a cultura de Bb-12 apresentou-se mais resistente, em comparação ao gênero *Lactobacillus* que, ao final do armazenamento, apresentou-se abaixo do limite estabelecido pela legislação. No entanto, com a microencapsulação, a sobrevivência de ambas culturas foi aumentada em cerca de

30% durante o mesmo tempo de armazenamento, nas mesmas condições. Todavia, são necessários estudos detalhados com relação à combinação pre/probiótico a ser utilizado, além da estabilidade que a parede da microcápsula irá exercer sobre os microrganismos (DING & SHAH, 2009). Outro ponto a ser estudado envolve, também, questões ambientais e a saúde do hospedeiro consumidor do alimento contendo essas microcápsulas (ROKKA & RANTAMÄKKI, 2010).

Para o caso de produtos adicionados de frutas, como, por exemplo, a adição de suco concentrado de maçã no presente trabalho, deve-se planejar a escolha da mesma, uma vez que diversas frutas podem inibir a multiplicação de microrganismos probióticos. KAILASAPATHY et al (2008) verificaram a viabilidade dessas cepas probióticas em iogurte batido com preparados de diferentes frutas (manga, frutas vermelhas, morango e maracujá – natural, sem conservantes) por 35 dias. Todas as formulações testadas apresentaram populações de probióticos acima de 6 a 7 log UFC/g. Dessa forma, considerando um consumo de 100 g de iogurte, atingiu-se o mínimo recomendado de La-5 e Bb-12,. Contudo, a adição do preparado de fruta sabor frutas vermelhas e maracujá afetou a viabilidade de La-5 no iogurte, em comparação com o iogurte natural, havendo queda de aproximadamente 1 log UFC/g na primeira semana. O mesmo ocorreu com a musse adicionada de *L. acidophilus*, onde o suco concentrado de maracujá, mesmo quando neutralizado, prejudicou a sobrevivência da cultura no produto, adicionado ou não de inulina, para a musse refrigerada a 4 °C. Por outro lado, a presença de goiaba nas musses, em substituição ao maracujá, possibilitou a sobrevivência do probiótico (BURITI et al, 2007c).

A incorporação de ar durante o batimento pode afetar a multiplicação dos microrganismos probióticos, uma vez que eles são anaeróbios estritos, como o *Bifidobacterium animalis*, ou facultativos, caso do *Lactobacillus acidophilus*. O mesmo efeito pode se justificar em relação ao presente trabalho, uma vez que foi utilizado preparado de fruta (maçã), seguido de agitação e consequente incorporação de ar no produto. Ressalta-se que o preparado utilizado no presente trabalho é da própria fruta – maçã e sem a presença de nenhum conservante, o que poderia causar algum efeito prejudicial sobre a multiplicação e sobrevivência das cepas probióticas estudadas, que de fato não ocorreu.

Bifidobacterium spp. pode ser estimulado através da suplementação com diversos aminoácidos, como arginina, isoleucina, ácido glutâmico, triptofano, tirosina,

cisteína e valina. Geralmente, esses aminoácidos estão presentes em quantidades insuficientes para estimular a multiplicação da cepa ou em cadeias polipeptídicas curtas (MARGARIÑOS et al, 2007). A presença do isolado protéico de soro na sobremesa desenvolvida certamente contribuiu para a multiplicação do probiótico, uma vez que ele possui todos esses aminoácidos essenciais (Tabela 3 – item 3.1.), ao passo que, originalmente, a sobremesa de arroz não possui esses nutrientes, ao contrário do leite.

Os benefícios à saúde sobre a utilização de *Streptococcus thermophilus* vêm sendo amplamente discutidos. Alguns estudos revelaram que microrganismos com algum efeito benéfico substancial à saúde, quando administrados vivos devem ser considerados probióticos, independentemente de sua sobrevivência no trato gastrointestinal. Dessa forma, *S. thermophilus* seria considerado probiótico (REID et al, 2003). Na cultura ABT, *S. thermophilus* é a única cepa fermentadora, ao contrário do que geralmente é utilizado na fermentação de iogurtes, ocorrendo também fermentação por parte da cepa de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, sendo esta mais proteolítica que as três cepas presentes na cultura ABT, segundo SHIHATA e SHAH (2000).

4.4. Microrganismos indicadores de contaminação

A presença de coliformes totais não foi detectada nas sobremesas em nenhum período de armazenamento, exceto ao 14^o dia de armazenamento para uma das produções da sobremesa T2 (fermentada), a qual revelou uma população de 1 log UFC/g (Tabela 11). *Escherichia coli* não foi detectada em nenhuma das amostras coletadas durante o armazenamento de 3 ensaios de sobremesa de arroz T1, T2 e T3.

Como o produto sobremesa à base de cereais não é caracterizado pela legislação, foi utilizado como critério a sua similaridade, em natureza e processamento com outros produtos que se enquadram nos padrões estabelecidos pela legislação. Dessa forma, a sobremesa analisada está abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação referente a produtos à base de cereais, farinhas e amidos, a qual estabelece limites para coliformes a 45 °C – máximo 5x10⁶ UFC/g e ausência de *Salmonella* spp.

Tabela 11. Coliformes totais detectados nas sobremesas T1, T2 e T3, durante armazenamento a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$

Dias	População de coliformes totais (log UFC/g)					
	Sobremesas					
	T1 (Não fermentado)		T2 (Fermentado)		T3 (Controle)	
	Média	Variação ¹	Média	Variação ¹	Média	Variação ¹
1	<1	-	<1	-	<1	-
7	<1	-	<1	-	<1	-
14	<1	-	1,00*	<1 – 1,00	<1	-
21	<1	-	<1	-	<1	-

* Média das amostras positivas analisadas – total de 3 ensaios.

¹ Valores mínimos – máximos das contagens obtidas para todas as amostras analisadas.

- = sem variação.

As bactérias indicadoras de contaminação, assim como as patogênicas, provavelmente foram inibidas devido à redução de pH, aliado à boas práticas de processamento (GMP) empregadas durante a elaboração e a embalagem dos produtos. A redução de pH e o aumento da acidez durante o armazenamento é um processo natural causado pela contínua produção de ácido lático e outros ácidos orgânicos, por parte da cultura *starter* de *S. thermophilus*. Estudos conduzidos por BURITI et al (2007b) determinaram que uma grande taxa de acidificação foi observada em queijo fresco cremoso adicionado de cultura probiótica de *Lactobacillus paracasei*, que em co-cultura com *Streptococcus thermophilus*, apresentou efeitos inibitórios contra contaminantes no produto, com e sem a adição de inulina. Em diversos outros estudos, culturas do gênero *Lactobacillus* utilizadas isoladamente ou em co-cultura com outras cepas de bactérias lácticas apresentaram efeitos inibitórios sobre a multiplicação de coliformes e de microrganismos patogênicos, como *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., entre outros (SAMESHIMA et al, 1998; SAKHARE & NARASIMHA, 2003; COUEURET et al, 2004).

Staphylococcus spp. foram detectadas apenas em T1 (não fermentado) ao 14º dia de armazenamento (Tabela 12). Não foram detectadas contagens de *Staphylococcus* spp. nas sobremesas T2 e T3, durante todo o período de armazenamento.

Tabela 12. *Staphylococcus* spp. detectados nas sobremesas T1, T2 e T3, durante armazenamento a 4±1 °C

Dias	População de <i>Staphylococcus</i> spp. (log UFC/g)					
	Sobremesas					
	T1 (Não fermentado)		T2 (Fermentado)		T3 (Controle)	
	Média	Variação ¹	Média	Variação ¹	Média	Variação ¹
1	<1	-	<1	-	<1	-
7	<1	-	<1	-	<1	-
14	1,48*	<1 - 1,48	<1	-	<1	-
21	<1	-	<1	-	<1	-

* Média das amostras positivas analisadas

¹ Valores mínimos – máximos das contagens obtidas para todas as amostras analisadas.

- = sem variação.

Segundo CHARLIER et al (2009), *Staphylococcus aureus* pode se multiplicar em diversos ambientes e sua contaminação em alimentos geralmente ocorre em matérias primas (principalmente de refeições e leites fermentados), em ambientes (plantas) de processamento ou da manipulação de alimentos durante o seu processamento. O pH ótimo para seu desenvolvimento é próximo ao neutro e diversos outros fatores podem inibir a sua multiplicação, como a produção de peróxido de hidrogênio, por parte de cepas de *Lactobacillus*.

Metabólitos antimicrobianos, como ácidos orgânicos, ácidos graxos de cadeia curta, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas são alguns dos exemplos de produtos metabólicos nas quais há estudos referentes à inibição de potenciais microrganismos patogênicos (THARMARAJ & SHAH, 2009; MILLETTE et al, 2007). Entretanto, a baixa tolerância de *L. acidophilus* e *B. animalis* em condições aeróbicas desfavorece a sua multiplicação, havendo a consequente redução na inibição de patógenos, indicando, claramente, que a condição de aerobiose pode afetar determinadas bactérias probióticas na produção de compostos inibitórios (THARMARAJ & SHAH, 2009).

Para as sobremesas T1 (não fermentada) e T2 (fermentada) foram encontrados bolores e leveduras em alguns períodos de armazenamento, conforme mostra a Tabela 13. Na sobremesa T3 (controle), esses contaminantes não foram detectados em nenhum período de armazenamento. O aparecimento de bolores e leveduras pode ser decorrente de sua presença no ambiente durante a fabricação,

das matérias primas ou da própria embalagem. Entretanto, ressalta-se que no controle, produto menos manipulado, não foram detectadas contagens, enquanto que no produto fermentado, onde se aguardou a fermentação a 37 °C por 2 horas, essa contaminação foi ligeiramente maior. De qualquer modo, as contagens de bolores e leveduras se mantiveram abaixo do limite estabelecido pela legislação (ANVISA, 2001), durante todo o período de armazenamento para todas as sobremesas produzidas neste trabalho.

Ressalta-se que todas as sobremesas produzidas no presente trabalho foram elaboradas de acordo com as boas praticas de fabricação, havendo amplo controle de higiene dos utensílios empregados e da manipulação das matérias-primas e da sobremesa propriamente dita, durante todo o processamento.

Adicionalmente, não foi detectada a presença de *Bacillus cereus* e *Salmonella spp.* em nenhuma das amostras de sobremesa analisadas durante os 21 dias de armazenamento, de acordo com o laudo das análises realizadas pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Laudos das análises em anexo – Anexos V e VI).

Tabela 13. Viabilidade de bolores e leveduras nos tratamentos de sobremesa T1, T2 e T3, durante armazenamento a 4±1°C

Dias	População de bolores e leveduras (log UFC/g)					
	Sobremesas					
	T1 (Não fermentado)		T2 (Fermentado)		T3 (Controle)	
	Média	Variação	Média	Variação	Média	Variação
1	1,00*	<1 - 1	1,74*	1,00 - 1,78	<1	-
7	<1	-	1,35*	<1 - 1,60	<1	-
14	1,18*	<1 - 1,60	1,60*	1,00 - 1,95	<1	-
21	<1	-	<1	-	<1	-

* Média das amostras positivas analisadas.

¹ Valores mínimos – máximos das contagens obtidas para todas as amostras analisadas.

- = sem variação.

4.5. Análise Sensorial

Os valores de aceitabilidade obtidos através da análise sensorial apresentam-se na Tabela 14. Os resultados revelaram que houve boa aceitação por parte dos voluntários, uma vez que as notas se mantiveram em torno de 7 (gostei regularmente – com exceção a T3 ao 14º dia de armazenamento).

Tabela 14. Notas de aceitabilidade da sobremesa de arroz, coletadas através de análises sensoriais durante o período de armazenamento

Ensaio	Armazenamento (dias)		
	7	14	21
	Nota $\pm$ DP	Nota $\pm$ DP	Nota $\pm$ DP
T1 (Não Fermentado)	6,9 $\pm$ 1,2 ^{ab}	7,0 $\pm$ 1,4 ^{ab}	7,1 $\pm$ 0,8 ^{ab}
T2 (Fermentado)	7,2 $\pm$ 1,1 ^b	7,2 $\pm$ 1,1 ^b	7,2 $\pm$ 0,8 ^b
T3 (Controle)	7,1 $\pm$ 1,3 ^{ab}	6,4 $\pm$ 1,3 ^a	7,4 $\pm$ 1,0 ^b

^{a,b} sobrescritas distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes formulações e entre os diferentes períodos de armazenamento.

Entre as formulações analisadas, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras T2 (fermentado) e T3 (controle) ao 14º dia de armazenamento a 4 ± 1 °C, indicando uma maior aceitação para o tratamento T2, adicionado de culturas probióticas, em comparação ao tratamento controle. Com relação ao tempo de armazenamento, também houve diferença significativa para o T3, entre o 14º e 21º dia de armazenamento ($p < 0,05$). Nos demais períodos, a aceitabilidade de todas as formulações não diferiu significativamente ($p > 0,05$). Sendo assim, a etapa de fermentação não influenciou na aceitação da sobremesa, segundo os voluntários participantes da análise sensorial. A evolução das notas dos diferentes tratamentos de sobremesa ao longo do tempo é ilustrada graficamente na Figura 4.

Figura 4: Resultados de aceitabilidade obtida na análise sensorial de sobremesa simbiótica à base de arroz (nota 1 = desgostei muitíssimo; nota 9 = gostei muitíssimo), após 7, 14 e 21 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C

Diante dos resultados obtidos, de uma maneira geral, a sobremesa T2 (fermentada) foi a que apresentou maiores quantidades de notas entre 6 (gostei ligeiramente) e 9 (gostei muitíssimo), totalizando 96,1% das notas atribuídas à sobremesa, somando-se os três períodos de análise. As sobremesas T1 e T3 obtiveram, respectivamente, 92,8% e 85,6% do total das notas nessa faixa. Curiosamente, a sobremesa T3 obteve o maior número de notas 6 (17,6%) e 9 (7,2%), enquanto que a sobremesa T1 obteve o maior número de notas 7 (gostei regularmente – 47,1%) e a sobremesa T2, o maior número de notas 8 (gostei muito – 35,9%), conforme pode ser observado na Figura 5.

Figura 5: Distribuição das notas atribuídas para os diferentes tratamentos avaliados

Atualmente, os trabalhos publicados e os dados da literatura detectados não estão voltados para o estudo e influência da fermentação na aceitação de quaisquer tipos de alimentos. Esse fato tornou muito difícil a comparação da sobremesa aqui desenvolvida com outros produtos alimentícios, tantos convencionais quanto na área de alimentos funcionais. A fermentação é uma das mais antigas tecnologias e deveria ser melhor estudada, uma vez que é capaz de trazer inúmeros benefícios. Entre os benefícios que merecem destaque, podem ser citados a preservação do alimento, a sua fortificação nutricional, o desenvolvimento de suas características sensoriais e sua capacidade de influenciar a microbiota intestinal (MOTARJEMI, 2002; WAGAR et al, 2009; SMID & HUGENHOLTZ, 2010).

Assim como no presente trabalho, HEENAN et al (2004) relataram que a sobremesa não láctea à base de soja contendo culturas probióticas de *L. acidophilus* por eles estudada não diferiu da formulação sem cultura (controle). No entanto, quando adicionados de *S. boulardii*, além desses microrganismos não sobreviverem durante o período de armazenamento, suas características sensoriais foram consideradas inferiores, quando comparado com o controle. Seguindo na linha dos alimentos não lácteos, RÖßLE et al (2010) avaliaram a aceitabilidade de maçã em rodela adicionada de culturas de *L. rhamnosus* e não foram detectadas diferenças, em comparação com a fruta *in natura* sem o probiótico. Por outro lado, em análise realizada por LUCKOW & DELAHUNTY (2004) com suco de laranja, houve diferença entre os sucos adicionados de ingredientes funcionais (oligofrutose e *Lactobacillus* GG), em comparação com sucos de laranja puros e tropicais (adicionados de outras

frutas).

Além disso, não se deve esquecer que a sobrevivência dos microrganismos probióticos durante o processamento do produto e o apelo sensorial aos consumidores é fundamental para o sucesso do desenvolvimento de um produto. O impacto em suas características, ao se adicionar culturas probióticas em bases não lácteas ainda não está bem definido. Entretanto, há evidências relatando a preferência dos consumidores por produtos menos ácidos, como sorvetes, em detrimento a iogurtes, cuja acidez é mais elevada (CHRISTIANSEN et al, 1996; HEENAN et al, 2004; GRANATO et al, 2010).

As interações entre culturas probióticas e *starter* geralmente resulta em alterações na qualidade do produto, com relação à sua forma original. A cultura ABT, utilizada no presente trabalho para a produção das sobremesas T1 e T2, composta de *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* e *Streptococcus thermophilus*, tem como característica amenizar o sabor ácido oferecido pelas culturas isoladas (SAARELA et al, 2000). BURITI et al (2007d) utilizaram a cultura ABT na produção de queijo minas frescal, co-atuando com o ácido láctico, em substituição à cultura mesofílica tipo O (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), tradicionalmente utilizada na produção do queijo minas frescal. Os resultados mostraram que a maior aceitação foi direcionada ao queijo com menor sabor ácido. Na sobremesa à base de arroz, no entanto, a textura e o pH aparentemente não influenciaram na aceitação do produto, de uma maneira geral.

A presença de FOS e inulina na sobremesa de arroz também pode ter influenciado positivamente na aceitação do produto, uma vez que em todas as formulações testadas, esses ingredientes foram adicionados. Diversos estudos apontam para a melhora na qualidade sensorial, após a adição desses ingredientes, tanto em sobremesas fermentadas, como no caso do queijo *petit-suisse* (CARDARELLI et al, 2008b), quanto em não fermentadas, como por exemplo nas musses de chocolate e goiaba potencialmente simbióticos (CARDARELLI et al, 2008a; BURITI et al, 2010b).

Figura 6: Frequência das notas obtidas para as sobremesas T1 (não fermentada), T2 (fermentada) e T3 (controle) na análise sensorial por período (7, 14 e 21 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C)

Considerando cada tratamento individualmente, a sobremesa T2 apresentou, embora não significativamente ($p > 0,05$), uma tendência de melhor aceitação ao 7º e 14º dia. Já no 21º dia de análise, a amostra T3 foi a que obteve melhor resultado quanto à aceitação. A sobremesa T1 apresentou grande tendência para a nota 7

(gostei regularmente) nos 3 períodos de análise sensorial, tendo esta uma diferença de 25%, 18% e 19% em relação à segunda maior nota de seus respectivos períodos (7, 14 e 21 dias). Já com relação à formulação T2, os resultados se distribuíram de maneira mais homogênea entre as notas 7 (gostei regularmente) e 8 (gostei muito), aos dias 7 e 14; e entre 6 (gostei ligeiramente) e 7 (gostei regularmente) ao 21º dia. A formulação controle foi considerada a mais irregular, tendo 57% das notas totais atribuídos à nota 7, ao 7º dia de armazenamento. Ao 14º dia, as notas foram distribuídas entre 7 (37%) e 8 (43%), o que não aconteceu no último período de análise (Dia 21), onde a grande maioria das notas foram equivalentes a 8 (41%). Esse resultado indica que para a amostra T3, o tempo de armazenamento favoreceu a sua aceitação, o que não aconteceu com as amostras adicionadas de cultura probiótica. Destas, T1 se apresentou mais estável à nota 7, e T2 apresentou tendência à diminuição de sua aceitação ao longo do tempo (Figura 6).

O atributo “sabor” foi a característica mais citada pelos voluntários como sendo a preferida na sobremesa à base de arroz, nas três formulações oferecidas na análise sensorial (Figura 7). A etapa de fermentação e a adição das culturas probióticas não interferiram na aceitação da sobremesa. Com relação ao sabor, grande parcela dos provadores destacou o sabor natural de maçã e o dulçor como características preferidas. O atributo “odor” também foi citado como um fator positivo para a sobremesa, ressaltando que foi adicionado aroma idêntico ao natural de maçã. Em nenhum momento, foi citada a presença de sabor ou odor residual do arroz na sobremesa. Ressalta-se, também, que na ficha apresentada aos provadores não foi descrito o termo “sobremesa à base de arroz”, com o objetivo de não influenciar os provadores quanto à presença de arroz no produto, no momento da análise.

Por outro lado, os atributos “textura” e “aparência” foram os mais citados como características negativas na sobremesa. Segundo os provadores, a textura da sobremesa foi considerada muito fluída. Isso ocorreu devido à diminuição de goma em sua formulação, uma vez que nos ensaios preliminares, a sobremesa se apresentou com aspecto heterogêneo, dificultando a solubilização dos demais ingredientes, inclusive da cultura probiótica liofilizada. Tanto em produtos fermentados quanto em não fermentados, a textura pode ser um atributo significativo na aceitação. Em queijo minas frescal potencialmente probiótico, por exemplo, as formulações com maiores notas foram atribuídas às que possuíam maior dureza

(BURITI et al, 2005b; BURITI et al, 2007d). No caso de sobremesas fermentadas e não fermentadas, a presença de ingredientes prebióticos, como FOS e inulina, também pode influenciar na aceitação, uma vez que são ingredientes capazes de alterar a textura do produto. CARDARELLI et al (2008a) demonstraram que a presença de inulina, em conjunto com a cultura probiótica de *L. paracasei* favoreceu a aceitação na musse de chocolate. O mesmo ocorreu com o queijo *petit-suisse* potencialmente simbiótico, adicionado de inulina e oligofrutose (CARDARELLI et al, 2008b).

Com relação à aparência, a sobremesa se apresentou com a cor branca, característica do arroz. Sugestões como, por exemplo, a adição de calda de fruta, ou a incorporação de pedaços de fruta na sobremesa foram citadas. No entanto, com o intuito de se evitar que as características sensoriais originais da sobremesa fossem mascaradas, nenhum ingrediente que pudesse influenciar os provadores foi adicionado. Dessa forma, de acordo com o procedimento da análise sensorial, os provadores perceberam primeiramente os atributos considerados negativos, através do primeiro contato visual.

Figura 7: Principais atributos apontados pelos voluntários como positivos (acima da abscissa), e negativos (abaixo da abscissa), durante a análise sensorial

Enfatiza-se que, em casos em que mais de uma característica foi citada como positiva por parte dos voluntários, somente a primeira característica citada por eles foi contabilizada, no sentido de se obter somente um atributo positivo e um negativo de cada indivíduo. Também houve casos em que os provadores não citaram

nenhum atributo, tanto positivo quanto negativo. Destes, para a formulação T1, 2,0% não citaram atributos positivos e 4,6% não responderam negativamente. Para a formulação T2, as percentagens foram de 4,0% (positivo) e 9,3% (negativo). Para a formulação T3, 3,3% (positivo) e 9,9% (negativo).

Dessa forma, diversos estudos reportaram as vantagens de se obter produtos pré/probióticos e/ou simbióticos, em comparação aos produtos convencionais encontrados no mercado. Como exemplos, podemos citar o manjar adicionado de *L. paracasei* e *B. lactis* (CORREA et al, 2008), musse de chocolate adicionado de inulina e *L. paracasei* (ARAGON-ALEGRO et al, 2007), queijo minas frescal (SOUZA et al, 2007), além dos já tradicionais produtos, como leite fermentado adicionado de *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis* e suplementado com inulina (OLIVEIRA & JURKIEWICZ, 2009). Assim como no presente trabalho, PEREIRA et al (2010) testaram quatro formulações diferentes de queijo *petit-suisse* e concluíram que a adição simultânea de *L. acidophilus* e *B. animalis*, quando em co-cultura com *S. thermophilus*, resultou em produto com boa aceitabilidade, além de melhorar a viabilidade dos microrganismos probióticos.

O desenvolvimento desses e dos demais produtos funcionais dependem de uma série de fatores, sendo dois principais: (i) se o produto está dentro da legislação específica para ser considerado um produto funcional e (ii) ter um apelo sensorial aceitável para os consumidores, além de questões econômicas de produção e do marketing e *claims* a ser utilizado para o produto. Nesse sentido, os estudos com relação a novos produtos não lácteos probióticos estão sendo conduzidos de modo a terem resultados promissores, como produtos à base de frutas e cereais.

Os principais resultados apresentados anteriormente podem ser assim resumidos:

- As sobremesas simbióticas à base de arroz estudadas revelaram que a viabilidade de Bb-12 foi superior à de La-5, em ambos os tratamentos de sobremesa à base de arroz, ou seja, T1 (não fermentada) e T2 (fermentada). Entretanto, a fermentação influenciou cada microrganismo de modo distinto. A viabilidade de La-5 foi maior em T1, tendo diminuído de 8,1 log UFC/g (Dia 1 – pH 5,1) para 7,3 log UFC/g (Dia 21 – pH 4,9), enquanto que Bb-12 teve maior viabilidade em T2, tendo diminuído de 8,8 log UFC/g (Dia 1 – pH 4,7) para 8,1 log UFC/g (Dia 21 – pH 4,5). Em T2, a população de La-5 foi inferior a 6,0 log UFC/g após 21 dias de armazenamento. A população de *S. thermophilus* se manteve superior a 8,0 log UFC/g durante todos os períodos, em ambos os tratamentos.
- A sobremesa T1 apresentou redução de pH durante os 21 dias de armazenamento, enquanto que T2 e T3 não diferiram significativamente ($p < 0,01$). A firmeza de T2 foi ligeiramente menor (entre 0,46 N – dia 1 e 0,23 N – dia 21) que a de T1 (entre 0,55 N – dia 1 e 0,25 N – dia 21).
- A análise sensorial revelou que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras T2 (fermentado) e T3 (controle) ao 14º dia de armazenamento a 4 ± 1 °C, indicando uma maior aceitação para o tratamento adicionado de culturas probióticas, em comparação ao tratamento controle. Com relação ao tempo de armazenamento, também houve diferença significativa para o T3, entre o 14º e 21º dia de armazenamento ($p < 0,05$). Nos demais períodos, a aceitabilidade de todas as formulações não diferiu significativamente.
- Desse modo, a aceitabilidade de todas as formulações adicionadas de cultura ABT não diferiu significativamente ($p > 0,05$), ou seja, a etapa de fermentação não influenciou na aceitação da sobremesa, segundo os voluntários participantes da análise sensorial.
- As sobremesas à base de arroz se mostraram um bom veículo para as bactérias probióticas, que apresentaram, com exceção do 21º dia de armazenamento para o La-5, populações superiores ao mínimo recomendado para que um alimento seja caracterizado como probiótico, de acordo com a legislação (ANVISA, 2008).

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho revelou que a sobremesa não láctea potencialmente simbiótica à base de arroz desenvolvida apresenta boas perspectivas como alimento funcional, por se tratar de um produto inovador, com microrganismos probióticos e ingrediente prebiótico. A adição de nutrientes como o cálcio e fibras à sobremesa de arroz certamente enriqueceu seu apelo funcional e nutricional. Adicionalmente, a sobremesa obteve boa aceitação por parte dos provadores, podendo se tornar uma alternativa aos indivíduos intolerantes à lactose, os quais normalmente direcionam o seu consumo quase que exclusivamente a produtos à base de soja.

A fabricação do produto não fermentado poderia ser a sobremesa de escolha, de preparo mais curto, levando-se em consideração as questões econômicas envolvidas durante a sua produção. O estudo sugere que cada cepa deve ser testada separadamente, quanto ao comportamento no produto, e em diferentes condições. Sugere, ainda, que a inclusão da etapa fermentativa na preparação de uma sobremesa pode afetar diferentemente cepas probióticas distintas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos. Comissões e Grupos de Trabalho. Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. *Alimentos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: IX - Lista de alegações de de propriedade funcional aprovadas*. 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 26 ago. 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos. Legislação. *Resolução RDC n.12, de 02 de janeiro de 2001*. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=144>. Acesso em: 10 dez. 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. 4.ed. Brasília: Ministério da Saúde; São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005. 1020p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

ANTUNES, A.E.C.; CAZETTO, T.F.; BOLINI, H.M.A. Viability of probiotic micro-organisms during storage, postacidification and sensory analysis of fat-free yogurts with added whey protein concentrate. *International Journal of Dairy Technology*, v.58, n.3, p.169-173, 2005.

ARAGON-ALEGRO, L.C.; ALEGRO, J.H.A.; CARDARELLI, H.R.; CHIU, M.C.; SAAD, S.M.I. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. *LWT – Food Science and Technology*, v.40, n.4, p.669-675, 2007.

ARAI, S.; OSAWA, T.; OHIGASHI, H.; YOSHIKAWA, M.; KAMINOOGAWA, S.; WATANABE, M.; OGAWA, T.; OKUBO, K.; WATANABE, S.; NISHINO, H.; SHINOHARA, K.; ESASHI, T.; HIRAHARA, T. A mainstay of functional food science in Japan: history, present status and future outlook. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.65, n.1, p.1-13, 2001.

ARAI, S.; YASUOKA, A.; ABE, K. Functional food science and food for specified health use policy in Japan: state of art. *Current Opinion in Lipidology*, v.19, n.1, p.69-73, 2008.

ARVANITOYANNIS, I.S.; VAN HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLU, M. Functional foods: a survey of health claims, pros and cons, and current legislation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.45, p.385-404, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis of AOAC international*. 17.ed. Gaithersburg: AOAC, 2003a. v.1, p.12.1-12.3, v.2, p.33.1-33.88.

BARATA, T.S. Caracterização do consumo de arroz no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 43., Ribeirão Preto, 2005. *Anais*. Ribeirão Preto, 2005. CD-Rom.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. Campinas: UNICAMP, 2003.

401p.

BEYERLEIN, L.; POHL, D.; DELCO, F.; STUTZ, B.; FRIED, M.; TUTUIAN, R. Correlation between symptoms developed after the oral ingestion of 50 g lactose and results of hydrogen breath testing for lactose intolerance. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, v.27, p.659-665, 2008.

BIELECKA, E.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A.; Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their *in vivo* effectiveness. *Food Research International*, v.35, n.2/3, p.125-131, 2002.

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

BURITI, F.C.A.; CARDARELLI, H.R.; SAAD, S.M.I. Biopreservation by *Lactobacillus paracasei* in coculture with *Streptococcus thermophilus* in potentially probiotic and synbiotic fresh cream cheeses. *Journal of Food Protection*, v.70, n.1, p.228-235, 2007b.

BURITI, F.C.A.; CARDARELLI, H.R.; SAAD, S.M.I. Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco cremoso simbiótico: implicações da adição de *Lactobacillus paracasei* e inulina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.44, n.1, p.75-84, 2008.

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

BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Effects of refrigeration, freezing and replacement of milk fat by inulin and whey protein concentrate on texture profile and sensory acceptance of synbiotic guava mousses. *Food Chemistry*, v.123, p.1190-1197, 2010b.

BURITI, F.C.A.; KOMATSU, T.R.; SAAD, S.M.I. Activity of passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*) pulps on *Lactobacillus acidophilus* in refrigerated mousses. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.38, n.2, 2007c. [Short Communication].

BURITI, F.C.A.; OKAZAKI, T.Y.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh cheese in comparison with the traditional products. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, v.57, n.2, p.179-185, 2007d.

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

BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.; SAAD, S.M.I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial

- properties during storage. *International Dairy Journal*, v.15, n.12, p.1279-1288, 2005b.
- BURY, D.; JELEN, P.; KIMURA, K. Whey protein concentrate as a nutrient supplement for lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, v.8, p.149-151, 1998.
- CALLEGARI-JACQUES, S.M. *Bioestatística: princípios e aplicações*. Porto Alegre: Artmed, 2003. 255p.
- CARDARELLI, H.R.; BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-suisse cheese. *LWT – Food Science and Technology*, v.41, p.1037-1046, 2008b.
- CARDARELLI, H.R.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; ALEGRO, J.H.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Effect of inulin and *Lactobacillus paracasei* on sensory and instrumental texture properties of functional chocolate mousse. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.88, p.1318-1324, 2008a.
- CARDARELLI, H.R.; SAAD, S.M.I.; GIBSON, G.R.; VULEVIC, J. Functional petit-suisse cheese: Measure of prebiotic effect. *Anaerobe*, v.13, n.5/6, p.200-207, 2007.
- CARGILL. News Center. 2008. *Cargill beverage concepts will address consumer demands for health, taste and texture at IFT 2008*. Disponível em: <http://www.cargill.com/news-center/news-releases/2008/NA3007612.jsp>. Acesso em: 10 out. 2010.
- CNA – Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Disponível em: <http://www.cna.org.br/biblioteca/indicadores>. Acesso em: 14 ago. 2008.
- CHARLIER, C.; CRETENET, M.; EVEN, S.; LE LOIR, Y. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology*, v.131, p.30-39, 2009.
- CHRISTIANSEN, P.S.; EDELSTEN, D.; KRISTIANSEN, J.R.; NIELSEN, E.W. Some properties of ice cream containing *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus*. *Milchwissenschaft*, v.51, p.502–504, 1996.
- COEURET, V.; GUEGUEN, M.; VERNOUX, J.P. *In vitro* screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. *Journal of Dairy Research*, v.71, p.451-460, 2004.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. *Séries históricas relativas às safras 1976/77 a 2009/2010 de área plantada, produtividade e produção*. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=>. Acesso em: 27 mar. 2010.
- CORREA, S.B.M.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Probiotic potential and sensory properties of coconut flan supplemented with *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*, during shelf life of the product. *International Journal of Food Science and Technology*, v.43, n.9, p.1560-1568, 2008.
- CRUZ, A.; ANTUNES, A.E.C.; SOUSA, A.L.O.P.; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I. Ice cream as a probiotic food carrier. *Food Research International*, v.42, p.1233-1239, 2009.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *Journal of Dairy Science*, v.81, n.11, p.2804-2816, 1998.

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.

DEL PIANO, M.; CARMAGNOLA, S.; ANDORNO, S.; PAGLIARULO, M.; TARI, R.; MOGNA, L.; STROZZI, G.L.; SFORZA, F.; CAPURSO, L. Evaluation of the intestinal colonization microencapsulated probiotic bacteria in comparison with the same uncoated strains. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v.44, n.1, p.42-46, 2010.

DING, W.K.; SHAH, N.P. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *Journal of Food Science*, v.74, n.2, p.100-107, 2009.

EMBRAPA. Cultivo de Arroz Irrigado no Brasil. *Importância econômica, agrícola e alimentar do arroz*. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/cap01.htm>. Acesso em: 27 mar. 2008.

FARIAS, F.F.; NETO, U.F. Intolerância aos carboidratos e à lactose. *Electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases*. Disponível em: <http://e-gastroped.com.br/dec04/intolerancia.htm>. Acesso em: 02 abr. 2008.

FAOSTAT. Production. *Foods and agricultural commodities production*. 2009. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em: 08 out. 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. Cordoba: FAO/WHO, 2001. 34p. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation of a Joint FAO/WHO Expert Consultation]. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf. Acesso em: 27 mar. 2008.

FOX, P.F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; McSWEENEY, P.L.H. *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg: Aspen, 2000. 587p.

GALIA, W.; PERRIN, C.; GENAY, M.; DARY, A. Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. *International Dairy Journal*, v.19, p.89-95, 2009.

GARDINER, G.E.; ROSS, R.P.; WALLACE, J.M.; SCANLAN, F.P.; JAGERS, P.P.; FITZGERALD, G.F.; COLLINS, J.K.; STANTON, C. Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of cheddar cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.47, n.12, p.4907-4916, 1999.

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

GIBSON, G.R.; PROPERT, H.M.; VAN LOO, J.; RASTALL, R.A.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of

prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, v.17, p.259-275, 2004.

GILLILAND, S.E. Probiotics and prebiotics. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L., eds. *Applied dairy microbiology*. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2001. p.327-343. (Food Science and Technology, 110).

GOBBETTI, M.; DI CAGNO, R.; DE ANGELIS, M. Functional microorganisms for functional food quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.50, p.716-727, 2010.

GOKAVI, S.; ZHANG, L.; HUANG, M-K.; ZHAO, X.; GUO, M. Oat-based symbiotic beverage fermented by *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* spp. *casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Food Science*, v. 70, n.4, p.216-223, 2005.

GOMES, A.M.P.; VIEIRA, M.M.; MALCATA, F.X. Survival of probiotic microbial strains in a cheese matrix during ripening: simulation of rates of salt diffusion and microorganism survival. *Journal of Food Engineering*, v.36, p.281-301, 1998.

GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; NAZZARO, F.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.9, p.292-302, 2010.

HE, T.; PRIEBE, M.G.; ZHONG, Y.; HUANG, C.; HARMSSEN, H.J.M.; RAANGS, G.C.; ANTOINE, J.-M.; WELLING, G.W.; VONK, R.J. Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects. *Journal of Applied Microbiology*, v.104, p.595-604, 2008.

HEENAN, C.N.; ADAMS M.C.; HOSKEN, R.W.; FLEET, G.H. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. *LWT – Food Science and Technology*, v.37, n.4, p.461-466, 2004.

HELLAND, M.H.; WICKLUND, T.; NARVHUS, J.A. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk and water-based cereal puddings. *International Dairy Journal*, v.14, p.957-965, 2004.

HERCEG, Z.; REZEK, A.; LELAS, V.; KRESIC, G.; FRANETOVIC, N. Effect of carbohydrates on the emulsifying, foaming and freezing properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*, v.79, p.279-286, 2007.

HEYMAN, M.B. Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. *Pediatrics*, v.118, n.3, p.1279-1286, 2006.

HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, v.35, n.2/3, p.109-116, 2002.

HOMAYOUNI, A.; AZIZI, A.; EHSANI, M.R.; YARMAND, M.S.; RAZAVI, S.H. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chemistry*, v.111, p.50-55, 2008.

HOVDE, Ø.; FARUP, P.G. A comparison of diagnostic test for lactose malabsorption – which one is the best? *BMC Gastroenterology*, v.9, n.82, p.1-7, 2009.

INGHAM, S.C. Use of modified *Lactobacillus* selective medium and *Bifidobacterium* iodoacetate medium for differential enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in powdered nutritional products. *Journal of Food Protection*, v.62, n.1, p.77-80, 1999.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. *Fermented and non-fermented milk products: detection and enumeration of Lactobacillus acidophilus – culture media*. Brussels: International Dairy Federation, 1995. 36p. [Bulletin of the IDF, 306].

INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. *IRRI World Rice Statistics*. Disponível em: http://beta.irri.org/solutions/index.php?option=com_content&task=view&id=250. Acesso em: 08 out. 2010.

JACKSON, K.A.; SAVAIANO, D.A. Lactose maldigestion, calcium intake and osteoporosis in african-, asian- and hispanican-american. *Journal of the American College of Nutrition*, v.20, n.2, p.198S-207S, 2001.

JANER, C.; PELAEZ, C.; REQUENA, T. Caseinomacropeptide and whey protein concentrate enhance *Bifidobacterium lactis* growth in milk. *Food Chemistry*, v.86, p.263-267, 2004.

JU, Z.Y.; HETTIARACHCHY, N.S.; RATH, N. Extraction, desnaturation and hydrophobic properties of rice flour proteins. *Journal of Food Science*, v.66, n.2, p.229-232, 2001.

KAILASAPATHY, K.; HARMSTORF, I.; PHILLIPS, M. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in stirred fruit yogurts. *LWT - Food Science and Technology*, v.41, n.7, p.1317-1322, 2008.

KAPLAN, H.; HUTKINS, R.W. Fermentation of Fructooligosaccharides by acid lactic bacteria and bifidobacteria. *Applied and Enviromental Microbiology*, v.66, n.6, p.2682-2684, 2000.

KATZMAUER, B. Properties and applications of xanthan gum. *Polymer Degradation and Stability*, v.59, p.81-84, 1998.

KAUR, N.; GUPTA, A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences*, v.27, p.703-714, 2002.

KIM, C.; YOO, C. Rheological properties of rice starch-xanthan gum mixtures. *Journal of Food Engineering*, v.75, p.120-128, 2006.

KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.44, n.3, p.327-349, 2008.

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylatic and therapeutic uses of probiotic: a review. *Journal of the American Dietetic Association*, v.101, p.229-241, 2001.

LAMSAL, B.P.; FAUBION, J.M. The beneficial use of cereal and cereal components in probiotic foods. *Food Reviews International*, v.25, p.103-114, 2009.

LANDSTROM, E.; HURSTI, U.K.; MAGNUSSON, M. Functional foods compensate for an unhealthy "lifestyle": some Swedish consumer's impressions and perceived need of functional foods. *Appetite*, v.53, n.1, p.34-43, 2009.

LAPIERRE, L.; UNDELAND, P.; COX, L.J. Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*, v.75, n.5, p.1192-1196, 1992.

LAW, D.; CONKLIN, J.; PIMENTEL, M. Lactose intolerance and the role of the lactose breath test. *American Journal of Gastroenterology*, v.105, p.1726-1728, 2010.

LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. *Sensory evaluation of food: principles and practices*. Gaithersburg: Aspen, 1999. 827p. (A Chapman & Hall Food Science Book).

LOBATO, L.P.; GROSSMANN, M.V.E.; BENASSI, M.T. Inulin addition in starch-based desserts: instrumental texture and sensory analysis. *Food Science and Technology International*, v.15, p.317-323, 2009.

LOURENS-HATTING, A.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, v.11, p.1-17, 2001.

LUCKOW, T.; DELAHUNTY, C. Consumer acceptance of orange juice containing functional ingredients. *Food Research International*, v.37, p.805-814,

MAKRAS, L.; DE VUYST, L. The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *International Dairy Journal*, v.16, p.1049-1057, 2006.2004.

MARAGKOUidakis, P.A.; ZOUMPOPOULOU, G.; MIARIS, C.; KALANTZOPOULOS, G.; POT, B.; TSAKALIDOU, E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, v.16, p.189-199, 2006.

MARGARIÑOS, H.; SELAIVE, S.; COSTA, M.; FLORES, M.; PIZARRO, O. Viability of probiotic micro-organisms (*Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* Bb-12) in ice-cream. *International Journal of Dairy Technology*, v.60, n.2, p.128-134, 2007.

MARUYAMA, L.Y.; CARDARELLI, H.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Textura instrumental de queijo potencialmente probiótico: influência de diferentes combinações de gomas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.2, p.386-393, 2006.

MATILLA-SANDHOLM, T.; MYLLARINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, v.12, p.173-182, 2002.

MENDOZA, E.; GARCÍA, M.L.; CASAS, C.; SELGAS, M.D. Inulin as fat substitute in low fat, dry fermented sausages. *Meat Science*, v.57, p.387-393, 2001.

MEYER, D.; STASSE-WOTHIUS, M. The bifidogenic effect of inulin and oligofructose and its consequences for gut health. *European Journal of Clinical Nutrition*, v.63, p.1277-1289, 2009.

MILLETTE, M.; LUQUET, F.M.; LACROIX, M. *In vitro* growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus*- and *Lactobacillus casei*- fermented milk. *Letters in Applied Microbiology*, v.44, p.314-319, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. *Projeções do agronegócio: Mundo e Brasil: 2006/07 a 2017/18*. 2008. Brasília: MAPA, 2007. Disponível em: http://www.abmra.org.br/marketing/apresentacoes/projecoes_agronegocio_jose_gasques.pdf. Acesso em: 29 ago 2009.

MOTARJEMI, Y. Impact of small scale fermentation technology on food safety in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, v.75, p.213-229, 2002.

MUNHOZ, M.P.; WEBER, F.H.; CHANG, Y.K. Influência de hidrocolóides na textura de gel de amido de milho. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, v.24, n.3, p.403-406, 2004.

NORIEGA, L.; GUEIMONDE, M.; SÁNCHEZ, B.; MORGOLLEZ, A.; DE LOS REYES-GAVILLÁN, C.G. Effect of adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*, v.94, p.79-86, 2004.

OHAMA, H.; IKEDA, H.; MORIYAMA, H. Health claims and foods with health claims in Japan. *Toxicology*, v.21, n.1, p.95-111, 2006.

OLIVEIRA, L.B.; JURKIEWICZ, C.H. Influence of inulin and acacia gum on the viability of probiotic bacteria in synbiotic fermented milk. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.12, p.138-144, 2009.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.38, n.1, p.1-21, 2002.

PEREIRA, L.C.; SOUZA, C.H.B.; BEHRENS, J.H.; SAAD, S.M.I. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* sp. in co-culture improve sensory acceptance of potentially petit-suisse cheese. *Acta Alimentaria*, v.39, n.3, p.265-276, 2010.

PRADO, F.; PARADA, J.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. Trends in non-dairy probiotics beverages. *Food Research International*, v.41, n.2, p.111-123, 2008.

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

QIU, Y.; LIU, Q.; BETA, T. Antioxidant activity of commercial wild rice and identification of flavonoid compounds an active fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, p.7543-7551, 2009.

REID, G.; SANDERS, M.E.; GASKINS, H.R.; MERCENIER, A.; RASTALL, R. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v.37, n.2, p.105-118, 2003.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, v.27, p.1-11, 2010.

RÖBLE, C.; AUTY, M.A.E.; BRUNTON, N.; GORMLEY, R.T.; BUTLER, F. Evaluation of fresh-cut apple slices enriched with probiotic bacteria. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v.11, p.203-209, 2010.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *American Journal of Clinical Nutrition*, v.71, p.1682S-1687S, 2000.

ROBERFROID, M.B. Global view on functional foods: European perspectives. *British Journal of Nutrition*, v.88, suppl.2, p.133-138, 2002.

ROBERFROID, M.B. Inulyn-type fructans: functional foods ingredients. *Journal of Nutrition*, v.137, p.2493-2502, 2007a.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics: the concepts revisited. *Journal of Nutrition*, v.137, p.830-837, 2007b.

ROKKA, S.; RANTAMÄKKI, P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*, v.231, n.1, p.1-12, 2010.

ROSSI, M.; CORRADINI, C.; AMARETI, A.; NICOLINI, M.; POPEI, A.; ZANONI, S.; MATTEUZZI, D. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, n.10, p.6150-6158, 2005.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.42, n.1, p.1-16, 2006.

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

SAARELA, M.; ALAKOMI, H.-L.; PUHAKKA, A.; MATTO, J. Effect of the fermentation pH of *Lactobacillus rhamnosus* preparations and suitability of *in vitro* analyses of cell physiological functions to predict it. *Journal of Applied Microbiology*, v.106, p.1204-1212, 2009.

SAAVEDRA, J.M.; TSCHERNIA, A. Human studies with probiotics and prebiotics: clinical implications. *British Journal of Nutrition*, v.87, p.241-246, 2002.

SACARRO, D.M.; TAMINE, A.Y.; PILLEGI, A.L.; OLIVEIRA, M.N. The viability of three probiotic organisms grown with yoghurt starter cultures during storage for 21 days at 4°C. *International Journal of Dairy Technology*, v.62, n.3, p.397-404, 2009.

SAKHARE, P.Z.; NARASIMHA RAO, D. Microbial profiles during lactic fermentation of meat by combined starter cultures at high temperatures. *Food Control*, v.14, p.1-5, 2003.

SAMESHIMA T.; MAGOME, C.; TAKESHITA, K.; ARIHARA, K.; ITOH, M.; KONDO, Y. Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behaviour of

Staphylococcus aureus in fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology*, v.41, p.1-7, 1998.

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

SGHIR, A.; CHOW, J.M.; MACKIE, R.I. Continuous culture selection of bifidobacteria and lactobacilli from human faecal samples using fructooligosaccharide as selective substrate. *Journal of Applied Microbiology*, v.85, p.769-777, 1998.

SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, v.83, n.4, p.894-907, 2000.

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

SHIH, F.F. Rice proteins. In: CHAMPAGNE, E.T., ed. *Rice: chemistry and technology*. 3.ed. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, 2004. cap.6, p.143-162.

SHIHATA, A.; SHAH, N.P. Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, v.10, p.401-408, 2000.

SMID, E.J.; HUGENHOLTZ, J. Functional genomics for food fermentation processes. *Annual Review of Food Science and Technology*, v.1, p.497-519, 2010.

SOUZA, C.H.B.; BURITI, F.C.A.; BEHRENS, J.H.; SAAD, S.M.I. Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in co-culture with a thermophilic starter culture. *International Journal of Food Science and Technology*, v.43, n.5, p.871-877, 2008.

STANTON, C.; DESMOND, C.; COAKLEY, M.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. In: FARNWORTH, E.R., ed. *Handbook of fermented functional foods*. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.21-58. (Functional Foods and Nutraceuticals Series).

STANTON, C.; GARDINER, G.; LYNCH, P.B.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Probiotic cheese. *International Dairy Journal*, v.8, p.491-496, 1998.

SWALLOW, D.M. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annual Review of Genetics*, v.37, p.197-219, 2003.

SWARGERTY, D.L.; WALLING, A.D.; KLEIN, R.M. Lactose intolerance. *American Family Physician*, v.65, n.9, p.1845-1850, 2002.

THARMARAJ, N.; SHAH, N.P. Antimicrobial effects of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in cheese-based dips. *International Food Research Journal*, v.16, p.261-276, 2009.

TOURNIER, C.; SULMONT-ROSSÉ, C.; SÉMON, E.; VIGNON, A.; ISSANCHOU, S.; GUICHARD, E. A study on texture-taste-aroma interactions: physico-chemical and cognitive mechanisms. *International Dairy Journal*, v.19, p.450-458, 2009.

VEESA, T.H.; MARTEAU, P.; KORPELA, R. Lactose intolerance. *Journal of the*

American College of Nutrition, v.19, n.2, p.165-175, 2000.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. *International Dairy Journal*, v.9, n.8, p.497-505, 1999.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal*, v.10, p.271-275, 2000.

VINDEROLA, C.G.; MOCCHIUTTI, P.; REINHEIMER, J.A. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*, v.85, p.721-729, 2002.

VITALI, B.; NDAGIJIMANA, M.; CRUCIANI, F.; CARNEVALI, P.; CANDELA, M.; GUERZONI, M.E.; BRIGIDI, P. Impact of synbiotic food on the gut microbial ecology and metabolic profiles. *BMC Microbiology*, v.10, n.4, p.1-13, 2010.

VRESE, M.; STEGELMANN, A.; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.; SCHEREZENMEIR, J.; Compensation for lactase insufficiency. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.73, n.2, p.421-429, 2001.

WAGAR, L.E.; CHAMPAGNE, C.P.; BUCKLEY, N.D.; RAYMOND, Y.; GREEN-JOHNSON, J.M. Immunomodulatory properties of fermented soy and dairy milks prepared with lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*, v.74, n.8, p.423-430, 2009.

WALTER, M.; MARCHEZAN, N.; AVILA, L.A. Arroz: composição e características nutricionais. *Ciência Rural*, v.38, n.4, p.1184-1192, 2008.

WANG, L.; XIE, B.; SHI, J.; XUE, S.; DENG, Q.; WEI, Y.; TIAN, B. Physicochemical properties and structure of starches from Chinese rice cultivars. *Food Hydrocolloids*, v.24, p.208-216, 2010.

WANG, M.; HETTIARACHCHY, N.S.; QI, M.; BURKS, W.; SIEBENMORGEN, T. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.47, n.2, p.411-416, 1999.

WANG, Y. Prebiotics: present and future in food science and technology. *Food Research International*, v.42, p.8-12, 2009.

YEH, A.-I. Preparation and applications of rice flour. In: CHAMPAGNE, E.T. ed. Rice: chemistry and technology. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, 2004, cap.17, p.495-539.

ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. Composition and functional properties of rice. *International Journal of Food Science and Technology*, v.37, p.849-868, 2002.

ZUBILLAGA, M.; WEILL, R.; POSTAIRE, E.; GOLDMAN, C.; CARO, R.; BOCCIO, J. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. *Nutrition Research*, v.21, n.3, p.569-579, 2001.

Anexo I: Informações para os Membros das Bancas julgadoras de Mestrado

Anexo II: Modelo da ficha de análise sensorial utilizando escala hedônica de nove pontos

Ficha para teste de aceitação – Sobremesa simbiótica à base de arroz sabor maçã

Nome: _____

Data: ____/____/____

Amostra: _____

Você recebeu uma amostra de sobremesa sabor maçã. Por favor, prove a amostra e avalie de maneira geral (aparência, sabor e textura) usando a escala abaixo o seu grau de aceitação relacionado ao produto.

- 1 - Desgostei muitíssimo
- 2 - Desgostei muito
- 3 - Desgostei regularmente
- 4 - Desgostei ligeiramente
- 5 - Não gostei nem desgostei
- 6 - Gostei ligeiramente
- 7 - Gostei regularmente
- 8 - Gostei muito
- 9 - Gostei muitíssimo

Cite a característica que você **mais** gostou na amostra: 😊 _____

Cite a característica que você **menos** gostou na amostra: ☹ _____

Obrigado pela participação!

Anexo III: Parecer consubstanciado do projeto, aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO PROJETO

Parecer CEP nº 105
Protocolo CEP nº_489

Senhor Pesquisador,
Daniel Massayuki Kaninoki

I - Identificação

Projeto de Pesquisa:	Desenvolvimento de sobremesa simbiótica à base de arroz.
Pesquisador Responsável:	Daniel Massayuki Kakinoki
Instituição:	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Área Temática Especial:	Grupo III
Patrocinadores:	CAPES e FAPESP

II - Sumário Geral do Protocolo

Apesar da grande expansão dos alimentos funcionais probióticos e prebióticos no mercado, seu consumo se torna prejudicial a aproximadamente 70% da população mundial, por serem intolerantes a lactose, açúcar encontrado nesses produtos. O objetivo desta pesquisa é desenvolver um produto à base de arroz, suplementado com a cultura ABT (composta dos microorganismos probióticos; *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e da cultura starter *Streptococcus thermophilus*) e com os ingredientes prebióticos inulina e frutooligossacarídeo (FOS), além de enriquecê-lo com as proteínas presentes no leite. Serão realizadas análises físico-químicas e microbiológicas (dias 0, 7, 14 e 21), e sensorial dos produtos armazenados a 4-5 °C (dias 7 e 14). Adicionalmente, a determinação de pH será também realizada durante a elaboração dos produtos.

Os objetivos do presente estudo são:

- Desenvolver um produto funcional probiótico e prebiótico (simbiótico), destinado a consumidores portadores de intolerância à lactose;
- Utilizar o arroz como matéria prima e base nutritiva, devido a sua disponibilidade no mercado e à sua grande aceitação por parte dos consumidores, e enriquecê-lo, de modo a aumentar o seu valor nutritivo;
- Avaliar a aceitabilidade do produto sob o ponto de vista sensorial e suas características físico-químicas e microbiológicas durante o seu armazenamento.

Tipo de estudo: Experimental

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Descrição da Casuística:

Participarão da análise sensorial de 50 até, no máximo, 300 voluntários adultos (provadores) de ambos os sexos, podendo ser alunos de graduação, de pós-graduação, docentes e funcionários da USP, ou outros voluntários saudáveis que queiram participar. Amostras de, aproximadamente 20 g dos diferentes tratamentos (produto fermentado, não fermentado e controle – sem adição de cultura starter), serão oferecidas aos provadores monadicamente, em potes higienizados e em 2 períodos distintos (dias 7 e 14). A avaliação sensorial será realizada através de teste de aceitabilidade, utilizando escala hedônica de 9 pontos, com variação de gostei muitíssimo (9 pontos) a desgostei muitíssimo (1 ponto)

Os critérios de inclusão dos participantes são:

Ter entre 18 e 60 anos.

Serão critérios de exclusão:

Histórico de manifestação de alergia, intolerância a alimentos ou doença crônica (diabetes, hipotireoidismo, hipertireoidismo, hipertensão arterial ou outras), estar gripado, resfriado ou indisposto, estar fazendo algum tratamento médico, ter entrado em contato há menos de 1 hora com materiais, alimentos ou cosméticos de cheiro forte.

III - Situação do protocolo: PROJETO APROVADO

Após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com a resolução CNS – 196/96.

São Paulo, 18 de novembro de 2008.

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

Anexo IV: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Anexos V e VI: Laudos referentes à viabilidade de *Bacillus cereus* e *Salmonella* spp.

Anexo VII: Ficha do aluno atualizado

Anexo VIII: *Curriculum Lattes*