

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Alimentos

**Aprimoramento das características sensoriais de emulsão alimentícia probiótica e
avaliação de seu potencial funcional**

Clara Simone dos Santos

Dissertação para a obtenção do título de MESTRE

Orientador: Prof.^a Dra. Susana Marta Isay Saad

Co-orientador: Prof.^a Dra. Juliana Neves Rodrigues Ract

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Alimentos

**Aprimoramento das características sensoriais de emulsão alimentícia probiótica e
avaliação de seu potencial funcional**

Clara Simone dos Santos

Versão Corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP

Dissertação para a obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof.^a Dra. Susana Marta Isay Saad

Co-orientador: Prof.^a Dra. Juliana Neves Rodrigues Ract

São Paulo

2016

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

Ficha Catalográfica

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

S237a Santos, Clara Simone dos
Aprimoramento das características sensoriais de emulsão
alimentícia probiótica e avaliação de seu potencial funcional /
Clara Simone dos Santos. -- São Paulo, 2016.
120p.

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

1. Tecnologia de alimentos 2. Microbiologia de alimentos
I. T. II. Saad, Susana Marta Isay, orientador. III. Ract, Juliana
Neves Rodrigues, co-orientador.

664 CDD

Clara Simone dos Santos

**Aprimoramento das características sensoriais de emulsão alimentícia probiótica e
avaliação de seu potencial funcional**

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof.^a Dra. Susana Marta Isay Saad
FCF/USP
Orientadora/Presidente

Prof.^a Dra. Carmen Sílvia Favaro-Trindade
1º. examinador

Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli
2º. examinador

São Paulo, 16 de junho de 2016.

*Dedico este trabalho aos meus pais,
João e Simoni, com amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar forças e sabedoria para lidar com os desafios.

Aos meus pais, João e Simoni pela criação que me deram, por todo amor, carinho e incentivo em toda a minha trajetória. Obrigada, pai, por todo o apoio aos meus estudos. Para sempre te amarei e você sempre estará em meu coração.

À minha orientadora, Prof. Dra. Susana Marta Isay Saad e co-orientadora, Prof. Dra. Juliana Neves Rodrigues Ract por terem me aceito como aluna de mestrado, pelo privilégio de poder fazer parte de dois grupos de pesquisa, o que me deu oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli pelos ensinamentos e orientações para a condução da parte de lipídios deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas do departamento FBT e da FCF de laboratório, Marina, Diogo, Natalia, Talita, pelas experiências compartilhadas e agradável convivência, em especial a Sara, Marcela, Douglas e Raquel por me ajudarem em todos os momentos que precisei, pela maravilhosa companhia e pelas muitas risadas que demos juntos.

Aos meus amigos de longa data, Nathália, Haron, Bruno, Marianne, Luana, Letícia, Gabriela, Cílea e Tamyres pelo incentivo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado e auxílio financeiro (Processos 2014/04784-9 e 2015/15863-0).

À Coordenação Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa no início do Mestrado.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica da FCF/USP, Miriam, Alexandre, Ivani, Nilton, Tânia e Elza.

Ao Dr. Aldo Baccharin e à empresa Food Intelligence por ter cedido o uso da sorveteira durante a produção das emulsões alimentícias e ao Sr. José Carlos pelo total auxílio prestado.

Às empresas, Agropalma, Arla Foods Ingredients, Danisco, DSM, Duas Rodas, Fonterra, Fortitech South América e Orafiti pela doação de parte dos ingredientes utilizados neste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

**Porque, aquele que pede, recebe;
E, o que busca, encontra; e, ao que bate, se abre.**

Mateus 7:8

RESUMO

SANTOS, C.S. **Aprimoramento das características sensoriais de emulsão alimentícia probiótica e avaliação de seu potencial funcional.** 2016. 120p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O objetivo do presente trabalho foi melhorar as características sensoriais de uma emulsão alimentícia previamente desenvolvida pelo grupo de pesquisa, elaborada com a cepa probiótica *B. animalis* Bb-12, inulina e caseínomacropéptido (CMP), bem como caracterizar e avaliar a aceitabilidade do produto sob o ponto de vista sensorial, suas características físico-químicas e de textura instrumental durante seu armazenamento refrigerado e verificar a viabilidade da cepa probiótica incorporada à emulsão alimentícia e a sua sobrevivência *in vitro* a condições gastrointestinais simuladas. Foram preparadas 6 misturas binárias de gordura do leite (GL) (x_1) e oleína de palma (OP) (x_2) em diferentes proporções, sendo que duas delas correspondiam aos componentes isoladamente. Para as misturas GL:OP, foram determinados a composição em ácidos graxos, o índice de acidez (IA), os comportamentos de cristalização e fusão e a consistência. Adicionalmente, uma margarina comercial (MC) foi analisada como padrão de referência para as emulsões alimentícias potencialmente probióticas desenvolvidas e sua base gordurosa (BGMC) foi analisada como referência para a seleção das misturas GL:OP mais adequadas para a produção das emulsões. Após a seleção das misturas, foram produzidas duas emulsões alimentícias com adição de inulina, CMP e *B. animalis* Bb-12, que foram monitoradas durante o seu armazenamento a 5 °C no dia 0 (após o processamento) e após 1, 7, 14, 21 e 28 dias. Foram realizadas análises microbiológicas, de pH, teste de sobrevivência às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*, análise de consistência e aceitação sensorial. Aos 35 dias de armazenamento, repetiu-se o ensaio *in vitro* para posterior extração de DNA do probiótico no produto a fim de comparar os métodos de semeadura em ágar seletivo e de qPCR com e sem tratamento com o agente intercalante de DNA *Propidium Monoazide* (PMA). Os ácidos palmítico e oleico foram os ácidos graxos mais abundantes nas misturas GL:OP, entre 30 e 34% e entre 10 e 50%, respectivamente. A adição de OP à GL resultou em um retardamento do início da cristalização das misturas binárias GL:OP, devido à interação física resultante da diluição dos triacilgliceróis de alto ponto de fusão provenientes da GL. A consistência das misturas binárias GL:OP variou entre 385,9 e 12.172,3 gf/cm² a 5 °C, sendo que as misturas GL:OP 40:60 e 20:80 apresentaram consistência mais semelhante à da BGMC a 10 °C. Dessa forma, as misturas GL:OP 40:60 e 20:80 foram selecionadas para a produção de emulsões alimentícias por apresentarem comportamento térmico e consistência mais adequados a este fim. Após a produção das formulações, as populações de Bb-12 permaneceram estáveis entre 8 e 9 log UFC/g durante os 28 dias de armazenamento a 5 °C ($p > 0,05$) e sua viabilidade não foi influenciada pela diminuição de pH. Houve uma redução em até 2 ciclos logaritmos da população do probiótico das formulações após 6 horas de simulação gastrointestinal em todos os períodos estudados (7, 14, 21 e 28 dias) ($p < 0,05$). No entanto, o período de armazenamento estudado não influenciou de maneira significativa a taxa de sobrevivência da Bb-12 ($p > 0,05$) e, ao final dos 28 dias, a taxa de sobrevivência foi de 80% para EA 40:60 e 75% para a EA 20:80. Os métodos de semeadura convencional e de qPCR com PMA mostraram correlação positiva em quase todas as fases do ensaio *in vitro*. Contudo, a formulação EA 40:60 apresentou maiores contagens de células viáveis em qPCR com PMA, comparado ao método convencional em ágar. A aceitação sensorial das emulsões tiveram notas semelhantes, com notas entre 6,2 e 6,9, o que significa “gostei ligeiramente”. As consistências das formulações variaram de 213,3 a 2466,6 gf/cm² entre 5 e 15 °C. Os resultados obtidos sugerem que a formulação EA 40:60 pode ser considerada a melhor formulação, uma vez que revelou características tecnológicas mais vantajosas e boa viabilidade do probiótico e sobrevivência ao estresse gastrointestinal, além de ter apresentado melhor aceitabilidade sensorial.

Palavras-chave: Alimento funcional; Probiótico; Inulina; Gordura do leite; Oleína de palma.

ABSTRACT

SANTOS, C.S. **Improvement of probiotic table spread features and evaluation of the product functional potential.** 2016. 120p. Dissertation (Master of Science) Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2016.

The purpose of this study was to improve the sensory attributes of a tablespread previously developed by our research group, supplemented with the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* Bb-12, besides inulin, and caseinomacropeptide, as well as to evaluate the product sensory acceptance, its physico-chemical and instrumental texture profile during refrigerated storage, and to verify the viability of the probiotic incorporated into the tablespread and its *in vitro* survival under conditions simulating the gastrointestinal tract during storage. Six binary blends of milk fat (MF) (x_1) and palm olein (PO) (x_2) were prepared in different proportions, with two samples representing the pure components and four corresponding to binary blends. The fatty acid composition, free fatty acids, crystallization, and melting behaviors, and consistency analyses were performed for all MF:PO blends. Additionally, a commercial margarine (CM) was analyzed as a reference standard to the potentially probiotic tablespreads to be developed and its lipid base (CMLB) was analyzed as a reference for the selection of the MF:PO blends most suitable for the tablespreads preparation. Then, two MF:PO blends were selected to produce two tablespreads with Bb-12, inulin, and caseinomacropeptide, which were monitored during storage at 5 °C in time 0 (after processing), and after 1, 7, 14, 21, and 28 days. Microbiology assays, pH test, *in vitro* gastrointestinal survival, consistency, and sensory acceptance were performed. After 35 days of storage, the *in vitro* simulated gastrointestinal assay was repeated for subsequent probiotic DNA extraction in the food matrix in order to compare the different methods, including plate count and species-specific qPCR combined with the use of the *Propidium Monoazide* (PMA). All the MF:PO blends showed high concentration of palmitic and oleic acids, in the range between 30-34% and 10-50%, respectively. The addition of PO into MF resulted in an onset crystallization temperature delay for the MF:PO blends due to a physical interaction resulting from the MF high melting point triacylglycerol dilution. The consistency of the MF:PO blends varied between 385.9 and 12.172 gf/cm² at 5 °C and 40:60 and 20:80 MF:PO blends presented consistency similar to (CMLB) at 10 °C. Thus, the 40:60 and 20:80 MF:PO blends were selected for the production of tablespreads, for presenting thermal behavior and consistency most suitable for this purpose. Following the tablespreads production, the Bb-12 populations remained stable ranging from 8 to 9 cfu/g throughout 28 days of storage at 5 °C ($p>0.05$) and their viability was not influenced by pH reduction. There was a decrease of up to 2 log cfu/g of the probiotic populations after 6 h of simulated gastrointestinal *in vitro* assay during all the studied periods (7, 14, 21, and 28 days) ($p<0.05$). On the other hand, the storage period did not significantly influence the survival rate of Bb-12 ($p>0.05$) and after 28 days the tablespreads TS 40:60 and 20:80 showed values of 80 and 75%, respectively. The different methods, count plate and qPCR with PMA, showed positive correlation in almost all steps of the *in vitro* assay. However, the tablespread TS 40:60 presented higher viable cell counts with the qPCR with PMA, when compared to the conventional plating method. The tablespreads sensory acceptability presented similar scores, ranging from 6.2 to 6.9, with consistency between 213.3 and 2,466.6 gf/cm² between 5 and 15 °C. Therefore, the results obtained suggest that the TS40:60 tablespread may be considered the best formulation due the good technological parameters and good probiotic viability and survival under *in vitro* simulated gastrointestinal stress, besides presenting the highest sensory acceptance.

Key-words: Functional foods; Probiotics; Inulin; Milkfat; Palm olein.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Fluxograma de elaboração de emulsão alimentícia potencialmente probiótica.....62
- Figura 2.** Curvas de cristalização da gordura do leite anidra (A) e da oleína de palma (B) puras obtidas à velocidade de resfriamento de 10 °C/min.....66
- Figura 3.** Curvas de cristalização da base gordurosa da margarina comercial (BGMC) e das misturas GL:OP em diferentes proporções obtidas à velocidade de resfriamento de 10 °C/min.....68
- Figura 4.** Curvas de fusão da gordura do leite anidra e da oleína de palma obtidas à velocidade de aquecimento de 5 °C/min.....69
- Figura 5.** Curvas de fusão da base gordurosa da margarina comercial (BGMC) e das misturas em diferentes proporções obtidas à velocidade de aquecimento de 5 °C/min.....70
- Figura 6.** Consistência da base gordurosa da margarina comercial (BGMC) e das misturas GL:OP em diferentes proporções em função da temperatura71
- Figura 7.** Consistência das misturas em diferentes proporções em função do total de ácidos graxos saturados.....74
- Figura 8.** Consistência das emulsões alimentícias produzidas e da margarina comercial em função da temperatura.....75

CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Sobrevivência de *B. animalis* Bb-12 nas emulsões alimentícias probióticas (EA 40:60 e E2 20:80) durante o armazenamento por 7, 14, 21 e 28 dias (i, ii, iii e iv, respectivamente) antes (0h) e durante a exposição às condições gástricas (2 h) e entéricas simuladas (4 h e 6 h).....100
- Figura 2.** Sobrevivência de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 nas emulsões alimentícias probióticas (EA 40:60 e EA 20:80) durante o armazenamento por 35 dias (i), e durante a exposição às condições gástricas (ii) e entéricas simuladas (iii e iv), através dos métodos convencional (MRS-LP: ágar DeMan-Rogosa-Sharpe, com adição de Cloreto de Lítio e Pronionato de Sódio), qPCR com tratamento PMA e sem PMA.....104

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1.** Planejamento experimental empregado no desenvolvimento das bases gordurosas.....58
- Tabela 2.** Formulação das emulsões alimentícias.....61
- Tabela 3.** Composição em ácidos graxos base gordurosa da margarina comercial (BGMC) e das misturas GL:OP e seus respectivos índices de acidez, iodo e saponificação.....64
- Tabela 4.** Ponto de fusão da base gordurosa da margarina comercial (BGMC) e das misturas.....70
- Tabela 5.** Coeficientes de regressão múltipla dos valores de consistência das misturas em função do teor de ácidos graxos saturados e seus respectivos coeficientes de determinação R^2 73
- Tabela 6.** Escores de aceitabilidade para as formulações de emulsão alimentícia (média \pm desvio padrão), após 7 e 21 dias de armazenamento refrigerado a $5 \pm 1^\circ\text{C}$76
- Tabela 7.** Números de citações de atributos positivos e negativos mencionados pelos provadores às emulsões alimentícias EA 40:60 e EA 20:80, considerando todo o período de armazenamento.....77

CAPÍTULO 3

- Tabela 1.** Ingredientes e respectivas proporções utilizadas nas emulsões alimentícias estudadas.....90
- Tabela 2.** Condições utilizadas nas reações de qPCR para a quantificação de *B. animalis* Bb-12.....95
- Tabela 3.** Valores de pH (média \pm desvio-padrão) obtidos para as emulsões alimentícias após armazenamento refrigerado.....96
- Tabela 4.** Populações de *B. animalis* Bb-12 (média \pm desvio padrão) obtidas para emulsões alimentícias (fases emulsão e aquosa) ao longo do armazenamento refrigerado.....97
- Tabela 5.** Valores referentes à contagem de bolores e leveduras (log UFC/g), obtidos para as emulsões alimentícias refrigeradas, ao longo do seu armazenamento por até 28 dias.....99
- Tabela 6.** Taxa de sobrevivência (%) de *B. animalis* Bb-12 (média \pm desvio padrão) frente às condições gastrointestinais simuladas *in vitro* nas formulações de emulsões alimentícias.....102

LISTA DE ABREVIACÕES

- AGCC – Ácidos graxos de cadeia curta
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AOCS – *American Oil Chemists Society*
- B. – *Bifidobacterium*
- CLA – Ácido linoleico conjugado
- CMP - Caseinomacropéptido
- CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- DHA – Ácido docosahexaenoico
- DSC – *Differential Scanning Calorimetry* (Calorimetria Exploratória Diferencial)
- DVS – *Direct vat set*
- E. coli – *Escherichia coli*
- EPA – Ácido eicosapentaenoico
- FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- FDA – *Food and Drug Administration*
- FOS – Fruto-oligossacarídeos
- FOSHU – *Food for Specific Health Use*
- GOS – Glico-oligossacarídeos
- HDL-c – *High density lipoprotein*
- IMO – Isomalto-oligossacarídeos
- IS – Índice de saponificação
- L. – *Lactobacillus*
- LDL-c – *Low density lipoprotein*
- Ágar MRS – ágar DeMan-Rogosa-Sharpe
- Subsp. – Subespécie
- TAG – Triacilglicerol
- TGI – Trato gastrointestinal
- TOS – Transgalacto-oligossacarídeos
- UFC – Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

Apresentação	14
CAPÍTULO 1	18
1.1. REVISÃO DE LITERATURA	19
1.2. Alimentos Funcionais	19
1.3. Probióticos.....	21
1.4. <i>Bifidobacterium</i> spp.	26
1.5. Prebióticos.....	28
1.6. Aspectos nutricionais e tecnológicos dos lipídios nos alimentos	31
1.7. Oleína de palma e gordura do leite	34
1.8. Emulsões alimentícias como potenciais veículos para micro-organismos probióticos	36
2. REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO 2	52
Desenvolvimento e aceitação sensorial de emulsão espalhável potencialmente simbiótica contendo gordura do leite.	53
RESUMO	53
ABSTRACT	54
1. INTRODUÇÃO.....	55
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
2.1. Material	56
2.2. Caracterização de margarina comercial e sua base lipídica	57
2.3. Delimitação experimental das bases gordurosas e preparo das misturas	57
2.4. Análises das características físico químicas das bases gordurosas.....	58
2.4.2. Composição em ácidos graxos e índices de iodo e saponificação.....	58
2.4.3. Consistência.....	59
2.4.4. Comportamento de cristalização e fusão.....	59
2.5. Preparo do inóculo contendo a cultura probiótica	60
2.6. Preparo das emulsões alimentícias potencialmente probióticas	60
2.7. Análise sensorial.....	62
2.8. Análise estatística	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
3.1. Composição em ácidos graxos	63
3.2. Comportamentos de cristalização e fusão	66
3.3. Consistência.....	71
3.4. Aceitação sensorial	76
4. CONCLUSÃO.....	78
5. REFERÊNCIAS	78
CAPÍTULO 3	84
Viabilidade e sobrevivência gastrointestinal simulada in vitro de <i>Bifidobacterium</i> <i>animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 em emulsões alimentícias	85
RESUMO	85
ABSTRACT	86

1.	INTRODUÇÃO.....	87
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	88
2.1.	Material	88
2.2.	Preparo do inóculo contendo a cultura probiótica	89
2.3.	Produção das emulsões alimentícias	89
2.5.	Determinação de pH	90
2.6.	Determinação da viabilidade de <i>B. animalis</i> Bb-12	91
2.7.	Contagem de micro-organismos indicadores de contaminação	91
2.8.	Sobrevivência da <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 frente às condições gastrointestinais simuladas <i>in vitro</i>	92
2.8.1.	Cálculo da Taxa de Sobrevivência	92
2.9.	Avaliação da sobrevivência do micro-organismo <i>B. animalis</i> Bb-12 em qPCR.....	93
2.10.	Análise estatística	95
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95
3.1.	Valores de pH e viabilidade da cepa probiótica	95
3.2.	Micro-organismos indicadores de contaminação – bolores e leveduras e <i>Escherichia coli</i>	98
3.3.	Sobrevivência da <i>B. animalis</i> Bb-12 frente às condições gastrointestinais simuladas <i>in vitro</i>	99
4.	CONCLUSÃO.....	106
5.	REFERÊNCIAS	107
	CONCLUSÕES GERAIS DO TRABALHO	112
	ANEXOS	113

APRESENTAÇÃO

Os alimentos probióticos e prebióticos destacam-se entre os alimentos funcionais graças às confirmações acerca da influência da microbiota intestinal sobre processos metabólicos do organismo humano (SHIMIZU, 2003; SOMMER & BÄCKHED, 2013). Probióticos são considerados micro-organismos vivos que, administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, 2001). Entre estes, as bifidobactérias destacam-se como um dos gêneros mais estudados, sendo a cepa Bb-12 a mais utilizada na produção de alimentos e fórmulas lácteas em virtude de sua segurança alimentar e ação probiótica comprovada (OUWEHAND et al., 2004).

Os prebióticos, por sua vez, são definidos como ingredientes seletivamente fermentáveis que permitem modificações específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrintestinal, resultando em benefícios ao bem estar e à saúde do hospedeiro (GIBSON & ROBERFROID, 2008; SAAD et al., 2011), sendo a inulina amplamente utilizada como um ingrediente prebiótico. Esta fibra pertence à classe dos frutanos, um grupo de polissacarídeos encontrados em vegetais e frutos.

A suplementação de emulsões alimentícias com ingredientes funcionais, como fibras e micro-organismos probióticos, surge como uma proposta promissora para o mercado de alimentos funcionais. SOUZA et al. (2010) desenvolveram uma margarina de mesa probiótica adicionada do ingrediente prebiótico inulina e do micro-organismo probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, contendo 60% de lipídios (SAAD, S.M.I.; SOUZA, C.H.B.; GIOIELLI, L.A.; FAPESP. Probiotic and/or prebiotic spread for use as functional food. Patent deposit April 11th 2008. P.I. 0.802.264-0). A suplementação da fase aquosa das margarinas probióticas com ingredientes que pudessem proteger o micro-organismo durante os processos tecnológicos empregados na produção do alimento, bem como durante o seu armazenamento refrigerado, mostrou-se fundamental para a sobrevivência do micro-organismo probiótico nessa matriz alimentícia, particularmente na presença de inulina. Para a obtenção de boa viabilidade do probiótico no produto e melhores perspectivas de sobrevivência no trato gastrintestinal, recomendou-se a adição de inulina à margarina na proporção de 2,25 a 3%, podendo ser combinada com concentrado de caseína (CMP), na proporção de 2,25 a 3%, totalizando 3% dos dois ingredientes na formulação. Entretanto, as formulações estudadas apresentaram aceitação sensorial que variou entre "gostei

ligeiramente" e "gostei regularmente". Além disso, as margarinas apresentaram consistência muito dura em temperaturas de refrigeração.

No presente trabalho, buscando melhorar a textura e aceitação nos testes sensoriais da emulsão alimentícia potencialmente simbiótica previamente desenvolvida, foi proposta a substituição da base gordurosa utilizada por misturas de gordura do leite com oleína de palma. A gordura do leite, principal componente da manteiga, possui atributos de sabor de alta aceitação pelo consumidor. Entretanto, possui baixa plasticidade à temperatura de refrigeração, além de conter alto teor de gordura saturada (NUNES et al., 2011). Por sua vez, a oleína de palma, produto obtido do óleo de palma por fracionamento, poderia conferir melhor plasticidade ao produto, considerando a baixa espalhabilidade da manteiga tradicional à temperatura de refrigeração. Além disso, a oleína de palma apresenta maior grau de insaturação do que a GL e maior estabilidade oxidativa quando comparada aos demais óleos vegetais. É ideal para a mistura com gorduras de alto ponto de fusão para ser aplicada em diversos produtos (SOARES et al., 2009; MDA et al., 2015). O estudo de Ract (2006) sobre o desenvolvimento de lipídios estruturados à base de gordura do leite como alimento funcional mostrou que a adição de 40% de óleo de girassol e 25% de ésteres de fitosteróis aumentou em cerca de 60% o teor de ácidos graxos insaturados da gordura do leite, que originalmente possuía 33% de ácidos graxos insaturados. As misturas que apresentaram comportamento e composição mais adequados para o preparo de emulsões do tipo margarina foram selecionadas para o preparo de uma emulsão alimentícia potencialmente probiótica, de forma a aprimorar seu potencial para uma futura produção industrial e comercialização.

Sendo assim, os objetivos gerais do presente trabalho foram:

Geral: Melhorar as características sensoriais de uma emulsão alimentícia probiótica previamente desenvolvida pelo grupo de pesquisa, adicionada da cultura comprovadamente probiótica de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, inulina (2%) e caseinomacropéptido (1%), pela substituição da base gordurosa previamente utilizada.

Específicos:

- (i) Determinar as características físico-químicas das misturas de gordura do leite e oleína de palma, comparando-as com a base lipídica de uma margarina comercial e com dados descritos na literatura;
- (ii) Preparar as emulsões alimentícias potencialmente probióticas a partir de misturas de gordura do leite e oleína de palma previamente selecionadas e determinar suas

propriedades físico-químicas durante seu armazenamento refrigerado, comparando-as com as propriedades de uma margarina comercial;

- (iii) Caracterizar e avaliar a aceitabilidade do produto sob o ponto de vista sensorial;
- (iv) Verificar a viabilidade da cepa probiótica de *Bifidobacterium animalis* Bb-12 incorporada à emulsão alimentícia e sua resistência às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro* no produto durante o seu armazenamento.

Para esse fim, a presente Dissertação de Mestrado foi dividida em 3 capítulos distintos, a saber:

Capítulo 1: Apresenta o embasamento bibliográfico abordando os principais temas envolvidos no trabalho.

Capítulo 2: Desenvolvimento e aceitação sensorial de emulsão espalhável potencialmente simbiótica contendo gordura do leite.

Esta seção teve como objetivo avaliar a composição físico-química de bases gordurosas produzidas a partir de gordura do leite e oleína de palma para que fossem selecionadas duas bases gordurosas para a produção de uma emulsão alimentícia probiótica, adicionada de inulina e caseinomacropéptido, avaliar a consistência do produto final e sua aceitação sensorial.

Capítulo 3: Viabilidade e sobrevivência gastrointestinal simulada *in vitro* de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 em emulsões alimentícias

Esta seção teve como objetivo avaliar a viabilidade da cepa probiótica *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 em uma emulsão alimentícia desenvolvida a partir de gordura do leite e oleína de palma, inulina e caseinomacropéptido, avaliar a resistência da cepa probiótica frente às condições gastrointestinais *in vitro* e comparar diferentes métodos de cultivo durante o 35º dia de armazenamento do produto.

Após as referências do capítulo 3, encontram-se as conclusões gerais do presente trabalho.

CAPÍTULO 1

1.1. REVISÃO DE LITERATURA

1.2. Alimentos Funcionais

O interesse dos consumidores por uma alimentação saudável, bem-estar e saúde aliado à busca por um mercado de alimentos diferenciados faz com que a indústria tenha como desafio atender à demanda por produtos que sejam saborosos, visualmente atrativos e que, ao mesmo tempo, sejam saudáveis (DAS & CHAKRABORTY, 2014). A procura por produtos que concentrem benefícios à saúde é cada vez maior. Com isso, as indústrias têm procurado desenvolver novas tecnologias, com a intenção de suprir as necessidades do mercado, colocando novos produtos à disposição do consumidor. Entre os novos produtos que surgem no mercado, destacam-se os alimentos funcionais, que têm como finalidade reforçar a dieta, promovendo a saúde através de mecanismos não previstos na nutrição convencional (SAAD et al., 2011a; SHARMA & DEVI, 2014).

Para ser considerado funcional, um alimento deve demonstrar satisfatoriamente um ou mais efeitos benéficos sobre funções-alvo no organismo, além de um efeito nutricional adequado, tanto para o bem-estar e a saúde, quanto para a redução do risco de alguma doença. Esses alimentos devem permanecer em sua forma original e, quando consumidos em quantidades normalmente ingeridas na dieta, devem proporcionar efeitos benéficos à saúde (ROBERFROID, 2002a). É importante que possam ser facilmente incorporados à dieta, não podendo ser administrados na forma de pílulas, cápsulas ou ampolas. Sendo assim, um alimento funcional pode ser: um alimento natural, um alimento com adição de algum componente ou um alimento em que um ou mais componentes tenham sido modificados (SAAD et al., 2011b), sendo sua funcionalidade devida aos seus ingredientes bioativos que podem auxiliar na prevenção de doenças crônicas e/ou aumentar a qualidade e bem-estar do indivíduo (ARVANITOYANNIS & HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, 2005).

Os alimentos funcionais foram introduzidos no Japão na década de 80, quando se intensificaram as pesquisas sobre alimentos que contribuíam para efeitos benéficos ao organismo. Entre eles, estão os alimentos processados que contêm ingredientes com funções específicas no organismo. Na ocasião, o avanço de idade da população tornava-se evidente e observava-se uma mudança para um estilo de vida mais ocidental, isto é, com aumento do consumo de *fast food* e alimentos de origem animal (carne, manteiga, leite e ovos) entre as gerações mais novas, ocasionando aumento dos gastos com a saúde pública.

Em 1991, o ministério da saúde e bem-estar japonês estabeleceu uma regulação para a rotulagem destes alimentos que foram definidos como “Alimentos para uso específico em saúde” (*Foods for Specified Health Use – FOSHU*) (ARAI, 1996; ROBERFROID, 2002a; OHAMA et al., 2006). Para serem classificados como FOSHU, os alimentos devem seguir os pré-requisitos estabelecidos em 1991, sendo eles: demonstrar eficácia baseada em estudos científicos em humanos, animais e em ensaios *in vitro*, ser seguro para o consumo humano e comprovar a efetividade dos componentes utilizados (SHIMIZU & HACHIMURA, 2011).

Os critérios para a aprovação de alimentos funcionais variam entre os países, pois cada um possui suas próprias legislações regulatórias para alimentos funcionais (FOLIGNÉ et al., 2013; KUMAR et al., 2015). Nos Estados Unidos, a definição para funcionais foi estabelecida em 1990. Entretanto, apenas em 1994, permitiu-se a utilização de alegações de benefícios à saúde para alimentos contendo ingredientes funcionais, por parte do FDA (*Food and Drug Administration*). Estas alegações haviam sido permitidas após a constatação de evidências científicas que demonstravam relação entre a ingestão e a prevenção e/ou cura de algumas doenças (ROBERFROID, 2000).

O termo “alimentos funcionais” tem sido definido diversas vezes. No entanto, até hoje não há uma definição aceita mundialmente (HASLER, 2002; MARTIROSYAN & SINGH, 2015). Em muitos países, sequer há legislação que diferencie o alimento convencional do funcional. As culturas oriental e ocidental ainda divergem consideravelmente no que diz respeito à natureza dos alimentos funcionais. Enquanto no Japão há uma classe específica para estes produtos (FOSHU), na Europa e EUA não há um grupo separado para definir o alimento funcional, sendo a sua definição considerada como um conceito, devendo-se adicionar uma funcionalidade a algum alimento já existente (ROBERFROID, 2002b; SIRÓ et al., 2008; KUMAR et al., 2015).

A legislação brasileira não possui uma definição para alimentos funcionais, elucidando apenas a alegação de propriedade funcional ou de saúde, diretrizes para sua utilização e suas condições de registro. Devem ser obrigatoriamente registrados junto ao órgão competente todas as substâncias bioativas e probióticos isolados, os alimentos com alegação de propriedade funcional e/ou de saúde e para alimentos novos e novos ingredientes, produzidos no Brasil ou importados. Além disto, sua propaganda deve seguir legislação específica para rotulagem, e suas alegações devem estar de acordo com as diretrizes da política pública de saúde (PNAN – Política Nacional de Alimentação e Nutrição) (STRINGHETA et al., 2007). As alegações podem fazer referências à manutenção geral da saúde, ao papel fisiológico dos

nutrientes e não nutrientes e à redução do risco a doenças. Não são permitidas alegações de saúde que façam referência à cura ou prevenção de doenças (AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1999).

Japão, Estados Unidos e Europa estão entre os maiores consumidores de alimentos funcionais. Apenas no Japão, entre os anos de 1988 e 1998, foram lançados no mercado mais de 1700 alimentos funcionais. Nos países europeus, Reino Unido, Alemanha, França e Itália lideram o setor de funcionais, sendo a Europa um mercado heterogêneo e com diferentes níveis de aceitação (BIGLIARDI & GALATI, 2013). As regiões mais próximas ao mar Mediterrâneo prevalece a preferência a alimentos naturais e frescos e há um menor consumo de alimentos funcionais (SIRÓ et al., 2008).

Em 2011, o mercado mundial de alimentos funcionais faturou cerca de US\$ 150 bilhões (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO, 2012). Já no ano de 2013, o mercado de alimentos e bebidas movimentou cerca de US\$ 750 bilhões, sendo que, uma parcela significativa de US\$ 264 bilhões correspondeu aos produtos funcionais ou fortificados. Atualmente, a América Latina representa US\$ 45 bilhões ou 17% deste mercado de alimentos e bebidas funcionais, no qual, o Brasil é o principal responsável, movimentando US\$ 14,6 bilhões deste total (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2014).

O Brasil possui um processo de registro burocrático para alimentos e bebidas. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é rigorosa sobre o uso de alegações e propagandas em embalagens para alimentos funcionais, levando a grandes investimentos financeiros e de tempo. Além disso, a ANVISA permite apenas que uma seleta lista de nutrientes e substâncias possam ser considerados funcionais, sendo eles: ácidos graxos (DHA e EPA, ácidos graxos da série ômega-3, encontrados em óleos de peixes), carotenoides (licopeno, luteína e zeaxantina), fibras alimentares (β -glicana, dextrina resistente, fruto-oligossacarídeos, goma guar parcialmente hidrolisada, inulina, lactulose, povidexose, *psillium* e quitosana), fitosteróis, poliois, proteína de soja e probióticos (AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008).

1.3. Probióticos

O corpo humano adulto contém cerca de 10 vezes mais micro-organismos do que células somáticas, sendo que o trato gastrointestinal possui 100 vezes o número de genes do genoma humano (BÄCKHED et al., 2005). No trato gastrointestinal reside uma ampla variedade de bactérias, acima de 500 tipos de espécies (LEAHY et al., 2005), sendo sua

distribuição heterogênea ao longo de sua extensão. O cólon possui um complexo e dinâmico ecossistema microbiano, com alta concentração de bactérias, podendo ultrapassar 10^{11} a 10^{12} Unidades Formadoras de Colônias por mililitros (UFC/mL). Estima-se que apenas o cólon contenha cerca de 70% de toda a microbiota presente no corpo humano (SEKIROV et al., 2010).

A quantidade de micro-organismos presentes no trato gastrointestinal ascende de 10^1 - 10^3 UFC/g nas regiões do estômago e duodeno para 10^4 - 10^7 UFC/g nas regiões do jejuno e íleo (O'HARA et al., 2006), enquanto na região do cólon essa quantidade de micro-organismos varia de 10^{11} a 10^{12} UFC/g (LEY et al., 2006). A porção superior do intestino é composta por bactérias que competem com seu hospedeiro para a digestão de monossacarídeos, enquanto que a porção distal é colonizada por bactérias fermentadoras de carboidratos complexos e proteínas (KUMAR et al., 2016).

A colonização microbiana do intestino humano inicia-se imediatamente após o nascimento, momento em que o recém-nascido é exposto a uma complexa população microbiana. Este contato mostra-se importante para o desenvolvimento da microbiota intestinal da criança, que sofre alterações durante os primeiros meses (SOMMER & BÄCKHED, 2013). Após um ano de idade, a microbiota intestinal das crianças assemelha-se à de adultos, sendo a sua composição única para cada indivíduo e estável quase todo o tempo da vida adulta e início da terceira idade (KOENIG et al., 2011; CLEMENTE et al., 2012; KUMAR et al., 2016).

A maior parte da microbiota gastrointestinal é composta por bactérias anaeróbicas estritas, seguidas de anaeróbicas facultativas e aeróbicas (XU & GORDON, 2003). Em indivíduos adultos, os filos Bacteroidetes e Firmicutes usualmente estão em maiores quantidades na microbiota intestinal, seguidos de Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia, em menores proporções (TOJO et al., 2014; JANSSEN & KERSTEN, 2015). A relação microbiota x hospedeiro é mutualística (BÄCKHED et al., 2005). Dessa forma, a microbiota desempenha importante papel em numerosas funções metabólicas e imunológicas para a manutenção da saúde e prevenção de doenças (SEKIROV et al., 2010).

Muitos fatores podem afetar a composição da microbiota do trato gastrointestinal (TGI) humano, bem como a dieta, idade, susceptibilidade a infecções, fatores nutricionais, estado imunológico, tempo de trânsito, pH, a presença de material fermentável no lúmen e também a interação entre os componentes da microbiota (SHARMA & DEVI, 2014).

No entanto, a dieta mostra-se como um dos principais fatores para a alteração da composição da microbiota intestinal (CLEMENTE et al., 2012). FILIPPO et al. (2010) avaliaram o efeito da dieta sobre a microbiota intestinal de crianças saudáveis que vivem em Burkina Fasso, na África, e de crianças saudáveis residentes em Florença, na Itália. As crianças de Burkina Fasso possuíam uma alimentação com maior consumo de cereais ricos em fibras e vegetais e baixo consumo de gorduras e proteínas de origem animal. Nessas crianças se detectou uma microbiota mais diversificada, com maior predominância de *Bacteroidetes* em relação a *Firmicutes*, com maior produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), além da presença de bactérias degradadoras de hemicelulose e celulose. Já nas crianças italianas, que possuem uma dieta mais ocidentalizada, a microbiota revelou-se mais rica em *Firmicutes* e com maiores proporções de *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* e *Klebsiella* e com baixa produção de AGCC.

Para avaliar o efeito da dieta sobre a microbiota, TURNBAUGH et al. (2009) transplantaram fezes de humanos saudáveis que possuíam dieta tipicamente ocidental em ratos totalmente livres de microbiota (*germ-free*). Os resultados mostraram que houve um aumento de adipócitos, aumento de peso e uma redução significativa de *Bacteroidetes* e aumento de *Erysipelotrichi*, uma classe de bactérias do filo *Firmicutes*, quando comparados aos ratos que receberam o transplante de fezes de humanos que possuíam uma dieta mais saudável e com menor teor lipídico.

A biodiversidade na microbiota intestinal faz-se necessária, pois diferentes micro-organismos secretam diferentes enzimas, devido à sua afinidade com o nutriente ou deficiência para a secreção enzimática e a sua metabolização (BÄCKHED et al., 2005; YATSUNENKO et al., 2012). Pesquisas sobre a microbiota humana têm mostrado diferentes variações entre os indivíduos, principalmente na composição de sua microbiota intestinal, sugerindo a necessidade de personalizar terapias que visam à utilização de medicamentos com a combinação de probióticos para restaurar o balanço da microbiota gastrointestinal e corrigir a disbiose (CHALUVADI et al., 2016).

O aumento do conhecimento sobre a influência da microbiota intestinal sobre os processos metabólicos do organismo humano (COLLINS et al., 2012; SOMMER & BÄCKHED, 2013) fez com que os alimentos funcionais sejam vistos como tendo um importante papel para a modulação da saúde intestinal. Dessa forma, a prevenção de doenças ocasionadas pelo atual estilo de vida é de extrema importância, visto que as despesas atuais com saúde pública são elevadas (DAS & CHAKRABORTY, 2014), além disso, distúrbios da

microbiota têm sido associados às doenças crônicas por pesquisadores e profissionais da saúde (KUMAR et al., 2016). Neste atual cenário, destacam-se os alimentos probióticos e prebióticos, considerados uma classe de alimentos funcionais que regulam o equilíbrio da função intestinal de cada indivíduo (SHIMIZU, 2003).

A palavra “probiótico” deriva do grego, que significa “para a vida” e/ou “a favor da vida”. Foi introduzida pela primeira vez em 1965, por Lilley & Stillwell, para descrever micro-organismos que desempenhavam atividades benéficas (SCHREZENMEIR & VRESE, 2001; VEMURI et al., 2014). Em 1989, os probióticos foram definidos como um suplemento alimentar microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro através da melhora do balanço microbiano intestinal (FULLER, 1989). Porém, nos últimos anos, diversas outras definições foram publicadas, sendo a definição da FAO/WHO a mais aceita mundialmente, sendo os probióticos considerados vivos, que administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

Recentemente, o conceito de probióticos foi revisado por diversos especialistas, reunindo-se na Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (*International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics – ISAPP*) para discutir conceito proposto em 2001. Isto porque, o termo proposto para a designação dos probióticos tem sido utilizado de forma errônea em produtos como colchões, *shampoos*, desinfetantes e cremes pós-barba em que não há estudos para a comprovação da eficácia dos micro-organismos utilizados nesses tipos de produtos. No entanto, a definição permaneceu a mesma, apenas com pequenas modificações ortográficas (HILL et al., 2014). No Brasil, em 2002, através da RDC n. 02, a ANVISA definiu probióticos como micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo.

Para que possam ser considerados probióticos e adicionados aos alimentos, os micro-organismos devem possuir origem na microbiota intestinal sadia, apresentar estabilidade, ser seguros (não possuir propriedades patogênicas e antigenotóxicas), sobreviver à passagem através do trato gastrointestinal humano, ou seja, resistir ao suco gástrico, pancreático e à bile, e possuir a capacidade de desenvolver-se no intestino humano por meio da adesão celular ao intestino do hospedeiro. A adesão do micro-organismo probiótico à mucosa intestinal é necessária, pois os movimentos peristálticos do intestino os eliminariam. Sendo assim, há uma vantagem competitiva sobre os micro-organismos patogênicos (SAARELA et al., 2000; VASILJEVIC & SHAH, 2008; LERAYER et al., 2013).

A principal função dos micro-organismos probióticos é realizar a reposição da microbiota intestinal normal que possa ter sido desbalanceada devido ao uso de medicamentos, situações de estresse em seu hospedeiro, ou mesmo, devido à dieta (RAO et al., 2009). Diversos efeitos benéficos têm sido associados ao consumo de probióticos, principalmente seu efeito sobre doenças gastrointestinais, utilizando modelos animais ou estudos em humanos. Porém, estes efeitos são cepa dependente (AURELI et al., 2011; NAGPAL et al., 2012; SANDERS et al., 2013), sendo eles: proteção contra as desordens do trato gastrointestinal (SOOD et a., 2009; CLARKE et a., 2012), diarreia associada a *Clostridium difficile* e antibióticos (HICKSON et a., 2007; PREIDIS et al., 2011), redução do risco de câncer de cólon (SEARS & PARDOLL, 2011), estimulação do sistema imune (ASHRAF & SHAH, 2014), modulação e crescimento da microbiota, melhora dos sintomas relacionados à intolerância à lactose (HE et al., 2008) e supressão do micro-organismo *Helicobacter pylori* (WANG et al., 2004).

De acordo com FULLER (1989), os micro-organismos probióticos possuem três possíveis mecanismos de atuação, sendo eles: a supressão do número de células viáveis através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por sítio de adesão e nutrientes, o aumento ou diminuição da atividade enzimática, levando à alteração do metabolismo microbiano, e o estímulo da imunidade do hospedeiro devido ao aumento dos níveis de anticorpos e da atividade dos macrófagos.

O mercado de probióticos, em 2011, faturou cerca de US\$ 27,9 bilhões e a previsão para 2018 é chegar até US\$ 44,9 bilhões (SYBESMA et al., 2015). Esse mercado é dominado pelas bactérias probióticas *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, seguidos de outros tipos de gêneros bacterianos (algumas espécies de *Bacillus*, *Clostridium* e *Escherichia*) e bactérias lácticas (algumas espécies de *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* e *Streptococcus*) (FOLIGNÉ et al., 2013). O desenvolvimento de novos produtos alimentícios torna-se cada vez mais abrangente e desafiador à medida que o mercado procura atender as exigências dos consumidores por produtos saudáveis e atrativos.

Logo, muitos autores reportam a adição de micro-organismos probióticos a alimentos, entre os quais iogurtes (MORTAZAVIAN et al., 2006; KUMAR & KUMAR, 2015), leites fermentados (MARTÍN-DIANA et al., 2003), sorvete (BASYIGIT et al., 2006), sobremesas (CORRÊA et al., 2008; OZKAN et al., 2010; SILVA et al., 2012), queijos (BURITI et al., 2008; CRUZ et al., 2009; VINDEROLA et a., 2009; CHAVES & GIGANTE, 2016) e bebida a base de *buttermilk* (ANTUNES et al., 2007).

1.4. *Bifidobacterium* spp.

As bifidobactérias foram isoladas pela primeira vez pelo francês Henry Tissier no final do século XIX. Na época, Tissier estudava a diarreia em crianças, o que o levou a descobrir bactérias com formatos irregulares e em forma de “Y” e que predominavam nas fezes de crianças saudáveis e alimentadas com leite materno. Mais tarde, o pediatra francês sugeriu que esta “bifido bactéria” poderia ser utilizada para o tratamento de pacientes com diarreia, com o objetivo de restaurar a microbiota intestinal (LEAHY et al., 2005; VASILJEVIC & SHAH, 2008; SMOLYANSKY, 2010).

O gênero *Bifidobacterium* pertence ao filo das actinobactérias, um dos principais filamentos do reino das bactérias, com cinco subclasses, seis ordens e quatorze subordens, além de conter células com diferentes morfologias e propriedades metabólicas e ocupar diversos nichos ecológicos. Este filo é composto não apenas de bactérias benéficas, mas também inclui bactérias que interagem negativamente com o hospedeiro humano, como certos membros dos gêneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Tropheryma* e *Propionibacterium*, causando doenças (VENTURA et al., 2015).

As bifidobactérias são Gram-positivas não formadoras de esporos, catalase-negativas, não possuem flagelos, não se aglutinam e são estritamente anaeróbias, produzindo ácido acético e ácido lático na proporção 3:2. Entretanto, a sensibilidade ao oxigênio pode variar de acordo com a espécie (TALWALKAR & KAILASAPATHY, 2003; BOLDUC et al., 2006; VASILJEVIC & SHAH, 2008). A estrutura da parede celular é típica de bactéria Gram-positiva, pois consiste em uma espessa camada de peptidoglicano, contendo polissacarídeos, proteínas e ácido teicóico. A composição de aminoácidos presentes pode variar de acordo com as espécies ou mesmo entre bactérias da mesma espécie (LEAHY et al., 2005). Apresentam crescimento ótimo entre 37 e 41 °C e pH ótimo entre 6 e 7 (LEE, 2005).

Atualmente, o gênero é composto por mais de 30 espécies, sendo principalmente isoladas de animais e do intestino humano (VENTURA et al., 2015). No homem são comumente encontradas espécies que incluem *B. adolescentes*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. longum*, *B. pseudocatenulatum* e *B. pseudolongum*. Entretanto, *B. animalis* subsp. *lactis* é a espécie/subespécie mais utilizada em produtos com adição de probióticos. São capazes de utilizar a galactose, a lactose e a glicose como fontes de carbono (WELLS et al., 2008; TOJO et al., 2014).

A população de *Bifidobacterium* é elevada em recém-nascidos. Durante a fase adulta, ocorre uma queda acentuada no trato gastrointestinal, embora ainda permaneça um percentual representativo entre 3 a 6% da microbiota total (HOPKINS et al., 2001; TOJO et al., 2014). Assim como os demais micro-organismos probióticos, as bifidobactérias estão relacionadas a diversos efeitos benéficos ao hospedeiro, bem como a fermentação de carboidratos não digeríveis que, por sua vez, auxiliam na absorção de cálcio e levam à produção de butirato, propionato e acetato (ácidos graxos de cadeia curta - AGCC) (POKUSAEVA et al., 2011; VENTURA et al., 2012).

Outros efeitos benéficos compreendem a redução do pH intestinal, redução dos níveis séricos de amônia através da fermentação de proteínas, produção de vitaminas K e do complexo B, imunestimulação, redução de quadros de diarreia, e efeitos hipocolesterolêmico e anticarcinogênico. A produção de butirato reduz o pH do cólon e fornece energia para os colonócitos, enquanto que o acetato e o propionato são absorvidos e levados para o fígado através da veia porta e metabolizados pelos tecidos periféricos (músculos), além de estarem envolvidos na modulação do metabolismo da glicose (GUARNER & MALAGELADA, 2003; RASTALL, 2004; SHAH, 2007; VENTURA et al., 2012).

Sob condições normais, as bifidobactérias são capazes de inibir o crescimento de micro-organismos oportunistas, bem como o *Clostridium difficile* e *Clostridium perfringens*, ou patogênicos (*Salmonella* e *Listeria*), com a produção de metabólitos antimicrobianos, além de competir por sítios de ligação presentes na mucosa, por espaço e por nutrientes (RASTALL, 2004).

O'MAHONY et al. (2005) estudaram o efeito dos *Lactobacillus salivarius* UCC4331 e *Bifidobacterium infantis* 35624 sobre a síndrome do intestino irritável em indivíduos com idade entre 18 e 75 anos, diagnosticados com a enfermidade na cidade de Cork, Irlanda. Os pacientes que receberam a cepa *B. infantis* 35624 apresentaram uma redução nos sintomas de dor e desconforto, distensão abdominal e constipação e apresentaram melhora na resposta inflamatória, quando comparados aos indivíduos que receberam placebo.

O aumento do valor nutritivo e terapêutico pela ação das bifidobactérias gerou grande interesse para a sua incorporação aos alimentos (MAZO et al., 2009). *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 é um dos micro-organismos mais bem investigados, com ação probiótica comprovada e segura demonstrada através de ensaios clínicos (OUWEHAND et al., 2004). Além disso, a cepa de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 tem sido comercializada há mais de 25 anos (GARRIGUES et al., 2010). Esta cepa, de propriedade da Christian Hansen,

Dinamarca, tem sido utilizada rotineiramente desde 1985 em diversos produtos probióticos (suplementos dietéticos, fórmulas infantis e leites fermentados) comercializados mundialmente (CHRISTIAN HANSEN, 2015).

NABAVI et al. (2014) avaliaram o efeito do consumo de iogurte probiótico em indivíduos com idade entre 23 e 63 anos e IMC entre 25 e 40 kg/m² com doença hepática gordurosa não alcoólica. Quando comparados ao grupo controle, o consumo de 300 g por dia de iogurte contendo *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium lactis* Bb-12 durante 2 meses levou à redução dos níveis séricos de colesterol total (4,1%), LDL-c (6,92%) e das enzimas alanina aminotransferase (4,67%) e aspartato aminotransferase (5,42%), sendo ambas enzimas associadas à lesão hepática.

CHOURAQUI et al. (2004) estudaram o efeito de fórmula infantil acidificada e adicionada de *B. animalis* Bb-12 em crianças saudáveis com idade ≤ 8 meses, com quadro de diarreia. A suplementação levou ao aumento de proteção contra episódios de diarreia aguda nas crianças, resultando em uma redução no número de evacuações/dia e, conseqüentemente, redução de desidratação, redução do número de dias e episódios, além da redução do número de crianças com diarreia, quando comparado às crianças que receberam apenas a fórmula comercial sem a suplementação do probiótico.

1.5. Prebióticos

Desde a sua introdução, o conceito de prebióticos tem atraído atenção da comunidade científica e da indústria. Os prebióticos são definidos atualmente como ingredientes seletivamente fermentáveis que permitem modificações específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, resultando em benefícios ao bem estar e à saúde do hospedeiro (GIBSON & ROBERFROID, 2008; SAAD et al., 2011). Assim como os probióticos, os prebióticos também devem seguir pré-requisitos, como: resistir à passagem pelo trato gastrointestinal, isto é, não ser hidrolisado por enzimas ou ser absorvido, ser fermentável pelos micro-organismos presentes da microbiota intestinal e estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade desta para contribuir com a saúde e bem-estar do hospedeiro (GIBSON et al., 2004; ROBERFROID, 2008; WANG, 2009).

Os principais prebióticos que podem ser empregados pela indústria de alimentos e que são reconhecidos pela legislação brasileira são os fruto-oligossacarídeos (FOS), a inulina, os isomalto-oligossacarídeos (IMO), os glico-oligossacarídeos (GOS) e os transgalacto-

oligossacarídeos (TOS) (AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008). A inulina e os fruto-oligossacarídeos são os mais estudados e utilizados na indústria de alimentos (ROBERFROID, 2005; SAAD et al., 2011).

O termo inulina é utilizado para designar um dos carboidratos do grupo de polissacarídeos denominados frutanos. São encontrados em uma grande variedade de plantas, frutas e vegetais, sendo a raiz de chicória (*Cichorium intybus L.*) a principal fonte. A inulina possui diferentes graus de polimerização, sendo quimicamente constituída por uma cadeia linear de frutose, unida por ligações β -(2 \rightarrow 1) - frutofuranosídicas ligadas a uma única unidade de glicose terminal por meio de ligação α -(1 \rightarrow 2) (GIBSON et al., 2004).

A inulina foi descoberta pelo cientista alemão Valentine Rose durante o início dos anos 1800 como um carboidrato presente em raízes de vegetais, sendo mais tarde, em 1817, nomeado de “inulina”. Apenas em 1864, o fisiologista vegetal Julius Sachs identificou cristais esféricos de inulina aprisionadas em tubos em plantas da família *Asteraceae*, e conseguiu precipitá-la em etanol (APOLINÁRIO et al., 2014). Em plantas, a inulina é utilizada como reserva de energia e, em algumas espécies, como plantas de clima árido, a sua produção ocorre devido a um processo adaptativo para a produção de carboidratos (metabolismo ácido das crassuláceas), atuando também como osmoprotetores, auxiliando o vegetal em condições de seca, que geram alto estresse (BANGUELA & HERNÁNDEZ, 2006).

A inulina é uma fibra alimentar solúvel e fermentável, mas não é digerida pelo trato digestivo humano. Esta incapacidade do organismo humano em digerir frutanos é devida à ausência de enzimas hidrolases capazes de quebrar as ligações β . Mesmo não sendo digeridos, em consequência de sua sensibilidade à acidez estomacal, os frutanos podem sofrer uma hidrólise parcial em suas ligações β . Porém, não contribuem com o valor energético do alimento. Apenas após a sua fermentação pela microbiota intestinal, há uma contribuição de 1,5 kcal/g, em virtude da formação de AGCC (NINESS, 1999; ROBERFROID, 2007; KUNTZ et al., 2013; PESHEV & VAN DEN ENDE, 2014). O produto da hidrólise parcial da inulina é chamado de oligofrutose e possui grau de polimerização entre 2 e 8 monossacarídeos (WANG, 2009).

Do ponto de vista tecnológico, a inulina pode ser utilizada como agente espessante, emulsificante, gelificante e substituto de gordura e de açúcar, o que a torna vantajosa do ponto de vista calórico, pois atua como modificador da textura nos alimentos. Ao ser dissolvida em água, a inulina forma um gel com estabilidade física, constituído por cristais de inulina insolúveis em água, e semelhante à gordura, o que pode ser aprimorado com a adição de

surfactantes e gomas. As aplicações tecnológicas da inulina dependerão de seu grau de polimerização. As frações de cadeia curta possuem sabor adocicado e apresentam maior solubilidade em água, contribuindo para a melhora do sabor do alimento. Já as frações de inulina com alto grau de polimerização e alta solubilidade são propícias para atuarem como modificadores de textura (NINESS, 1999; OLIVEIRA et al., 2004; LÓPEZ-MOLINA, 2005; APOLINÁRIO et al., 2014).

Dentre os benefícios associados ao consumo de alimentos prebióticos, estão a alteração dos parâmetros fisiológicos do sistema digestivo (esvaziamento gástrico, tempo de trânsito, pH e massa fecal), a redução dos níveis sanguíneos de triacilgliceróis e LDL-colesterol e a redução do risco de doenças no trato gastrointestinal, obesidade, diabetes *melitus* tipo II, neoplasias e doenças cardiovasculares, bem como estimulação do sistema imune, redução do pH do cólon, redução do trânsito intestinal, aumento da absorção de cálcio, inibição de crescimento e adesão de micro-organismos patogênicos e produção de AGCC (ROBERFROID, 2005; AL-SHERAJ et al., 2013; PESHEV & VAN DEN ENDE, 2014; KUMAR et al., 2016).

Os efeitos benéficos relatados pelo consumo de prebióticos possuem mecanismos indiretos. Entretanto, alguns estudos têm sugerido que os frutanos presentes nas plantas exercem efeitos antioxidantes, sendo capazes de retardar e/ou inibir compostos químicos reativos de oxigênio (CHEN et al., 2009; KEUNEN et al., 2013). VAN DEN ENDE et al. (2011) sugerem que este processo também pode ocorrer de forma similar em alimentos e no trato gastrointestinal humano, independentemente de seu efeito sobre a microbiota. Os prebióticos devem ser capazes de promover a multiplicação da microbiota gastrointestinal saudável do hospedeiro, levando, conseqüentemente, à maior proporção de bactérias sacarolíticas e à redução de micro-organismos patogênicos (WELLS et al., 2008). O gênero *Bifidobacterium* é o principal alvo para a ação dos prebióticos (LEAHY et al., 2005; WANG, 2009).

A associação de probióticos e prebióticos tem sido usada para a obtenção de efeitos sinérgicos em produtos alimentícios. Essa mistura resulta em alimentos denominados simbióticos (AL-SHERAJI et al., 2013). Um alimento para ser considerado simbiótico deverá conter culturas probióticas e ingredientes prebióticos combinados. A junção de probióticos e prebióticos pode trazer vantagens para ambos, uma vez que os micro-organismos podem fermentar os prebióticos, levando à sua multiplicação. Esse fato leva a uma vantagem

competitiva para os micro-organismos probióticos e conseqüentemente, ao serem ingeridos trazem benefícios ao hospedeiro (RASTALL & MAITIN, 2002; SAAD et al., 2011b).

1.6. Aspectos nutricionais e tecnológicos dos lipídios nos alimentos

Os lipídios presentes na alimentação humana são provenientes de fontes variadas, incluindo plantas, animais e micro-organismos. São essenciais à alimentação, pois possuem papéis fundamentais no organismo humano: são macronutrientes, fornecendo 9 kcal/g, são precursores dos hormônios esteroides (gonadotropinas) e ácidos biliares (necessários para a digestão e absorção dos óleos, gorduras e vitaminas), são fontes de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), exercem ação lubrificante e também são responsáveis pela estrutura de membranas celulares (GIOIELLI, 1996; MARANGONI et al., 2012; SKEAFF & MANN, 2012).

Os ácidos graxos são encontrados na natureza principalmente como ésteres de glicerol, na forma de triacilgliceróis, os principais componentes lipídicos dos alimentos. Os ácidos graxos são constituídos por cadeias de 4 a 30 carbonos, em média, sendo que os que contêm entre 12 e 24 carbonos são os mais comuns. As ligações entre os carbonos podem ser simples ou duplas, o que os classifica como ácidos graxos saturados ou insaturados, respectivamente (HIMAWAN et al., 2006).

O número de carbonos, grau de insaturação e conformação espacial dos ácidos graxos determinam as propriedades físicas dos óleos e gorduras. Durante o resfriamento, as cadeias de carbonos (C-C) dos ácidos graxos saturados podem se sobrepor umas às outras, interagindo através de forças de van der Waals, levando ao empacotamento das moléculas, o que resulta em altos pontos de fusão e consistência rígida. Por outro lado, os ácidos graxos insaturados, presentes em maior quantidade nos óleos (líquidos), contêm uma ou mais duplas ligações em seus carbonos (C=C). Em geral, apresentam-se na configuração *cis*, na qual os átomos de hidrogênio ligados aos de carbono estão em um mesmo lado da molécula. Esta configuração dificulta o empacotamento das moléculas devido à baixa força intermolecular, pois há uma dobra na região dos carbonos com dupla ligação, levando a uma rotação restrita no ácido graxo (SANT'ANA, 2009; PULIGUNDLA et al., 2012; SKEAFF & MANN, 2012).

Modificações na composição química de óleos e gorduras são frequentemente utilizadas para alterar o comportamento de suas propriedades físico-químicas, como ponto de fusão e estabilidade oxidativa, de acordo com o alimento em que o óleo, a gordura ou

misturas destes serão aplicados. O processo de hidrogenação parcial geralmente é aplicado a óleos vegetais, sendo utilizado na produção de uma infinidade de bases gordurosas que são utilizadas em formulações de produtos na indústria alimentícia. A reação ocorre sob temperatura e pressão elevadas, utilizando níquel como catalisador, e é responsável por grande parte das gorduras *trans* presentes nos alimentos (DUIJIN, 2000). Devido à sua estabilidade, baixo custo, funcionalidade e disponibilidade, as gorduras parcialmente hidrogenadas representam uma boa alternativa para a indústria alimentícia, do ponto de vista tecnológico (GAGLIARDI et al., 2009).

Na hidrogenação parcial ocorre a adição de duas moléculas de hidrogênio a cada dupla ligação dos ácidos graxos insaturados em lados opostos, modificando a geometria da molécula, que passa a assemelhar-se a um ácido graxo saturado, transformando o óleo em uma gordura, mas mantendo um determinado grau de insaturação no produto final, com maior estabilidade oxidativa, maior ponto de fusão e maior plasticidade do que o óleo original (LARQUÉ et al., 2001; O'KEEFE, 2008; REMIG et al., 2010).

A partir da década de 1950, ampliou-se o uso da hidrogenação de óleos vegetais, que rapidamente substituíram as gorduras animais. Cerca de 90% dos ácidos graxos *trans* consumidos na dieta atualmente provêm das gorduras parcialmente hidrogenadas, sendo encontrados em produtos industrializados como *fast foods* e em chocolates, bolos, *snacks* e margarinas (PADOVESE & MANCINI FILHO, 2002). Os ácidos graxos *trans* também podem ser formados durante o processo de biohidrogenação em animais ruminantes, no aquecimento de óleo vegetal em frituras e por meio do processo de refino (desodorização dos óleos vegetais), porém, em quantidades menores (LOTTENBERG, 2009; HISSANAGA et al., 2012).

Entretanto, a ingestão de ácidos graxos *trans* aumenta o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, devido à elevação da LDL-c (*Low-density lipoprotein*) e diminuição da HDL-c (*High-density lipoprotein*). Sua ingestão pode afetar o processo inflamatório na aterosclerose, promovendo o aumento da produção de citocinas inflamatórias nas células periféricas mononucleadas do sangue (MOZAFFARIAN et al., 2006; SANTOS et al., 2013).

Em 1999, a Food and Drug Administration (FDA) determinou que todos os produtos embalados deveriam apresentar em sua rotulagem nutricional a quantidade de gordura *trans* presente na porção do produto. Em 2013, em uma nova declaração, a FDA afirmou que as gorduras parcialmente hidrogenadas não são mais consideradas seguras para o consumo

humano (No longer Generally Recognized as Safe – GRAS), porém, apenas em 2015 a Resolução final foi estabelecida, sendo baseada em estudos sobre os efeitos colaterais do consumo de gorduras parcialmente hidrogenadas. Além disso, as indústrias terão um período de três anos para se adequarem à nova decisão e reformularem seus produtos (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2015).

No Brasil, a ANVISA, por meio da resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003 tornou obrigatória a declaração do teor de ácidos graxos *trans* nos rótulos de alimentos industrializados e estabeleceu que apenas produtos alimentícios que contivessem teor de gordura *trans* $\leq 0,2$ g na porção poderiam ser designados como “Zero *trans*”. A regulamentação da publicidade de alimentos no Brasil, a RDC n. 24 de 15 de junho de 2010 determina que, caso os alimentos tenham quantidade igual ou superior a 0,6 g para 100 g ou 100 ml na forma como está exposto à venda, deverá ser declarado como produto com quantidade elevada de gordura *trans*. Assim, caso o alimento apresente essa característica, deverá incluir advertência sobre os riscos do consumo desse tipo de gordura.

Devido às novas recomendações sobre o consumo de *trans*, as indústrias foram obrigadas a adequar as formulações de seus produtos, utilizando gorduras com quantidades reduzidas de ácidos graxos *trans*, de forma que a qualidade sensorial fosse mantida (SANTOS et al., 2013). Dessa forma, a interesterificação e o fracionamento de óleos e gorduras têm sido utilizados pela indústria de alimentos em substituição à hidrogenação e com o objetivo de reduzir o teor de ácidos graxos *trans* nos alimentos.

O uso de métodos de modificação mais naturais para a obtenção de óleos e gorduras faz do fracionamento a seco uma tecnologia "verde", simples e barata, pois não produz efluente, não faz uso de produtos químicos e não apresenta perdas. Também chamado de cristalização fracionada, consiste em um processo de separação no qual uma gordura é parcialmente cristalizada e em seguida a fração líquida é separada da fração sólida. O princípio físico-químico que explica o processo são as diferenças de solubilidade dos triacilglicerois sólidos na fase líquida, dependendo de sua massa molar e grau de insaturação (MDA et al., 2015).

Ao contrário dos outros dois métodos de fracionamento existentes, que utilizam detergentes ou solventes, o fracionamento a seco não faz uso de nenhuma substância adicional. Simplesmente consiste em uma cristalização controlada partindo de um óleo totalmente fundido, seguindo um programa de resfriamento específico para a obtenção de uma determinada fração. Por fim, o uso de filtros-prensa com membranas, além de outras técnicas

de filtração em desenvolvimento constante utilizadas para expulsar o máximo possível da fração líquida ocluída na fração sólida, permitem a obtenção de grande variedade de produtos com alto grau de seletividade, antigamente conseguidos apenas com o uso de solventes (GIBON, 2006; KELLENS et al., 2007).

1.7. Oleína de palma e gordura do leite

Entre os alimentos funcionais, os óleos e gorduras modificados por processos como o fracionamento têm recebido importante atenção, devido ao interesse do consumo adequado por parte de profissionais da saúde e dos consumidores, visando à promoção e manutenção da saúde (NUNES et al., 2010).

Com o crescimento da demanda do consumidor por *spreads* (margarinas ou cremes vegetais) que, além de serem agradáveis ao paladar, podem ser usados no preparo de pratos e possuem boas propriedades físicas, como textura e cremosidade, a produção industrial de manteigas modificadas e produtos à base de manteiga tem servido como um impulso para a indústria alimentícia. Muitos produtos estão presentes nos supermercados de todo o mundo e novos produtos estão surgindo constantemente (SHIMIZU et al., 2011). Dentre a gama de óleos e gorduras modificados por processos industriais, o óleo de palma e a gordura do leite têm sido largamente utilizados em *spreads*, *shortenings* e diversos tipos de produtos devido às suas características tecnológicas atraentes.

O óleo de palma é extraído do mesocarpo do fruto nascido da palmeira (*Elaeis guineensis*), o qual contém entre 56 e 70% de óleo comestível. É utilizado em produtos alimentícios (confeitaria, sorvetes, margarinas, chocolates, maioneses, sopas), pois possui qualidade físico-química desejável para aplicação em alimentos, além de ser um dos óleos mais baratos quando comparados aos óleos de milho e soja (KELLENS et al., 2007; MDA et al., 2015) e o que possui maior produção, sendo que em 2012 produziram-se mais de 60 milhões de toneladas (HANSEN et al., 2015).

Após sua extração, o óleo bruto apresenta coloração vermelho-alaranjada devido à alta presença de carotenoides. Além disso, o óleo possui alta resistência à oxidação, contém ao mesmo tempo triacilglicerois de baixo e alto ponto de fusão, permitindo que seja utilizado sem a necessidade de hidrogenação ou intesterificação (EDEM, 2002). O óleo bruto contém importantes propriedades funcionais, pois contém diversos componentes como fosfolipídios, carotenoides, tocoferóis e tocotrienóis e esteróis (SAMBANTHAMURTHI et al., 2000).

Para que se mantenham os aspectos físico-químicos e componentes nutricionais adequados, é importante que o óleo de palma passe pelo processo de refino, com o objetivo de reduzir todas as impurezas presentes, odor, sabor e cor desagradáveis, fosfatídeos e ácidos graxos livres, reduzindo assim os efeitos da maturação do fruto e conseqüentemente, aumentando a vida de prateleira do produto final. No entanto, o processo de refino leva à perda de vitaminas, provitaminas e antioxidantes (GOH et al., 1985; GIBON et al., 2007).

O óleo de palma refinado contém quantidades semelhantes de gordura saturada e insaturada, sendo rico em ácido palmítico e oleico, com índice de iodo variando entre 51 e 55, sendo o óleo de palma brasileiro o que possui maior tendência à insaturação. Em relação à distribuição dos ácidos graxos na molécula de triacilglicerol no óleo de palma, o ácido oleico encontra-se em grande parte na posição *sn-2* (posição central da molécula de triacilglicerol) (ONG & GOH, 2002; LIN, 2011).

Através do fracionamento do óleo de palma, são extraídas duas principais frações: a oleína de palma e a estearina de palma, que correspondem a 65-70% e 30-35%, respectivamente, do óleo de palma (GUNSTONE & HARWOOD, 2007). A separação da oleína permite que se obtenha um óleo com maior teor de ácidos graxos insaturados, sendo o ácido oleico o de maior proporção. Comparada a outros óleos vegetais, a oleína de palma deteriora com menos facilidade (AINI & MISKANDAR, 2007).

A oleína de palma pode ser aplicada em uma grande variedade de produtos alimentícios, podendo ser incorporada juntamente com outras gorduras de maior consistência para a produção de massas de sovertes, achocolatados, extrusados, biscoitos, produtos de panificação, frituras, margarinas e *shortenings* (ONG & GOH, 2002; AINI & MISKANDAR, 2007; MDA et al., 2015). Porém, por possuir baixo ponto de fusão (~24 °C), a oleína pura não pode ser aplicada para a produção de *spreads* e *shortenings*, sendo ideal para a mistura com gorduras com alto ponto de fusão (SOARES et al., 2009).

A gordura do leite é obtida a partir do leite de vaca. Ocorre naturalmente no leite, formando uma emulsão de óleo em água (FREDRICK et al., 2011). Além da presença dos triacilglicerois, que correspondem a 97,7% da gordura do leite, esta também possui diacilglicerois (0,6%), monoacilglicerois (0,03%), fosfolipídios (0,6%), colesterol (0,3%) e traços de vitaminas. Após a remoção destes compostos, a gordura é chamada de gordura do leite anidra, com no máximo 0,1% de água, sendo amplamente utilizada em produtos lácteos (HERRERA et al., 1999; RØNHOLT et al., 2013).

Após a sua obtenção, a gordura do leite possui uma mistura de vários triacilgliceróis, estimados em mais de 10.000 tipos e mais de 400 tipos de ácidos graxos. A composição diversificada de lipídios presentes no leite é responsável por seu sabor e propriedades físicas únicas. Os ácidos graxos insaturados correspondem de 25 a 30% de sua composição, representados principalmente pelo ácido oleico, enquanto o ácido palmítico é o componente saturado mais abundante. Devido à enorme quantidade de ácidos graxos de cadeias pequenas e longas, a cristalização é extremamente complexa, uma vez que há grande variedade de triacilgliceróis presente, além de também ser afetada pela taxa de resfriamento e polimorfismo (RODRIGUES et al., 2003; WIKING et al., 2009).

A gordura do leite é naturalmente plástica, sendo sólida à temperatura ambiente e mantendo seu formato. Essa plasticidade é um elemento muito importante na sua utilização como ingrediente, já que os óleos vegetais necessitam ser hidrogenados para produzir a plasticidade necessária aos spreads ou substitutos da manteiga. A gordura do leite é completamente líquida acima de 40 °C e completamente sólida abaixo de -40 °C, sendo entre esses extremos, uma mistura de gordura e óleo. Dentro desta ampla faixa de temperatura, ocorre a fusão gradual, oferecendo atributos sensoriais e de textura altamente desejáveis. No entanto, como aspecto tecnológico negativo, a gordura do leite presente em produtos como a manteiga possui baixa espalhabilidade à temperatura de refrigeração devido ao seu alto teor de ácidos graxos saturados e sua distribuição nas moléculas de triacilgliceróis (GERMAN & DILLARD, 1998; HILLBRICK & AUGUSTIN, 2002; NUNES et al., 2010).

Modificações na gordura do leite podem ser realizadas, tanto para alterar seu ponto de fusão e melhorar a espalhabilidade, quanto para reduzir seu teor de ácidos graxos saturados para adequá-la nutricionalmente. Pode ser feita a adição de óleos ricos em ômega-3 e/ou ômega-6 na dieta do gado leiteiro para a redução da taxa de ácidos graxos saturados e aumento dos ácidos graxos insaturados, por exemplo (HILLBRICK & AUGUSTIN, 2002).

1.8. Emulsões alimentícias como potenciais veículos para micro-organismos probióticos

A mistura de manteiga com óleos vegetais que são líquidos à temperatura de refrigeração pode levar a produtos que equilibram a nutrição com as características sensoriais desejáveis e custos de produção mais baixos (ROUSSEAU et al., 1996). A principal tendência está em incorporar o máximo possível de óleo rico em ácidos graxos monoinsaturados ou

poli-insaturados a esses produtos por razões nutricionais, além de melhores propriedades de espalhabilidade (MARANGONI & ROUSSEAU, 1998; NUNES et al., 2010).

Além disso, a suplementação de margarinas com ingredientes funcionais, como fibras ou mesmo com a adição de micro-organismos probióticos, representa um grande avanço na tecnologia de fabricação desses alimentos (SOUZA et al., 2011). O desenvolvimento de novas tecnologias alimentícias aliadas ao emprego de culturas probióticas é promissor, contudo são necessários mais estudos para que estes alimentos possam melhorar suas características sensoriais e principalmente para que possa ser esclarecido o mecanismo de ação das culturas comumente utilizadas no desenvolvimento desses produtos (OLIVEIRA et al., 2002).

De acordo com a Portaria n. 372, de 04 de Setembro de 1997, entende-se por margarina o produto gorduroso em emulsão estável com leite ou seus constituintes ou derivados, e outros ingredientes, destinados à alimentação humana com cheiro e sabor característico. A gordura láctea, quando presente, não deverá exceder a 3% m/m do teor de lipídios totais. A margarina foi criada em 1860 pelo químico Hippolyte Mège-Mouriés, a pedido de Napoleão III, que ofereceria um prêmio a quem criasse um produto similar à manteiga, com o intuito de substituí-la. A primeira fábrica surgiu na Holanda no ano de 1871. A palavra margarina deriva do grego “*margaron*”, que significa pérola, nome dado devido à sua cor de “pérola”. (FLACK, 1997).

A primeira margarina criada por Hippolyte foi chamada de oleomargarina, sendo preparada com gordura bovina, da qual se extraía a porção líquida sob pressão. Juntamente com o óleo, eram adicionados leite e sal, formando uma mistura que então era refrigerada e batida até a solidificação da emulsão. O excesso de água era retirado e então a margarina era embalada e comercializada. Esta margarina apresentava consistência muito dura a baixas temperaturas, mas era nutricionalmente equivalente à manteiga e custava metade do preço (O'BRIEN, 2009).

Na década de 1920, as margarinas eram compostas por óleos vegetais hidrogenados juntamente com gordura animal. Em 1960, a Unilever desenvolveu a primeira margarina contendo cerca de 50-55% de ácidos graxos poli-insaturados com o objetivo de reduzir o colesterol sanguíneo e que poderia substituir o consumo de manteiga. No princípio, o produto era distribuído em farmácias e durante 3 anos podia ser comprada apenas com prescrição médica. Já nos anos 70, iniciou-se a produção de margarinas com baixo valor calórico ou light, contendo menor teor de gordura na emulsão quando comparadas às versões fabricadas anteriormente, com 80%. Para manter a estrutura da emulsão água em óleo utilizada na

manufatura do produto, foi necessário adicionar outros ingredientes à matriz, como pectina, alginato e amido modificado, além de também terem sido adicionados aromatizante, corante e sal para tornar a margarina semelhante à manteiga (UPRITCHARD et al., 2005).

O processo de fabricação de margarinas, cremes vegetais e outros tipos de emulsões alimentícias envolvem a formação de uma emulsão a partir da mistura de água em óleo (fase contínua). O processo de emulsificação, no qual se misturam dois líquidos imiscíveis, onde um é distribuído uniformemente no outro sem separação de fases, promove a formação de um produto gorduroso estável. Nessas emulsões, a estabilidade é alcançada graças ao uso de emulsificantes (como monoacilgliceróis e diacilgliceróis), os quais estabilizam a fase dispersa, além de assegurar as propriedades sensoriais adequadas (DUIJIN, 2000; ROUSSEAU, 2000; GHOSH & ROUSSEAU, 2011).

Sendo assim, o papel dos emulsificantes torna-se fundamental, já que diminuem a tensão superficial e possibilitam boa dispersão da água na fase lipídica. Os emulsificantes mais utilizados são os monoacilgliceróis e diacilgliceróis, que também auxiliam a estabilizar as emulsões (SOUZA et al., 2011).

A etapa de cristalização da gordura, realizada após a emulsificação, contribui para a formação de uma rede sólida de cristais. A margarina, por apresentar alto teor lipídico, deve apresentar proporção adequada entre as frações sólida e líquida para que o produto tenha textura e espalhabilidade desejadas (RACT et al., 2010).

Entretanto, não apenas a emulsificação e a velocidade de cristalização são importantes para o desenvolvimento de uma emulsão alimentícia potencialmente probiótica, mas também a manutenção da viabilidade da cepa probiótica durante a vida de prateleira do produto e sua passagem durante o trato gastrointestinal. Além disso, diversos estudos sugerem que alimentos com um teor elevado de lipídios podem ser considerados importantes veículos para a incorporação de micro-organismos probióticos (MADUREIRA et al., 2011; PITINO et al., 2012; SABIKHI et al., 2014). Essa peculiaridade torna produtos como manteigas, margarinas e derivados, potenciais alimentos probióticos, uma vez que a adição de ingredientes funcionais pode tornar estes alimentos mais atrativos ao mercado atual, que busca cada vez mais escolhas saudáveis para o dia a dia.

Com o aumento da busca por alimentos que propiciem efeitos benéficos à saúde dos consumidores, faz-se necessário o desenvolvimento de alimentos potencialmente probióticos

e/ou simbióticos com diferentes matrizes alimentares, de forma a abranger o mercado atual que tradicionalmente tem sido composto por iogurtes e bebidas fermentadas.

Dessa forma, o alimento potencialmente probiótico desenvolvido no presente trabalho é constituído por uma emulsão de água em óleo (A/O), assim como na manteiga, margarina e creme vegetal. No entanto, as bases gordurosas utilizadas foram constituídas por misturas de gordura do leite e oleína de palma variando entre 20 e 80% e representam 60% da fase lipídica do produto final desenvolvido. No entanto, devido às legislações brasileiras vigentes, para o produto ser considerado “manteiga” deveria conter cerca de 80% de gordura do leite (BRASIL, 1996). Para que fosse considerada margarina, a gordura láctea não deveria exceder 3% (BRASIL, 1997). Por fim, o creme vegetal deve ser constituído apenas por óleos de origem vegetal (BRASIL, 2005). Desta forma, o alimento potencialmente probiótico não se enquadrou em nenhuma das legislações atuais de padrão de identidade, sendo então denominado de “emulsão alimentícia”.

2. REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999.** Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/815ada0047458a7293e3d73fbc4c6735/RESO_LUCAO_18_1999.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 28 set. 2015.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002.** Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1c77370047457bcc8888dc3fbc4c6735/RDC_02_2002.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 28 set. 2015.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas.** Atualizado em julho, 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em 28 out. 2013.
- AINI, I.N.; MISKANDAR, M.S. Utilization of palm oil and palm products in shortenings and margarines. **European Journal Lipid of Science Technology**, v.109, n.4, p.422-432, 2007.
- AL-SHERAJI, S.H.; ISMAIL, A.; MANAP, M. Y.; MUSTAFA, S.; YUSOF, R.M.; HASSAN, F.A. Prebiotics as functional foods: a review. **Journal of functional foods**, v.5, n.4, p.1542-1553, 2013.

- APOLINÁRIO, A.C.; DAMASCENO, B.P.G.L.; BELTRÃO, N.E.M.; PESSOA, A.; CONVERTI, A.; SILVA, J.A. Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. **Carbohydrate Polymers**, v.101, p.368-378, 2014.
- ARAI, S. Studies on Functional foods in Japan – State of the art. **Bioscience biotechnology and biochemistry**, v.60, n.1, p.9-15, 1996.
- ARVANITTOYANNIS, I.S.; HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, M.V. Functional foods: a survey of health claims, pros and cons, and current legislation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, n.5, p.385-404, 2005.
- ASRAF, R.; SHAH, N. Immune System stimulation by probiotic microorganisms. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.54, n.7, p.938-956, 2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO (ABIA). **Falta regra da Anvisa para vender alimento funcional**. Disponível em: <<http://www.abia.org.br/anexos2012/42ecee10-dd4e-4dd3-af3b-79829b816a31.pdf>> Acesso em: 23 out. 2013.
- AURELI, P.; CAPURSO, L.; CASTELLAZZI, A.M.; CLERICI, M.; GIONANNINI, M.; MORELLI, L.; POLI, A.; PREGLIASCO, F.; SALVINI, F.; ZUCCOTTI, G.V. Probiotics and health: Na evidence-based review. **Pharmacological Research**, v.63, n.5, p.366-376, 2011.
- BÄCKHED, F.; LEY, R.E.; SONNENBURG, J.L.; PETERSON, D.A.; GORDON, J.I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science**, v.307, n.5717, p.11915-1920, 2005.
- BANGUELA, A.; HERNÁNDEZ, L. Fructans: from natural sources to transgenic plants. **Biotecnologia Aplicada**, v.23, p.202-210, 2006.
- BASYIGIT, G.; KULEASAN, H.; KARAHAN, A. Viability of human-derived probiotic lactobacilli in ice cream produced with sucrose and aspartame. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.33, n.9, p.796-800, 2006.
- BIGLIARDI, B.; GALATI, F. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.31, n.2, p.118-129, 2013.
- BOLDUC, M.P.; RAYMOND, Y.; FUSTIER, P.; CHAMPAGNE, C.P.; VUILLEMARD, J.C. Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized milk. **International Dairy Journal**, v.16, n.9, p.1038-1048, 2006.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO. **Portaria nº 146 de 07 de março de 1996**. “Regulamento técnico de identidade e qualidade de manteiga” Disponível em: <http://www.agais.com/normas/leite/manteiga.htm>. Acesso em: 24 jan. 2016.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO. **Portaria nº 372, de 04 de Setembro de 1997**. “Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Margarina”. Disponível em: <http://www.crmvgo.org.br/legislacao/leite/POR00000372.pdf>. Acesso em: 14 out. 2015.
- BRASIL. **Resolução RDC nº 270 de 22 de setembro de 2005**. Aprova o “Regulamento Técnico para Óleos vegetais, Gorduras vegetais e Creme vegetal”. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/82d8d2804a9b68849647d64600696f00/RDC_n_270.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 24 jan. 2016.

- BRASIL. Resolução RDC nº 24 de 15 de junho de 2010. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/34565380474597549fd4df3fbc4c6735/RDC24_10_Publicidade+de+alimentos.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 27 jan. 2015.
- 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.
- CLARKE, G.; CRYAN, J.F.; DINAN, T.G.; QUIGLEY, E.M. Review article: probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome – focus on lactic acid bacteria. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.35, n.4, p.403-413, 2012.
- CLEMENTE, J.C.; URSELL, L.K.; PARFREY, L.W.; KNIGHT, R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. **Cell**, v.148, n.6, p.1258-1270, 2012.
- CHALUVADI, S.; HOTCHKISS, A.T.; YAM, K.L. Gut Microbiota: impact of probiotics, prebiotics, synbiotics, pharmabiotics, and postbiotics on human health. In: WATSON, R. R.; PREEDY, V.R. **Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics – Bioactive Foods in Health Promotion**. 1ªed. London: Academic Press, 2016. cap.36, p.515-523.
- CHAVES, K.S.; GIGANTE, M.L. Prato cheese as suitable carrier for *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium* Bb-12. **International Dairy Journal**, v.52, p.10-18, 2016.
- CHOURAQUI, J.P.; EGROO, L.D.V.; FICHOT, M.C. Acidified milk formula supplemented with *Bifidobacterium lactis*: Impact on infant diarrhea in residential care settings. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.38, n.3, p.288-292, 2004.
- COLLADO, M.C.; SANZ, Y. Induction of acid resistance in *Bifidobacterium*: a mechanism for improving desirable traits of potentially probiotic strains. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, n.4, p.1147-1157, 2007.
- COLLINS, S.M.; SURETTE, M.; BERCIK, P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. **Nature Reviews**, v.10, p.735-742, 2012.
- CORRÊA, 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*. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, n.9, p.1560-1568, 2008.
- CHRISTIAN HANSEN. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12®). **Facts about Bifidobacterium animalis subsp. lactis (Bb-12®)**. Disponível em: <http://www.chr-hansen.com/probiotic-supplements-and-infant-formula/cards/product-cards/bifidobacterium-animalis-subsp-lactis-bb-12> Acesso em 29 de nov. 2015.
- CRUZ, A.G.; BURITI, F.C.A.; SOUZA, C.H.B.; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science and Technology**, v.20, n.8, p.344-354, 2009.
- DAS, A.; CHAKRABORTY, R. Interest of functional foods for low-income countries. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.17, n.6, p.582-588, 2014.
- DE FILIPPO, C.; CAVALIERI, D.; DI PAOLA, M.; RAMAZZOTTI, M.; POULLET, J.B.; MASSART, S.; COLLINI, S.; PIERACCINI, G.; LIONETTI, P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, v.107, n.33, p.14691-14696, 2010.

- DUIJIN, G.V. Technical aspects of *trans* reduction in margarines. **Oilseeds & fats Crops and Lipids**, v.7, n.1, p.95-98, 2000.
- EDEM, D.O. Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological, and toxicological aspects: A review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.57, n.3, p.319-341, 2002.
- FLACK, E. Margarines and Spreads. In: HASENHUETTL, G.L.; HARTEL, R.W. **Food Emulsifiers and their applications**, 1^oed., United States of America: Springer Science & Business Media, 1997. cap.10, p.255-280.
- FOLIGNÉ, B.; DANIEL, C.; POT, B. Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. **Current Opinion in Microbiology**, v.16, n.3, p.284-292, 2013.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group. In: _____. **Probiotic in Food. Health and Nutritional Properties**. Roma, 2006. (FAO Food and Nutritional Paper, 85). Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2015.
- FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Alimentos funcionais e suas perspectivas no Mercado brasileiro**, n.30, p.84-85, 2014. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/408.pdf>. Acesso em: 29 set. 2015.
- FREDRICK, E.; VAN DE WALLE, D.; WALSTRA, P.; ZIJTVELD, J.H.; FISCHER, S.; VAN DER MEEREN, P.; DEWETTINCK, K.; Isothermal crystallization behavior of milk fat in bulk and emulsified state. **International Dairy Journal**, v.21, n.9, p.685-695, 2011.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, n.5, p.365-378, 1989.
- GAGLIARDI, A.C.M.; MANCINI FILHO, J. SANTOS, R.D. Perfil nutricional de alimentos com alegação de zero de gorduras *trans*. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.55, n.1, p.50-53, 2009.
- GARRIGUES, C.; JOHANSEN, E.; PEDERSEN, M.B. Complete genome sequence of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, a widely consumed probiotic strain. **Journal of Bacteriology**, v.192, n.4, p.2467-2468, 2010.
- GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, v.360, n.9356, p.512-519, 2003.
- GERMAN, J.B.; DILLARD, C.J. Fractionated milk fat: Composition, structure and functional properties. **Food Technology**, Chicago, v.52, n.2, p.33-38, 1998.
- GHOSH, S.; ROUSSEAU, D. Fat crystals an water-in-oil emulsion stability. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.16, n.5, p.421-431, 2011.
- GIBON, V. Fractionation of lipids for use in food. In: GUNSTONE, F.D. **Modifying lipids for use in food**. 1^oed., Cambridge: CRC Press, 2006. cap.10, p.201-233.
- GIBON, V.; GREYT, W.D.; KELLENS, M. Palm oil refining. **European Journal of Lipids Science Technology**, v.109, n.4, p.315-335, 2007.
- GIBSON, G.R.; PROBERT, H.M.; LOO, J.V.; RASTALL, R.A.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v.17, n.2, p.259-275, 2004.

- GIOIELLI, L.A. Óleos e gorduras vegetais: composição e tecnologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.5, n.2, p. 211-232, 1996.
- GOH, S.H.; CHOO, Y.M.; ONG, S.H. Minor constituents of Palm oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.62, n.2, p.237-240, 1985.
- GUNSTONE, F.D.; HARWOOD, J.L. Occurrence and characterization of oils and fats. In: GUNSTONE, F.D.; HARWOOD, J.L.; DIJKSTRA, A.J. **The lipid handbook**. 3^{ed.}, United States of America: CRC Press, 2007. cap.2, p.25-58.
- HANSEN, S.B.; PADFIELD, R.; SYAYUTI, K.; EVERS, S.; ZAKARIAH, Z.; MASTURA, S. Trends in global palm oil sustainability research. **Journal of Cleaner Production**, v.100, p.140-149, 2015.
- HASLER, C.M. Functional foods: benefits, concerns and challenges – A position paper from the American council on Science and health. **The Journal of Nutrition**, v.132, n.12, p.3772-3781, 2002.
- 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, n.2, p.595-604, 2008.
- HERRERA, M.L.; GATTI, M.D.L.; HARTEL, R.W. A kinetic analysis of crystallization of a milk fat model system. **Food Research International**, v.32, n.4, p.289-298, 1999.
- HICKSON, M.; D'SOUZA, A.L.; MUTHU, N.; ROGERS, T.R.; WANT, S.; RAJKUMAR, C.; BULPITT, C.J. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhea associated with antibiotics: randomized double blind placebo controlled trial. **BMJ**, v.335, n.80, p.1-5, 2007.
- HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G.R.; MERENSTEIN, D.J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R.B.; FLINT, H.J.; SALMINEN, S.; CALDER, P.C.; SANDERS, M.E. Expert Consensus Document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.11, p.506-514, 2014.
- HILLBRICK, G.; AUGUSTIN, M.A. Milkfat characteristics and functionality: opportunities for improvement. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.57, n.1, p.45-51, 2002.
- HIMAWAN, C.; STAROV, V.M.; STAPLEY, A.G.F. Thermodynamic and kinetic aspects of fat crystallization. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.122, n.1-3, p.3-33, 2006.
- HISSANAGA, V.M.; PROENÇA, R.P.C.; BLOCK, J.M. Ácidos graxos *trans* em produtos alimentícios brasileiros: uma revisão sobre aspectos relacionados à saúde e à rotulagem nutricional. **Revista de Nutrição**, v.25, n.4, p. 517-530, 2012.
- HOPKINS, M. J.; SHARP, R.; MACFARLANE, G.T. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. **Gut**, v.48, n.2, p.198-205, 2001.
- JANSEEN, A.W.F.; KERSTEN, S. The role of the gut microbiota in metabolic health. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.29, n.10, p.3111-3123, 2015.
- KELLENS, M.; GIBON, V.; HENDRIX, M.; WIM DE, G. Palm oil fractionation. **European Journal of Lipid Science Technology**, v.109. n.4, p.336-349, 2007.

- KOENIG, J.E.; SPOR, A.; SCALFONE, N.; FRICKER, A.D.; STOMBAUGH, J.; KNIGHT, R.; ANGENENT, L.T.; LEY, R.E. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.108, n.1, p.4578-4585, 2011.
- KUMAR, A.; KUMAR, D. Development of antioxidant rich fruit supplemented probiotic yogurts using free and microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* culture. **Journal of Food Science Technology**, v.53, n.1, p.1-9, 2015.
- KUMAR, M.; NAGPAL, R.; HEMALATHA, R.; YADAV, H.; MAROTTA F. Probiotics and prebiotics for promoting health: through gut microbiota. In: WATSON, R. R.; PREEDY, V.R. **Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics – Bioactive Foods in Health Promotion**. 1ªed. London: Academic Press, 2016. cap.6, p.75-86.
- KUMAR, H.; SALMINEN, S.; VERHAGEN, H.; ROWLAND, I.; HEIMBACH, J.; BANARES, S.; YOUNG, T.; NOMOTO, K.; LALONDE, M. Novel probiotics and prebiotics: road to the market. **Current Opinion in Biotechnology**, v.32, p.99-103, 2015.
- KUNTZ, M.G.F.; FIATES, G.M.R.; TEIXEIRA, E. Characteristics of prebiotic food products containing inulin. **British Food Journal**, v.115, n.2, p.235-251, 2013.
- LARQUÉ, E.; ZAMORA, S.; GIL, A. Dietary *trans* fatty acids in early life: a review. **Early Human Development**, v.65, n.2, p.31-41, 2001.
- LEAHY, S.C.; HIGGINS, D.G.; FITZGERALD, G.F.; SINDEREN, D. Getting better with bifidobacterias. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, n.6, p.1303-1315, 2005.
- LEE, Y.K. Probiotic microorganisms. In: LEE, Y. K.; SALMIEN, S. **Handbook of probiotics and prebiotics**, 2ªed, New Jersey: Wiley, 2005. cap.1, p.3-8.
- LEY, R.E.; PETERSON, D.A.; GORDON, J.I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**, v.124, n.4, p.837-848, 2006.
- LERAYER, A.; ANTUNES, A.E.C.; OLIVEIRA, M.N. Microrganismos probióticos: definição, seleção e caracterização de culturas. In: LERAYER, A.; BARRETO, B.A.P.; WAITZBERG, D.L.; BARACAT, E.C.; GROMPONE, G.; VANNUCCHI, H.; ANTOINE, J.M.; OLIVEIRA, M.N.; MISZPUTEN, S.J. **In gut we trust**. 1ªed, São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos, 2013. cap.1, p.1-42.
- LIN, S.W. Palm Oil. In: GUNSTONE, F. **Vegetable Oils in Food Technology: Composition, properties and uses**. 2ªed, Chichester: Blackwell Publishing Ltd., 2011. cap.2, p.25-58.
- MADUREIRA, A.R.; AMORIM, M.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v.44, n.1, p.465-470, 2011.
- MDA, O.I.; DUMONT, M.J.; NGADI, M. Palm oil: Processing, characterization and utilization in the Food industry – A review. **Food Bioscience**, v.10, p.26-41, 2015.
- MANGONI, A.G.; ACEVEDO, N.; MALEKY, F.; CO, E.; PEYRONEL, F.; MAZZANTI, G.; QUINN, B.; PINK, D. Structure and functionality of edible fats. **Soft Matter**, v.8, p.1275-1300, 2012.
- MARANGONI, A.G.; ROUSSEAU, D. The influence of chemical interesterification on physicochemical properties of complex fat systems. 1. Melting and crystallization. **Journal of American Oil Chemistry Society**, Champaign, v.75, n.10, p.1265-1271, 1998.

- MARTÍN-DIANA, A.B.; JANER, C.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.13, n.10, p.827-833, 2003.
- MARTIROSYAN, D.M.; SINGH, J. A new definition of functional Food by FFC: what makes a new definition unique? **Functional Foods in Health and Disease**, v.5, n.6, p.209-223, 2015.
- MORTAZAVIAN, A.M.; EHSANI, M;R.; MOUSAVI, S.M.; SOHRABVANDI, S.; REINHEIMER, J.A. Combined effects of the temperature-related variables on the viability of probiotic microorganisms in yogurt. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.61, n.3, p.248-252, 2006.
- MOZAFFARIAN, D.; KATAN, M.B.; ASCHERIO, A.; STAMPFER, M.J.; WILLET, W.C. *Trans* fatty acids and cardiovascular disease. **The New England Journal of Medicine**, v.354, n.15, p.1601-1613, 2006.
- NABAVI, S.; RAFRAF, M.; SOMI, M.H.; HOMAYOUNI-RAD, A.; ASGHARI-JAFARABADI, M. Effects of probiotic yogurt consumption on metabolic factors in individuals with nonalcoholic fatty liver disease, **Journal of Dairy Science**, v.97, n.12, p.7386-7393, 2014.
- NAGPAL, R.; KUMAR, A.; KUMAR, M.; BEHARE, P.V.; JAIN, S.; YADAV, H. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. **Federation of European Microbiological Societies**, v.334, n.1, p.1-15, 2012.
- NINESS, K.R. Inulin and oligofructose: What are they? **The Journal of Nutrition**, v.129, n.7, p.1402-1406, 1999.
- NUNES, G.F.M.; PAULA, A.V.; CASTRO, H.F.; SANTOS, J. C. Modificação bioquímica da gordura do leite. **Química Nova**, v.33, n.2, p.431-437, 2010.
- NUNES, G.F.M.; PAULA, A.V.; CASTRO, H.F.; SANTOS, J.C. Compositional and textural properties of milkfat-soybean oil blends following enzymatic interesterification. **Food Chemistry**, v.125, n.1, p.133-138, 2011.
- O'BRIEN, R.D. **Margarine**. In:_____. *Fats and Oils: Formulating and Processing for Application*. 3^{ed}. London: CRC Press, 2009. cap.10, p.447-472.
- ONG, A.S.H.; GOH, S.H. Palm oil: a healthful cost-effective dietary component. **Food and Nutrition Bulletin**, v.23, n.1, p.11-22, 2002.
- 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.
- OLIVEIRA, R.A.; PARK, K.J.; CHIORATO, M.; PARK, K.K.B.; NOGUEIRA, R.I. Otimização de extração de inulina de raízes de chicória. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.6, n.2, p.131-140, 2004.
- OHAMA, H.; IKEDA, H.; MORIYAMA, H. Health foods and foods with health claims in Japan. **Toxicology**, v.221, n.1, p.95-111, 2006.
- O'HARA, A.M.; SHANAHAN, F. The gut flora as a forgotten organ. **European Molecular Biology Organization**, v.7, n.7, p.688-693, 2006.
- O'KEEFE, S.F. Nomenclature and classification of lipids. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B. **Food Lipids: Chemistry, nutrition, and biotechnology**. 3^{ed}, United States of America: CRC Press – Taylor & Francis Group, 2008. cap.1, p.3-38.

- O'MAHONY, L.; MCCARTHY, J.; KELLY, P.; HURLEY, G.; LUO, F.; CHEN, K.; O'SULLIVAN, G. C.; KIELY, B.; COLLINS, J. K.; SHANAHAN, F.; QUIGLEY, E.M.M. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in Irritable Bowel Syndrome: Symptom Responses and Relationship to Cytokine Profiles. **Gastroenterology**, v.128, n.3, p.541-551, 2005.
- OUWEHAND, A.C.; KURVINEN, T.; RISSANEN, P. Use of a probiotic *Bifidobacterium* in a dry food matrix, an *in vivo* study. **International Journal of Food Microbiology**, v.95, n.1, p.103-106, 2004.
- OZKAN, T.; YILMAZ-ERSAN, L.; AKPINAR-BAYIZIT, A.; SAHIN, O.I.; AYDINOL, P. Viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 in rice pudding. **Mljekarstvo**, v.60, n.2, p.135-144, 2010.
- PADOVESE, R.; MANCINI FILHO, J. Ácidos graxos *trans*. In: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. 1ªed., São Paulo: Manole, p.509-521, 2002. cap.36, p. 507-522.
- PESHEV, D.; VAN DEN ENDE, W. Fructans: Prebiotics and immunomodulators. **Journal of Functional Foods**, v.8, p.348-357, 2014.
- PITINO, I.; RANDAZZO, C.L.; CROSS, K.L.; PARKER, M. L.; BISIGNANO, C.; WICKHAM, M. S. J.; MANDALARI, G.; CAGGIA, C. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains inoculated in cheese matrix during simulated human digestion. **Food Microbiology**, v.31, n.1, p.57-63, 2012.
- POKUSAEVA, K.; FITZGERALD, G.F.; SINDEREN, D.V. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. **Genes & Nutrition**, v.6, n.3, p.285-306, 2011.
- PREIDIS, G.A.; HILL, C.; GUERRANT, R.; RAMAKRISHNA, B.S.; TANNOCK, G.W.; VERSALOVIC, J. Probiotics, enteric and diarrheal diseases, and global health. **Gastroenterology**, v.140, n.1, p.8-14, 2011.
- PULIGUNDLA, P.; VARIYAR, P.S.; KO, S.; OBULAM, V.S.R. Emerging trends in modification of dietary oils and fats and health implications – a review. **Sains Malaysiana**, v.41, n.7, p.871-877, 2012.
- RACT, J.N.R.; COTTING, L.N.; POLTRONIERI, T.P.; SILVA, R.C.; GIOIELLI, L.A. Comportamento de cristalização de lipídios estruturados obtidos a partir de gordura do leite e óleo de girassol. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.30, n.1, p.258-267, 2010.
- RAO, R.K.; POLK, D.B.; SETH, A.; YAN, F. Probiotics the good neighbor: guarding the gut mucosal barrier. **American Journal of Infectious Diseases**, v.5, n.3, p.195-199, 2009.
- RASTALL, R.A. Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. **The Journal of Nutrition**, v.134, n.8, p.20225-20265, 2004.
- RASTALL, R.A.; VATSALA, M. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, n.5, p.490-496, 2002.
- REMIG, V.; FADA, R.D.; FRANKLIN, B.; SIMEON MARGOLIS, M.D.; KOSTAS, G.; NECE, T.; STREET, J.C. *Trans* fats in America: A review of their use, consumption, health implications and regulation. **Journal of the American Dietetic Association**, v.110, n.4, p.585-592, 2010.
- ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v.34, n.2, p.105-110, 2002a.

- ROBERFROID, M. Global view on functional foods: European perspectives. **British Journal of Nutrition**, v.88, n.2, p.133-138, 2002b.
- ROBERFROID, M. Introducing inulin-type fructans. **British Journal of Nutrition**, v.93, n.1, p.13-25, 2005.
- ROBERFROID, M. Prebiotics: The concept revisited. **The Journal of Nutrition**, v.137, n.3, p.8305-8375, 2007.
- ROBERFROID, M.B. General Introduction: Prebiotics in Nutrition. GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. **Handbook of prebiotics**. 1° ed., United States of America: CRC Press, 2008. cap.1, p.1-11.
- RODRIGUES, J.N.; GIOIELLI, L.A.; ANTON, C. Propriedades físicas de lipídios estruturados obtidos de misturas de gordura do leite e óleo de milho. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.23, n.2, p.226-233, 2003.
- RØNHOLT, S.; MORTENSEN, K.; KNUDSEN, J.C. The effective factors on the structure of butter and other milk fat-based Products. **Reviews in Food Science and Food Safety**, v.12, n.5, p.468-482, 2013.
- ROUSSEAU, D. Fat crystals and emulsion stability – a review. **Food Research International**, v.33, n.1, p.3-14, 2000.
- ROUSSEAU, D.; FORESTIERE, K.; HILL, A.R.; MARANGONI, A.G. Restructuring butterfat through blending and chemical interesterification. 1. Melting behavior and triacylglycerol modifications. **Journal of American Oil Chemistry Society**, Champaign, v.73, n.8, p.963-972, 1996.
- SAAD, S.M.I.; KOMATSU, T.R.; GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; BURUTI, F.C.A. Probióticos e Prebióticos em Alimentos: Aspectos tecnológicos, legislação e segurança no uso. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. **Probióticos e Prebióticos em alimentos: Fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1ª ed. São Paulo: Varela, 2011a. cap.1, p.23-50.
- SAAD, S.M.I.; BEDANI, R.; MAMIZUKA, E.M. Benefícios à saúde dos probióticos e prebióticos. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. **Probióticos e Prebióticos em alimentos: Fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1ª ed. São Paulo: Varela, 2011b. cap.2, p.51-84.
- SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v.84, n.3, p.197-215, 2000.
- SABIKHI, L.; SATHISH KUMAR, M.H.; MATHUR, B.N. *Bifidobacterium bifidum* in probiotic Edam cheese : influence on cheese ripening. **Journal Food os Science Technology**, v.51, n.12, p.3902-3909, 2014.
- SAMBANTHAMURTHI, R.; SUNDRAM, K.; TAN, Y.A. Chemistry and biochemistry of palm oil. **Progress in Lipid Research**, v.39, n.6, p.507-558, 2000.
- SANDERS, M.E.; GUARNER, F.; GUERRANT, R.; HOLT, P.R.; QUIGLEY, E.M.M.; BALFOUR SARTOR, R.; SHERMAN, P.M.; MAYER, E.A. An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. **Gut**, v.62, n.2, p.787-796, 2013.
- SANT'ANA, L.S. Biodisponibilidade de lipídios. In: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 3°ed, São Paulo: Manole, 2009. cap.8, p.153-174.

- SANTOS, R.D.; GAGLIARDI, A.C.M.; XAVIER, H.T.; MAGNONI, C.D.; CASSANI, R.; LOTTENBERG, A.M. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v.100, n.1 Supl.3, p.1- 40, 2013.
- SCHREZENMEIR, J.; VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p.361-364, 2001.
- SEARS, C.L.; PARDOLL, D.M. Perspective: Alpha-bugs, their microbial partners, and the link to colon cancer. **The Journal of Infectious Diseases**, v.103, n.3, p.306-311, 2011.
- SEKIROV, I.; SHANNON, L.; RUSSELL, L.; ANTUNES, C.M.; FINLAY, B.B. Gut Microbiota in Health and Disease. **American Physiological Society**, v.90, n.3, p.859-904, 2010.
- SHAH, N.P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v.17, n.11, p.1262-1277, 2007.
- SHARMA, M.; DEVI, M. Probiotics: A comprehensive approach toward health foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.54, n.4, p.537-552, 2014.
- SHIMIZU, F.M.; VISENTAINER, J.V.; SOUZA, N.E. Proximate composition and quantification of fatty acids in major Brazilian brands of margarine and vegetable creams marketed in Brazil. **Alimentos e Nutrição**, v.22, n.2, p.181-189, 2011.
- SHIMIZU, M.; HACHIMURA, S. Gut as target for functional food. **Trends in Food Science & Technology**, v.22, n.12, p.646-5-650, 2011.
- SHIMIZU, T. Health claims on functional foods: the Japanese regulations and an international comparison. **Nutrition Research Reviews**, v.16, p.241-252, 2003.
- SILVA, A.S.; HONJOYA, E.R.; INAY, O.M.; COSTA, M.R.; SOUZA, C.H.B.; SANTANA, E. H.W.; SUGUIMOTO, H.H.; ARAGON-ALEGRO, L.C. Viabilidade de *Lactobacillus casei* em flan de chocolate e sua sobrevivência em condições gastrintestinais simuladas. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.2, p.3163-3170, 2012.
- SKEAFF, C.M.; MANN, J. Lipids. In: MANN, J.; TRUSWELL, S. **Essentials of human nutrition**. 4^{ed}, Great Britain: Oxford University Press, 2012.cap.4, p.49-69.
- SMOLYANSKY, J. Probiotics: A Historical Perspective. In: WATSON, R.R.; PREEDY, V.R. **Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics**. 1^{ed}, Oxford: Academic Press, 2010. cap.3, p.43-46.
- SOMMER, F.; BÄCKHED, F. The gut microbiota – masters of host development and physiology. **Nature Reviews – Microbiology**, v.11, p.227-238, 2013.
- SOOD, A.; MIDHA, V.; MAKHARIA, G.K.; AHUJA, V.; SINGAL, D.; GOSWAMI, P.; TANDON, R.K.; The probiotic preparation, VSL#3 induces remission in patients with mild-to-moderately active ulcerative colitis. **Clinical Gastroenterology and hepatology**, v.7, n.11, p.1202-1209, 2009.
- SOUZA, C.H.B. **Desenvolvimento de margarina probiótica e simbiótica: viabilidade do probiótico no produto e resistência *in vitro***. 2010. 208 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Área de Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.
- SOUZA, C.H.B.; GIOIELLI, L.A; SAAD, S.M.I. Desafios na tecnologia de fabricação de emulsões alimentícias funcionais. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F.

- Probióticos e Prebióticos em alimentos: Fundamentos e aplicações tecnológicas.** 1ª ed. São Paulo: Varela, 2011.cap.20, p.473-504.
- STRINGHETA, P.C.; OLIVEIRA, T.T.; GOMES, R.C.; AMARAL, M.P.H.; CARVALHO, A.F.; VILELA, M.A.P. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.43, n.2, p.181-194, 2007.
- SYBESMA, W.; KORT, R.; LEE, Y.K. Locally sourced probiotics, the next opportunity for developing countries? **Trends in Biotechnology**, v.33, n.4, p.197-200, 2015.
- TALWALKAR, A; KAILASAPATHY, K. Metabolic and biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.8, p.2537–2546, 2003.
- TOJO, R.; SUÁREZ, A.; CLEMENT, M.G.; REYES-GAVILÁN, C.G.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M.; RUAS-MADIEDO, P. Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis. **World Journal of Gastroenterology**, v.20, n.41, p.15163-15176, 2014.
- TURNBAUGH, P.J.; RIDAURA, V.K.; FAITH, J.J.; REY, F.E.; KNIGHT, R.; GORDON, J.I. The effect of diet on the human gut microbiome: A metagenomics analysis in humanized gnotobiotic mice. **Science Translational Medicine**, v.1, n.6, p.6-14, 2009.
- UPRITCHARD, J.E.; ZEELLENBERG, M.J.; HUIZINGA, H.; VERSCHUREN, P.M.; TRAUTWEIN, E.A. Modern fat technology: what is the potential for heart health? **Proceedings of the Nutrition Society**, v.64, n.3, p.379-386, 2005.
- VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v.18, n.7, p.714-728, 2008.
- VEMURI, P.K.; VELAMPATI, R.H.P.; TIPPARAJU, S.L. Probiotics: a novel approach in improvin the values of the human life. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.6, n.1, p.41-43, 2014.
- VENTURA, M.; TURRONI, F.; MOTHERWAY, M.O.; MACSHARRY, J.; SINDEREN, D.V. Host-microbe interactions that facilitate gut colonization by commensal bifidobacteria. **Trends in Microbiology**, v.20, n.10, p.467-476, 2012.
- VENTURA, M.; TURRONI, F.; Van SINDEREN, D. Bifidobacteria of the Human Gut: Our Special Friends. In: TUOHY, K.; DEL RIO, D. **Diet Microbe Interactions in the Gut: Effects on Human Health and Disease**. 1ºed: Academic Press, Oxford, 268p., 2015. cap.4, p.41-52.
- WANG, K.Y.; LI, S.N.; LIU, C.S.; PERNG, D.S.; SU, Y.C.; WU, D.C.; JAN, C.M.; LAI, C.H.; WANG, T.N.; WANG, W.M. Effects of ingesting *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.80, n.3, p.737-741, 2004.
- WANG, Y. Prebiotics: Present and future in food science and technology. **Food Research International**, v.42, n.1, p.8-12, 2009.
- WELLS, A.L.; SAUNIER, D.M.A.; GIBSON, G.R. Gastrointestinal microflora and interactions with gut mucosa. In: GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. **Handbook of Prebiotics**. 1ª ed. United States of America: CRC Press, 2008. cap.2, p.14-37.
- WIKING, L.; DE GRAEF, V.; RASMUSSEN, M.; DEWETTINCK, K. Relations between crystallization mechanisms and microstructure of milk fat. **International Dairy Journal**, v.19, n.8, p.424-430, 2009.

XU, J.; GORDON, J.I. Honor thy symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, n.18, p.10452-10459, 2003.

YATSUNENKO, T.; REY, F.E.; MANARY, M.J.; TREHAN, I.; DOMINGUEZ-BELLO, M.G.; CONTRERAS, M.; MAGRIS, M.; HIDALGO, G.; BALDASSANO, R.N.; ANOKHUN, A.P.; HEATH, A.C.; WARNER, B.; REEDER, J.; KUCZYNSKI, J.; CAPORASO, J.G.; LOZUPONE, C.A.; LAUBER, C.; CLEMENTE, J.C.; KNIGHTS, D.; KNIGHT, R.; GORDON, J.I. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, v.486, n.7402, p.222-227, 2012.

CAPÍTULO 2

Desenvolvimento e aceitação sensorial de emulsão espalhável potencialmente simbiótica contendo gordura do leite.

RESUMO: A adição de micro-organismos probióticos em matrizes alimentares ricas em lipídios pode conferir proteção às células microbianas durante o armazenamento. Este trabalho teve por objetivo desenvolver uma emulsão alimentícia do tipo A/O potencialmente probiótica, cuja fase lipídica era composta por uma mistura de gordura do leite e oleína de palma e a fase aquosa adicionada do micro-organismo probiótico *B. animalis* Bb-12, de inulina e caseinomacropéptido. Assim, misturas de gordura do leite e oleína de palma (GL:OP) em diferentes proporções (m/m) foram caracterizadas quanto a composição em ácidos graxos, consistência e comportamentos de cristalização e fusão. A consistência da base gordurosa de uma margarina comercial foi igualmente analisada para a obtenção de valores de referência atuais, de modo a possibilitar a seleção de duas proporções GL:OP adequadas para compor a base gordurosa da emulsão potencialmente probiótica. As misturas GL:OP nas proporções 40:60 e 20:80 apresentaram consistência maior do que a base gordurosa da margarina comercial em todas as temperaturas analisadas, porém adequadas ao preparo de uma emulsão espalhável, com curvas em formato semelhante, demonstrando fusão lenta e gradual. Essas duas misturas foram utilizadas para a produção de duas emulsões alimentícias probióticas cujas curvas de consistência também foram comparadas à de uma margarina comercial. As duas formulações apresentaram comportamento semelhante entre si, ambas com curvas de consistência apresentando inclinação mais acentuada do que a da margarina comercial, principalmente entre 5 e 10 °C, mas com valores de consistência próximos quando determinados à temperatura de 10 °C. A consistência das misturas GL:OP apresentou correlação significativa com o teor de ácidos graxos saturados das misturas, provenientes em sua maioria da gordura do leite. Ambas as formulações tiveram boa aceitação sensorial nos dias 7 e 21 de armazenamento a 5 °C, sendo o sabor e a textura os principais atributos positivos citados pelos avaliadores.

Palavras-chave: gordura do leite; oleína de palma; emulsão alimentícia; probióticos.

Development and sensorial acceptance of an spreadable emulsion potentially symbiotic with milkfat.

ABSTRACT: Incorporation probiotics microorganisms into a food matrix with high lipid content may offer added protection to microbial cells during storage, and promising since there is an industry high demand to produce new functional foods. This work aimed to develop a W/O table spread, with blends composed of milk fat and palm olein, added to functional ingredients. Thus, milkfat and palm olein blends (GL:OP) in different proportions (m/m) were evaluated regarding consistency, fatty acid composition, and crystallization and melting behavior. The consistency of a commercial margarine blend was also evaluated to get current reference values, in order to allow selecting two appropriate GL:OP blends to compose the fat blend of the table spread. The mixtures GL:OP 40:60 and GL:OP 20:80 had higher consistency than commercial margarine blend at all temperatures analyzed, but they were suitable to make a W/O emulsion, with similar format curves and slow and progressive of the mixtures blends. Thus, these two mixtures were used for the production of the two probiotic table spreads, with the probiotic strain *B. animalis* Bb-12, besides inulin and caseinomacropptide. The consistency curve of these two table spreads were compared with a commercial margarine. The two table spreads showed similar behavior, with consistency curve showing more inclination than commercial margarine, mainly at 5 and 10 °C, but with similar values at 10 °C. The mixtures GL:OP consistency showed a positive correlation with saturated fatty acids of the mixtures from the milkfat. Both formulations had good sensorial acceptance at days 7 and 21 of storage at 5 °C. The taste and texture were considered as the main positive attributes to consumers.

Key-words: milkfat; olein palm; tablespread; probiotics.

1. INTRODUÇÃO

A busca da população por um estilo de vida mais saudável e sua melhor conscientização, torna constante a necessidade da inovação de produtos alimentícios, visto que a demanda é alta por alimentos que possuam características sensoriais adequadas e aliadas à saúde e bem estar. Em 2013, o mercado de alimentos e bebidas movimentou cerca de US\$ 750 bilhões, no qual uma parcela significativa de US\$ 264 bilhões correspondeu aos produtos funcionais ou fortificados (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2014).

A adição de gordura do leite em alimentos proporciona benefícios sensoriais, como sabor e aroma. No entanto, a gordura do leite presente em produtos como a manteiga possui baixa espalhabilidade à temperatura de refrigeração devido ao seu alto teor de ácidos graxos saturados. Além disso, o consumo de ácidos graxos saturados é relacionado a doenças cardiovasculares (GERMAN & DILLARD, 1998; WRIGHT et al., 2001; HILLBRICK & AUGUSTIN, 2002; NUNES et al., 2010).

A oleína de palma é a fração líquida extraída do óleo de palma por meio do processo de fracionamento. Desta forma, é obtido um óleo com maior teor de ácidos graxos insaturados, rico principalmente em ácido oleico (AINI & MISKANDAR, 2007), sendo este ácido graxo benéfico à saúde humana (WAHRBURG, 2004). A oleína de palma, por possuir baixo ponto de fusão, cerca de 24 °C, pode ser incorporada a uma grande variedade de produtos alimentícios juntamente com outras gorduras de maior consistência (ONG & GOH, 2002; AINI & MISKANDAR, 2007; MDA et al., 2015).

O processo de fabricação de margarinas e outras emulsões alimentícias do tipo água em óleo (A/O) envolvem a formação de uma emulsão a partir da adição de água (fase dispersa) em óleo (fase contínua) (SOUZA et al., 2011). A emulsificação de dois líquidos imiscíveis fornece a produção de um produto gorduroso estável e sem separação de fases. Tal estabilidade é alcançada com o uso de emulsificantes, tais como monoacilgliceróis e diacilgliceróis, entre outros (GHOSH & ROUSSEAU, 2011). A etapa de cristalização da gordura é fundamental para a formação de uma rede sólida de cristais com proporções adequadas entre as frações sólida e líquida para que o produto tenha textura e espalhabilidade (RACT et al., 2010).

Probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE

ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001). Sua principal função é realizar a reposição da microbiota intestinal normal que possa ter sido desbalanceada devido ao uso de medicamentos, situações de estresse em seu hospedeiro ou, ainda, devido à dieta (RAO et al., 2009). Ademais, alguns autores tem relacionado uma boa viabilidade de micro-organismos probióticos em alimentos com maiores teores de lipídios (POSSEMIERS et al., 2010; PITINO et al., 2012; YONEJIMA et al., 2015).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma emulsão alimentícia espalhável potencialmente simbiótica pela adição do micro-organismo probiótico *B. animalis* Bb-12, inulina e caseinomacropéptido a uma formulação que alie o sabor agradável da manteiga à consistência macia característica de margarinas, utilizando misturas de gordura do leite e oleína de palma.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Para o preparo das bases gordurosas que compuseram as emulsões probióticas, foram utilizadas gordura do leite anidra (Fonterra, Goiânia, Brasil) e oleína de palma com baixo ponto de fusão (PN3) (Agropalma, Tailândia, Brasil). Em adição, realizou-se a caracterização físico-química de uma margarina comercial adquirida em um supermercado local, contendo 80% de lipídios. Todos os reagentes e solventes utilizados nas análises foram de grau analítico. Para o preparo das emulsões alimentícias, utilizaram-se na fase oleosa: as misturas de gordura do leite e oleína de palma, emulsificantes (monoacilglicerol destilado - Dimodan® HS-F; ésteres de poliglicerol de ácido ricinoleico - Grindsted® PGPR Super e monoacilglicerol destilado Dimodan® US/C – grau alimentício, Danisco, Cotia, Brasil), vitamina A (Fortitech South América Indústria e Comércio Ltda., Campinas, Brasil), corante β -Caroteno 30% FS (grau alimentício, DSM Produtos Nutricionais Brasil, São Paulo, Brasil) e aroma de manteiga (grau alimentício, Duas Rodas, Jaraguá do Sul, Brasil), e para a fase aquosa utilizou-se: água, leite em pó desnatado (marca comercial Molico, Nestlé), sal (marca comercial Cisne, Cabo Frio, Brasil), inulina (Beneo GR, Orafiti, Oreye, Bélgica), caseinomacropéptido (Lacprodan CGMP –10, Arla Foods Ingredients) e a cultura probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Christian Hansen, Valinhos, Brasil) do tipo DVS (*direct vat set*).

2.2. Caracterização de margarina comercial e sua base lipídica

Uma margarina cremosa de fabricação brasileira comercializada em larga escala, foi caracterizada quanto à sua consistência para servir como padrão de referência para as emulsões alimentícias probióticas a serem desenvolvidas. Adicionalmente, sua base gordurosa foi separada e caracterizada quanto à sua composição em ácidos graxos, índice de iodo, índice de saponificação, acidez, consistência e comportamento de cristalização e fusão, conforme metodologia detalhada no item 2.4. Para a separação da fase lipídica, a margarina foi fundida entre 60 e 70 °C, sua fase aquosa foi separada por decantação em funil de separação e a fase lipídica foi filtrada em papel filtro para retirada de sólidos e resíduos da fase aquosa, sendo armazenada em frascos de vidro com tampa sob refrigeração. A consistência dessa base lipídica foi utilizada como referência para a seleção das misturas a serem utilizadas no preparo das emulsões probióticas.

2.3. Delineamento experimental das bases gordurosas e preparo das misturas

Visando a definição da composição da mistura destinada a compor a base gordurosa da emulsão alimentícia, foi elaborado um planejamento de seis experimentos, conforme a Tabela 1, sendo a gordura do leite anidra representada por X_1 e a oleína de palma representada por X_2 , sendo que $X_1 + X_2 = 100\%$. Duas amostras representaram os componentes isoladamente e quatro foram formadas por misturas binárias. As misturas foram preparadas após fusão completa de seus componentes originais, sob agitação vigorosa utilizando agitador mecânico em hélice, com controle de temperatura a 60-70 °C durante 5 min, e posteriormente armazenadas em frascos de vidro com tampa sob refrigeração a 5 °C. Entre as misturas preparadas, foram selecionadas duas bases gordurosas para a produção das emulsões alimentícias. A seleção foi feita buscando a maior semelhança das curvas de consistência das misturas com a curva da base gordurosa da margarina comercial.

Tabela 1. Planejamento experimental empregado no desenvolvimento das bases gordurosas.

Mistura	Componentes (%)	
	X ₁	X ₂
GL:OP 100:0	100	0
GL:OP 80:20	80	20
GL:OP 60:40	60	40
GL:OP 40:60	40	60
GL:OP 20:80	20	80
GL:OP 100:0	0	100

X₁ = gordura do leite anidra; X₂ = oleína de palma

2.4. Análises das características físico químicas das bases gordurosas

2.4.1. Acidez

A acidez das amostras foi determinada por titulação, utilizando-se solução de NaOH 0,1 N, segundo método oficial da AOCS Ca 5a-40 (2012).

2.4.2. Composição em ácidos graxos e índices de iodo e saponificação

Para a análise da composição em ácidos graxos das misturas, foi realizado o preparo de ésteres metílicos de ácidos graxos, segundo método oficial ISO 15884:2002 (2013), visando à análise por cromatografia em fase gasosa. A análise foi realizada em cromatógrafo a gás Varian GC, modelo 430 GC, equipado com injetor automático, detector de ionização de chama, utilizando o programa “Varian’s Galaxie Chromatography”. Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida SP-2560 (Supelco, USA), com 100 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno e contendo 0,2 µm de polietilenoglicol dentro da coluna. As condições foram: injeção *split*, razão de 50:1; gás de arraste: hélio, à vazão de 1,5 mL/min; gás *make-up*: hélio, a 30 mL/min; temperatura do injetor: 250 °C; temperatura do detector: 280 °C. O forno foi mantido inicialmente a 75 °C por 3 min, então aquecido a 3 °C/min até 240 °C e por fim mantido em uma isoterma por 50 min. A composição qualitativa e quantitativa foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos com os dos respectivos padrões de ácidos graxos e por normalização de área, sendo expressa como porcentagem em massa (RODRIGUES et al., 2007). Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

A partir da composição em ácidos graxos, foram calculados os índices de iodo (IO) e de saponificação (IS), segundo os métodos Cd 1c-85 (AOCS, 2009) e Cd 3a-94 (AOCS, 2009), respectivamente.

2.4.3. Consistência

As análises de consistência das bases gordurosas, da margarina comercial e das emulsões alimentícias potencialmente probióticas foram realizadas utilizando-se analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro System, Haslemere, Inglaterra). Os dados foram coletados através do programa “Texture Expert for Windows” – versão 1.20 (Stable Micro Systems).

As margarinas comerciais foram mantidas em suas embalagens originais (500 g) à temperatura de 5 °C em câmara B.O.D. (Fanem, mod. 347 CD, São Paulo, Brasil) e então transferidas a outra câmara e mantidas à temperatura de análise durante 24 horas. As temperaturas de análise variaram de 5 a 35 °C, com incrementos de 5 °C.

As bases gordurosas foram acondicionadas em béqueres de vidro de 50 mL. Antes de cada análise, as amostras foram fundidas entre 60 e 70 °C, agitadas e então mantidas em refrigeração (refrigerador Electrolux, modelo DFN42, São Paulo, Brasil) por 24 horas. Após este período, as misturas foram armazenadas em câmara B.O.D. (Fanem, mod. 347 CD, São Paulo, Brasil) à temperatura de análise, de 5 a 35 °C, com incrementos de 5 °C, durante 24 horas. As emulsões alimentícias foram analisadas nos potes de polipropileno em porções de 80 g, da forma como foram acondicionadas logo após sua produção. As condições de armazenamento e as temperaturas de análise foram as mesmas utilizadas para a margarina comercial. Todas as amostras foram analisadas utilizando cone de acrílico com ponta não truncada e ângulo de 40°. Os testes foram realizados em triplicata, obedecendo as seguintes condições: distância = 10 mm; velocidade = 2 mm/s; tempo = 5 s (RODRIGUES et al., 2003). O parâmetro de textura instrumental que se analisou foi a consistência (*yield value*). Para o cálculo da consistência foi utilizada a seguinte equação, proposta por HAIGHTON (1959):

$$C = K.W/p^{1,6}$$

Onde:

C = consistência (*yield value*) (gf/cm²), K = fator que depende do ângulo do cone (para ângulo de 40°, K é igual a 5.800), W = força em compressão (gf), para tempo de 5 s, p = profundidade de penetração (mm/10).

2.4.4. Comportamento de cristalização e fusão

As análises do comportamento de cristalização e fusão das amostras foram realizadas por calorimetria exploratória diferencial (DSC) em Analisador Térmico Perkin-Elmer, modelo DSC 4000 (Perkin-Elmer, Waltham, EUA). As amostras foram fundidas e aproximadamente

5 mg foram colocados em células de alumínio (recipiente BO14-3017 e tampa BO14-3003, Perkin-Elmer), que foram, em seguida, hermeticamente fechadas. Utilizou-se um segundo recipiente de alumínio vazio como referência.

Foi utilizada programação de temperatura segundo método Cj 1-94 da AOCS (AOCS, 2009). Para gerar as curvas de cristalização, as amostras foram mantidas a 80 °C por 10 minutos para a completa destruição dos núcleos de cristais de gordura. Em seguida, sucedeu-se o resfriamento de 80 °C até -60 °C à velocidade de 10 °C/min e manteve-se a amostra à temperatura de -60 °C por 30 minutos. Para obter as curvas de fusão, as amostras foram aquecidas até 80 °C à velocidade de 5 °C/min e então, a temperatura foi mantida por 5 min. O tratamento de dados foi realizado pelo programa Pyris (Perkin-Elmer) e as curvas foram analisadas quanto ao início (*onset*) e final (*end*) dos eventos de cristalização e fusão, temperatura dos principais picos e entalpia. As amostras foram analisadas em triplicata.

Adicionalmente, a partir das curvas obtidas pelas análises do comportamento de fusão das amostras, o ponto de fusão foi interpretado como o ponto final de um evento de fusão, sendo numericamente determinado como o *end* do último pico de fusão (NASSU & GONÇALVES, 1999).

2.5. Preparo do inóculo contendo a cultura probiótica

A adição de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 à fase aquosa das emulsões alimentícias foi realizada após uma etapa de pré-incubação da cultura. Para isso, 4 gramas de leite em pó desnatado foram reconstituídos em 40 mL de água, conforme instrução do fabricante. Após a sua esterilização em autoclave, foram adicionadas 15 g da cultura probiótica liofilizada. O leite inoculado foi, então, incubado a 37 °C por 2 horas. Tal procedimento foi realizado com a finalidade de promover a ativação e certa multiplicação do micro-organismo probiótico antes da sua adição aos demais ingredientes, para que o produto apresentasse uma concentração inicial de micro-organismo probiótico de aproximadamente 9,00 log UFC/g.

2.6. Preparo das emulsões alimentícias potencialmente probióticas

O preparo das emulsões alimentícias foi realizado segundo formulação apresentada na Tabela 2 de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 1. As emulsões alimentícias com 60% de lipídios foram produzidas em lotes de 3 kg e preparadas no laboratório didático da

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). Para o preparo da fase aquosa, a água foi aquecida até 40 °C para a dissolução completa da inulina e caseinomacropéptido sob agitação manual com um bastão. Em seguida, a cultura probiótica previamente ativada, conforme descrito no item 2.5, foi adicionada à fase aquosa. A fase oleosa foi preparada com as bases gordurosas compostas pelas misturas GL:OP selecionadas e posterior adição dos demais ingredientes (emulsificantes, vitamina A corante e aromatizante). Para o processo de emulsificação, a fase aquosa foi lentamente adicionada à fase oleosa sob agitação constante em batedeira planetária (Kea33 – Stand Mixer, KitchenAid, São Paulo, Brasil) durante 3 minutos à temperatura controlada, de aproximadamente 25 °C. Posteriormente, a emulsão foi transferida para uma sorveteira (Symsen, modelo BSK-16, Brusque, Brasil) com resfriamento por líquido refrigerante à temperatura de aproximadamente -10 °C para a cristalização parcial. A emulsão alimentícia foi retirada da sorveteira enquanto apresentava aspecto de um líquido viscoso, e 25g do produto foram acondicionados em potes de polipropileno branco (68 mm de diâmetro, 32 mm de altura, 55 mL de volume total, Tries Aditivos Plásticos, São Paulo Brasil), selados com selo aluminizado (alumínio + polietileno - Okra, Sorocaba, Brasil) em seladora Delgo n° 1968 (Delgo Metalúrgica, Cotia, Brasil) e armazenados sob refrigeração em cabine refrigerada (Metalfrio, mod. VB43R, São Paulo, Brasil) a 5 ± 1 °C.

Tabela 2. Formulação das emulsões alimentícias

Ingredientes (%)	Formulação
<i>Fase oleosa</i>	
Base gordurosa*	60,00
Emulsificantes	3,40
Corante	0,001
Aromatizante	0,05
Vitamina A	0,88
<u>Total fase oleosa</u>	64,33
<i>Fase aquosa</i>	
Água	31,00
Sal	0,76
Ácido láctico	0,01
Leite em pó	0,40
Cultura probiótica	0,50
Inulina	2,00
Caseinomacropéptido	1,00
Total fase aquosa	35,67
<u>Total (fase oleosa + fase aquosa)</u>	100,00

*Base gordurosa composta pela mistura GL:OP 40:60 ou GL:OP 20:80, sendo GL = gordura do leite e OP = oleína palma.



Figura 1. Fluxograma de elaboração de emulsão alimentícia potencialmente probiótica.

2.7. Aceitação sensorial

A aceitação sensorial foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os testes de aceitação sensorial das formulações foram realizados utilizando a escala hedônica de 9 pontos (1 = desgostei muitíssimo; 9 = gostei muitíssimo) (DUTCOVSKY, 1996). A análise sensorial das emulsões alimentícias probióticas foi realizada em dois períodos distintos de armazenamento dos produtos, 7 e 21 dias, segundo o delineamento em blocos casualizados com provadores não treinados, compreendendo indivíduos de ambos os sexos, entre alunos, docentes e funcionários da Universidade de São Paulo, em cada etapa da análise. Amostras codificadas aleatoriamente com 3 algarismos foram servidas aos provadores em porções de 25 g, utilizando-se pão de forma sem casca como base. Os critérios de exclusão adotados incluíram: possuir histórico de manifestação de alergia, intolerância a alimentos ou doença crônica (como diabetes, hipertensão ou outras), estar fazendo tratamento médico, estar gripado, resfriado ou indisposto ou ter entrado em contato há menos de 1 hora com materiais, alimentos ou cosméticos de cheiro forte. A avaliação sensorial do presente estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (Parecer n. 959264-2). (ANEXO 2)

2.8. Análise estatística

Utilizou-se um modelo de regressão múltipla quadrática para os dados obtidos da consistência das bases gordurosas para a geração de seus níveis de significância, coeficientes de determinação e análise de variância, representada pela equação:

$$y = \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{12}x_1x_2$$

Onde: y = resposta; β = coeficientes gerados por regressão múltipla; x = proporção do componente.

Para a análise sensorial, a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro Wilks ao nível de 1%. A comparação entre as emulsões alimentícias foi realizada pelo teste t de Student para amostras independentes. O nível de confiança utilizado nas análises comparativas foi de 95%. O nível de confiança utilizado nas análises comparativas foi de 95%. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o pacote *Statistica* versão 12 para Windows (Statsoft Inc.).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Composição em ácidos graxos

A Tabela 3 apresenta a composição dos principais ácidos graxos identificados da base gordurosa da margarina comercial (BGMC) e das misturas GL:OP, bem como análises de acidez, e índice de iodo e saponificação.

Tabela 3. Composição em ácidos graxos base gordurosa da margarina comercial (BGMC) e das misturas GL:OP e seus respectivos acidez, índices de iodo e saponificação.

Ácido graxo	Média ± DP (%)						
	BGMC	GL:OP 100:0	GL:OP 80:20	GL:OP 60:40	GL:OP 40:60	GL:OP 20:80	GL:OP 0:100
Ácido butírico (C4:0)	ND	2,85±0,02	2,21±0,01	1,63±0,04	1,07±0,01	0,50±0,00	ND
Ácido caproico (C6:0)	ND	1,94±0,01	1,50±0,01	1,11±0,03	0,74±0,00	0,35±0,00	ND
Ácido caprílico (C8:0)	0,35±0,00	1,24±0,01	0,99±0,01	0,76±0,02	0,54±0,00	0,31±0,00	0,10±0,00
Ácido cáprico (C10:0)	0,33±0,00	2,79±0,01	2,21±0,01	1,66±0,04	1,13±0,01	0,58±0,00	0,10±0,00
Ácido láurico (C12:0)	4,59±0,01	3,50±0,01	3,03±0,01	2,61±0,07	2,21±0,01	1,70±0,00	1,30±0,00
Ácido mirístico (C14:0)	1,61±0,00	12,43±0,01	9,89±0,05	7,67±0,19	5,41±0,02	3,09±0,01	1,10±0,00
Ácido palmítico (C16:0)	12,74±0,03	34,43±0,04	33,55±0,24	33,44±0,78	33,23±0,11	30,91±0,02	30,17±0,01
Ácido palmitoleico (C16:1)	ND	1,78±0,00	1,46±0,10	1,21±0,03	0,86±0,00	0,45±0,00	0,17±0,00
Ácido esteárico (C18:0)	9,72±0,02	11,90±0,02	10,05±0,10	8,49±0,19	6,89±0,03	5,02±0,00	3,61±0,00
Ácido oleico (C18:1)	20,88±0,02	23,29±0,00	29,52±0,42	34,45±1,55	38,44±0,23	46,00±0,02	50,42±0,01
Ácido linoleico (C18:2)	45,30±0,04	2,52±0,00	4,10±0,07	6,64±0,15	9,20±0,04	10,83±0,00	12,80±0,00
Ácido linolênico (C18:3)	4,47±0,03	1,33±0,00	1,49±0,01	0,32±0,01	0,30±0,00	0,26±0,00	0,24±0,00
Total saturados	29,34±0,01	71,08±0,00	63,43±0,05	57,38±0,17	51,20±0,02	42,46±0,01	36,37±0,00
Total monoinsaturados	20,88±0,02	25,07±0,00	30,98±0,26	35,66±0,79	39,30±0,12	46,44±0,01	50,59±0,00
Total poli-insaturados	49,77±0,04	3,85±0,00	5,59±0,54	6,96±0,08	9,50±0,02	11,10±0,13	13,04±0,00
Acidez (% oleico)	0,17±0,00	0,26±0,00	0,22±0,00	0,20±0,00	0,13±0,00	0,11±0,00	0,12±0,00
II (g iodo/100g)	108,1	29,6	39,0	43,4	50,8	59,4	66,3
IS (mg KOH/g)	196,59	213,60	209,65	206,32	203,14	199,57	196,72

A composição em ácidos graxos da gordura do leite e da oleína de palma está de acordo com a literatura consultada (RODRIGUES et al., 2007; AINI & MISKANDAR, 2007; GUNSTONE & HARWOOD, 2007). Para a gordura do leite, a soma total dos ácidos graxos saturados (71,1%), monoinsaturados (25,1%) e poli-insaturados (3,8%) foram semelhantes aos valores reportados por HILIBRICK & AUGUSTIN (2002), de 70%, 25% e 5%, respectivamente. Segundo os autores, esta gordura possui uma mistura complexa de ácidos graxos, o que pode conferir palatabilidade e propriedades físico-químicas desejáveis aos alimentos que a contêm. O consumo excessivo de ácidos graxos saturados, contudo, é citado como fator de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (SIRI-TARINO et al., 2015).

A soma total dos ácidos graxos da BGMC correspondeu a 29,34%, 20,88% e 49,77% para os ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados, respectivamente. SHIMIZU et al. (2011) observaram altos teores de ácidos graxos poli-insaturados em margarinas e cremes vegetais brasileiros, e assim como no presente estudo, os ácidos graxos

encontrados em maiores proporções foram o linoleico, seguido de oleico e linolênico. No entanto, o aumento do consumo de ácidos graxos poli-insaturados, como o ácido linoleico (ômega 6), tem sido associado ao aumento de processos inflamatórios e desenvolvimento de aterosclerose (HARRIS et al., 2009).

Neste sentido, todas as misturas GL:OP apresentaram maior teor de ácido oleico quando comparado à BGMC. Quando comparadas à gordura do leite pura (GL:OP 100:0), as mesmas misturas anteriormente citadas apresentaram redução de gordura saturada de 71,1% para 51,2% e 42,5%, respectivamente. Também foi observado aumento de 15,2% e 22,7% no conteúdo de ácido oleico nessas misturas, mostrando que a adição de oleína de palma resultou em contribuições positivas do ponto de vista nutricional. Este ácido graxo é encontrado em grande quantidade em óleos vegetais, como os óleos de canola e oliva. Seu consumo está associado à redução de LDL-c e em indivíduos saudáveis, não ocorre alterações no perfil de triglicérides plasmático (WILLIAMS et al., 1999; WAHRBURG, 2004). Ademais, dietas ricas em ácidos graxos monoinsaturados têm sido associadas à redução dos fatores de risco do desenvolvimento da síndrome metabólica, pois o seu consumo leva à melhora do perfil lipídico sanguíneo, pressão arterial e modula a sensibilidade insulínica e controle glicêmico (GILLINGHAM et al., 2011).

A acidez de todas as misturas binárias se mostrou adequada, entre 0,1 e 0,2%, indicando boa qualidade e bom estado de conservação das misturas. A acidez obtida para a gordura do leite e oleína de palma estão de acordo com os valores reportados pela literatura, sendo entre 0,10 e 0,44% para a gordura do leite (HILLBRICK & AUGUSTIN, 2002), e $\leq 0,5\%$ para a oleína de palma, de acordo o seu fabricante.

O índice de iodo (II) da gordura do leite encontrou-se dentro do valor reportado pela legislação, entre 28 e 38 g de I/100 g (BRASIL, 1996). Para a oleína de palma, são reportados valores entre 51 e 61 g de I/100 g (O'BRIEN, 2009). A BGMC obteve índice de iodo de 108,1 g de I₂/100 g. No caso das misturas GL:OP, o II foi proporcional aos teores de gordura do leite e oleína de palma e sempre maior do que o II da BGMC, confirmando seu menor grau de insaturação em comparação com a referência comercial. Assim como o II, os índices de saponificação (IS) de todas as misturas GL:OP foram proporcionais à adição de oleína de palma. Para a gordura do leite, estipula-se IS entre 218 e 325 mg KOH/g (BRASIL, 1996), e para a oleína de palma, seu IS varia 194 e 202 mg KOH/g (CODEX ALIMENTARIUS, 2001).

3.2. Comportamentos de cristalização e fusão

A Figura 2 apresenta as curvas de cristalização da gordura do leite e da oleína de palma puras (GL:OP 100:0 e GL:OP 0:100, respectivamente).

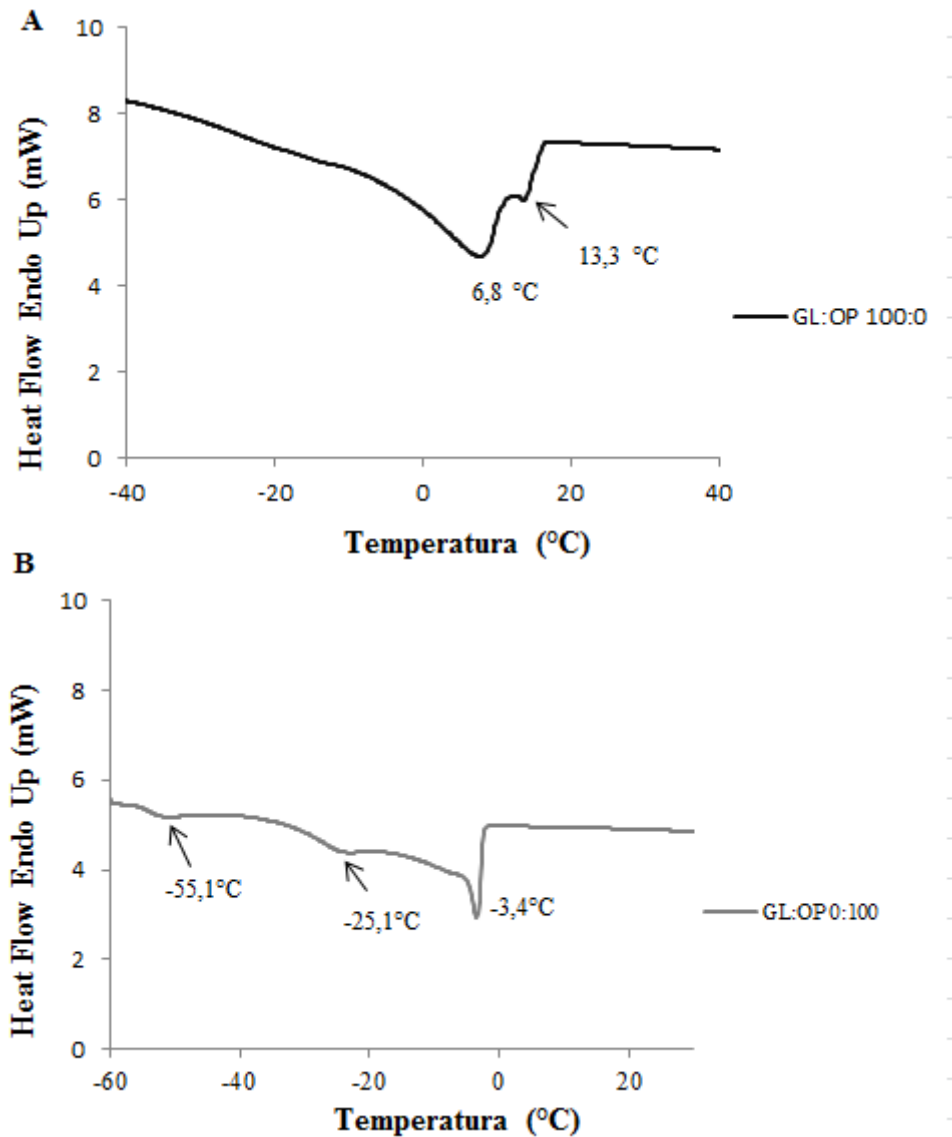


Figura 2. Curvas de cristalização da gordura do leite anidra (A) e da oleína de palma (B) puras obtidas à velocidade de resfriamento de 10 °C/min.

A mistura GL:OP 100:0 apresentou apenas 2 picos de cristalização. Semelhantermente, outros autores (GROTHENHUIS et al., 1999; LOPEZ et al., 2005; TOMASZEWSKA-GRAS, 2013) também observaram dois picos durante o processo de cristalização da gordura do leite. Estes picos indicam a presença de triacilgliceróis com diferentes estruturas, no qual o pico mais estreito, com temperaturas entre 14,3 °C (*Onset*) e 12,3 °C (*End*), e média de 13,3 °C

representa moléculas de triacilglicerois de médio e alto ponto de fusão. Estes TAGs tendem a se separar e cristalizar primeiro (LOPEZ et al., 2006). O pico mais amplo, com temperaturas entre 10,6 (*Onset*) e -5,5 °C (*End*), e média de 6,8 °C é composto por um grupo de triacilglicerois mistos, com diversos tipos de saturações e pesos moleculares (LOPEZ et al., 2005). Desta forma, os diferentes grupos de TAGs da gordura do leite podem cristalizar separadamente, comportando-se como soluções sólidas independentes (METIN & HARTEL, 2012). No entanto, em decorrência de sua diversidade em triacilglicerois, não apenas o grau de saturação influencia no processo de cristalização, mas também a posição que os ácidos graxos ocupam na molécula do triacilglicerol (HERRERA et al., 1999; RØNHOLT et al., 2013).

No presente estudo, a oleína de palma (GL:OP 0:100) apresentou 1 pico principal estreito de cristalização a -3,4 °C. Outros dois picos pequenos com temperaturas de -25,1 °C e -55,1 °C também foram observados na curva de cristalização. Da mesma forma que a gordura do leite, os triacilglicerois presentes na oleína de palma com maiores pontos de fusão cristalizaram primeiro, seguidos pela cristalização de TAGs compostos principalmente por ácidos graxos insaturados. Sendo assim, a cristalização da oleína ocorreu a baixas temperaturas devido à alta presença de ácidos graxos insaturados nas moléculas de TAGs, tornando o processo de empacotamento e cristalização dificultado devido à angulação da molécula ocasionada pela dupla ligação (HIMAWAN et al., 2006).

A adição de oleína de palma à gordura do leite contribuiu para um retardamento do início da cristalização das misturas binárias, conforme apresentado na Figura 3. Esta alteração das propriedades físicas observadas na mistura GL:OP 20:80 foi devido ao efeito da diluição ou à incompatibilidade entre as moléculas insaturadas da oleína de palma, que apresentam angulação curva, com as moléculas saturadas da gordura do leite, as quais são lineares. Dessa forma, a adição de oleína de palma contribuiu positivamente para a alteração das propriedades de cristalização da gordura do leite, mesmo sem o uso de processos que pudessem alterar sua composição química e levar à diminuição de suas qualidades sensoriais (HILLBRICK & AUGUSTIN, 2002).

A curva de cristalização da BGMC apresentou um pico formado a 14 °C. Os emulsificantes utilizados durante a produção de emulsões alimentícias não afetam apenas o tamanho do glóbulo de água ou gordura na fase contínua destes alimentos, mas também interfere no processo de cristalização, tornando-a mais homogênea (MIAO & MAO, 2015).

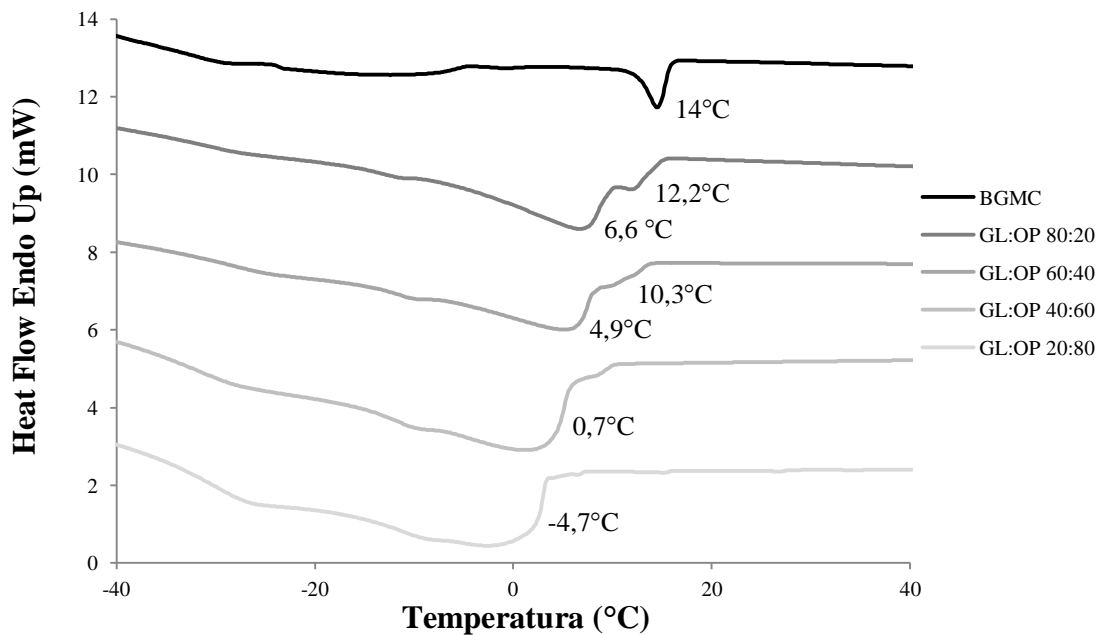


Figura 3. Curvas de cristalização da base gordurosa da margarina comercial (BGMC) e das misturas GL:OP em diferentes proporções obtidas à velocidade de resfriamento de 10 °C/min.

A gordura do leite apresentou 3 picos de fusão (Figura 4), com média de 2,8, 12,8 e 30,5 °C. Desta forma, a gordura do leite apresentou curva de fusão semelhante à curva apresentada por GROTHUIS et al. (1999). Segundo os autores, seu comportamento durante o aquecimento é muito mais complexo do que durante o resfriamento, uma vez que a composição em ácidos graxos da gordura do leite é variada. SMIDDY e colaboradores (2012) também observaram comportamento de fusão semelhante para a gordura do leite, com picos de 5, 13 e 32 °C.

A presença de 3 picos durante a curva de fusão da gordura do leite é devida as frações com diferentes pontos de fusão da gordura do leite. Triacilgliceróis com alto ponto de fusão são compostos principalmente por ácidos graxos saturados de cadeia longa, enquanto os TAG de médio ponto de fusão são compostos por dois ácidos graxos de cadeia longa e um ácido graxo insaturado ou de cadeia curta e por fim, os TAGs de menor ponto de fusão possuem um ácido graxo saturado de cadeia longa e dois ácidos graxos insaturados ou de cadeia curta (MARANGONI & LENCKI, 1998). A oleína analisada no presente estudo apresentou dois principais picos de fusão, sendo eles de -1,8 °C e 1,4 °C. Já, ZHANG et al. (2013) observaram 5 picos principais na curva de fusão da oleína. Isto porque, a oleína pode ser obtida em diferentes frações, levando a comportamentos físicos diferentes.

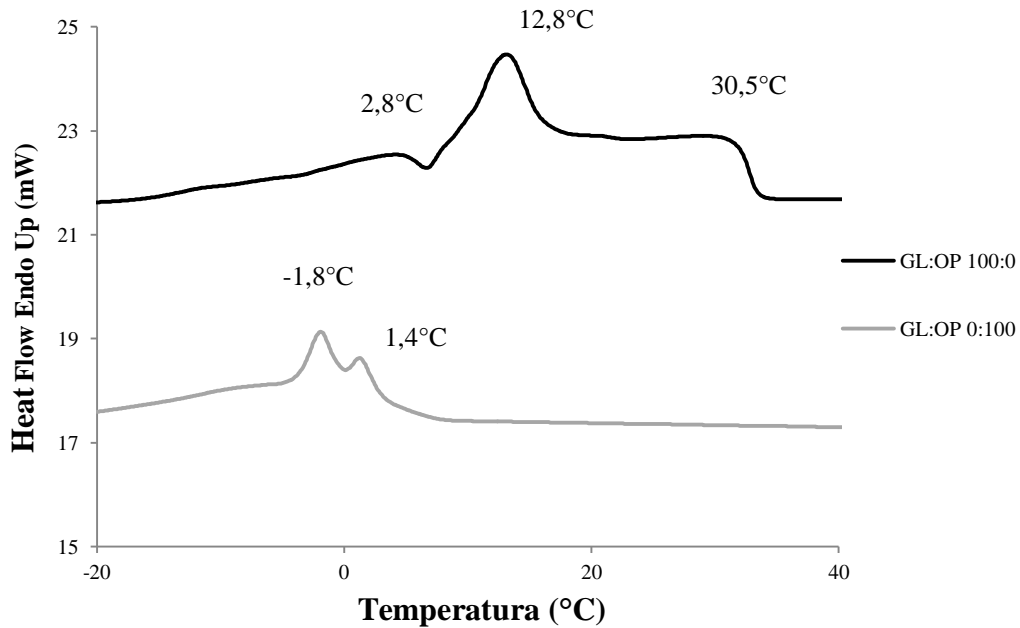


Figura 4. Curvas de fusão da gordura do leite anidra e da oleína de palma obtidas à velocidade de aquecimento de 5 °C/min.

As misturas GL:OP tiveram seus picos alterados conforme a proporção de gordura do leite e oleína de palma na mistura (Figura), devido à interação de ambos os componentes. A redução de triacilglicerois com alto ponto de fusão em misturas contendo oleína de palma pode melhorar a espalhabilidade da manteiga, margarina e similares. Isto porque, assim como o observado nas curvas de cristalização, a presença da oleína de palma antecipou a fusão da gordura do leite, novamente devido à incompatibilidade das misturas binárias. Neste sentido, tais resultados são reflexos do efeito eutético das misturas GL:OP. Em relação à curva de fusão apresentada pela BGMC, foram formados picos nas temperaturas -37,1 °C e -28,6 °C.

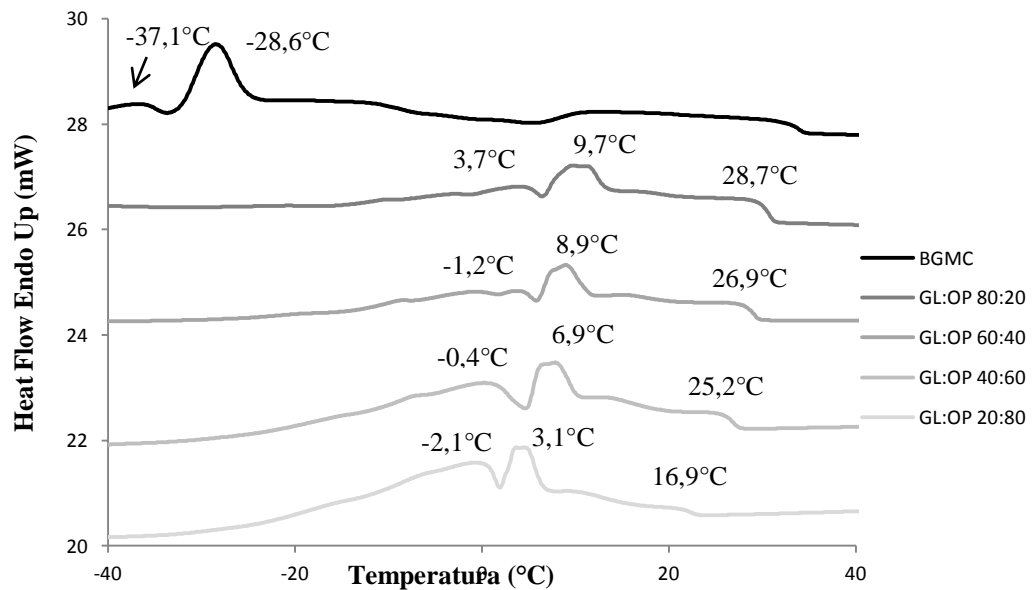


Figura 5. Curvas de fusão da base gordurosa da margarina comercial (BGMC) e das misturas em diferentes proporções obtidas à velocidade de aquecimento de 5 °C/min.

O ponto de fusão das misturas reduziu e foi proporcional ao teor de gordura do leite e oleína de palma (Tabela 4). A adição de óleos vegetais à gordura do leite proporciona uma redução do ponto de fusão e redução de consistência sem alterar muito suas características sensoriais (WRIGHT et al., 2001). Isto acontece devido à fração de alto ponto de fusão, constituída principalmente pelos ácidos palmítico e esteárico (MARANGONI & LENCKI, 1998) ser solubilizada na fase líquida do óleo presente nas bases gordurosas. Para a BGMC o ponto de fusão foi de 34,4 °C.

Tabela 4. Ponto de fusão da base gordurosa da margarina comercial (BGMC) e das misturas.

Misturas	Ponto de fusão (°C)
BGMC	34,4 ± 0,0
GL:OP 100:0	33,2 ± 0,3
GL:OP 80:20	31,2 ± 0,0
GL:OP 60:40	29,5 ± 0,2
GL:OP 40:60	27,4 ± 0,0
GL:OP 20:80	22,0 ± 0,6
GL:OP 0:100	2,5 ± 0,1

3.3. Consistência

As gorduras podem ser classificadas quanto à sua espalhabilidade em função de seu *yield value*. De acordo com HAIGHTON (1959), para gorduras, margarinas e *shortenings* serem considerados espalháveis, seu *yield value* deverá ser entre 100 e 1000 gf/cm². A Figura 6 apresenta as curvas de consistência da base gordurosa da margarina comercial (BGMC) e das misturas de gordura do leite e oleína de palma (GL:OP).

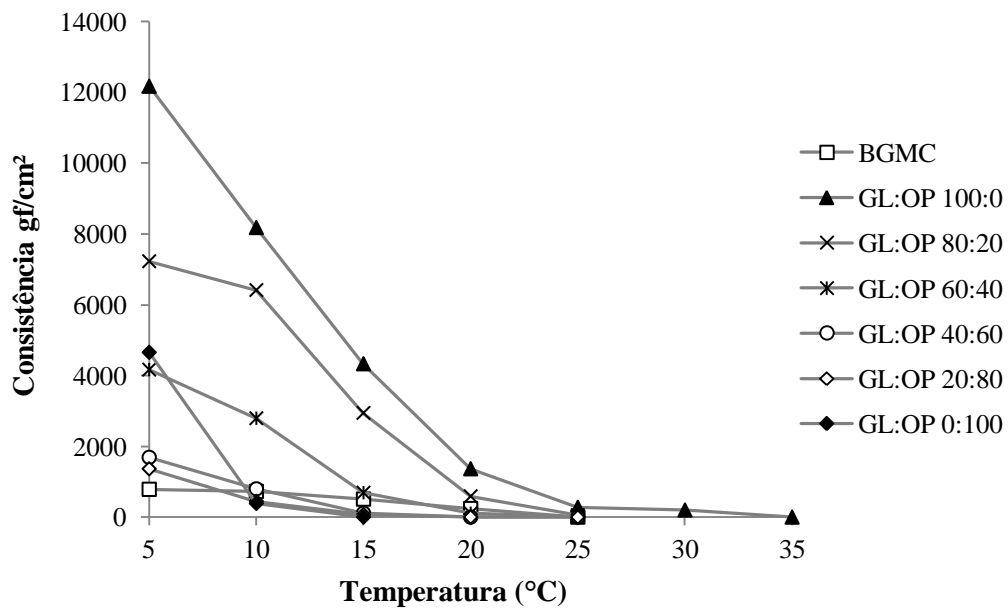


Figura 6. Consistência da base gordurosa da margarina comercial (BGMC) e das misturas GL:OP em diferentes proporções em função da temperatura.

A consistência da gordura do leite pura (GL:OP 100:0) variou entre 12.172,3 gf/cm² a 5 °C e 200,1 gf/cm² a 30 °C, passando a se apresentar como um líquido viscoso a 35 °C. Assim, esta amostra demonstrou espalhabilidade apenas no intervalo de temperaturas entre 20 e 30 °C, o que significa que não é um produto espalhável à temperatura de refrigeração, mas apresenta boa plasticidade em temperaturas próximas à ambiente, característica encontrada em manteigas.

A oleína de palma (GL:OP 0:100) apresentou consistência apenas às temperaturas de 5 e 10 °C, de 4.653,8 e 385,9 gf/cm², respectivamente, pois contém cerca de 50% de ácidos graxos monoinsaturados, que apresentam consistência semi-sólida a temperaturas mais baixas (GILLINGHAM et al., 2011). A redução da consistência em função do aumento de temperatura, comportamento comum a todas as amostras analisadas, pode ser explicada pela

fusão gradual dos cristais de gordura formados durante a cristalização, o que resulta em uma diluição da rede cristalina responsável por sua plasticidade (DEMAN, 1983).

Da mesma forma, a adição de oleína de palma à gordura do leite fez com que esta deixasse de apresentar plasticidade a partir de 25 °C, pois nenhuma das misturas GL:OP apresentou consistência nesta temperatura. RODRIGUES et al. (2007) também observaram resultados de consistência semelhantes ao presente estudo ao avaliarem misturas de gordura do leite, óleo de girassol e ésteres de fitosteróis, obtendo valores de consistência entre 12,7 kgf/cm² a 5 °C e de 0,2 kgf/cm² a 25 °C. Entretanto, no presente trabalho, o valor de 200 gf/cm² foi obtido apenas à temperatura de 30 °C.

As misturas GL:OP 40:60 e GL:OP 20:80 apresentaram valores médios de consistência de 1688,5 e 1365,2 gf/cm², respectivamente em temperatura de refrigeração a 5 °C, o que permitiu uma queda de 86 e 89% na consistência. A 10 °C, ambas as misturas apresentaram consistência plástica, segundo HAIGHTON (1959). Entre 20 °C e 30°C, as misturas GL:OP apresentaram consistência semi pastosa, e a 35 °C, a consistência foi 0. Contudo, é desejável que a fusão de uma mistura de óleos e/ou gorduras seja abaixo da temperatura corpórea de 36-37 °C. Assim como observado por RACT et al. (2010), a mistura de gordura do leite com óleos vegetais pode melhorar a espalhabilidade e as propriedades nutricionais de bases gordurosas constituídas por óleos vegetais, levando a características sensoriais desejáveis.

Os valores de consistência da BGMC foram menores quando comparados aos de todas as misturas GL:OP em todas as faixas de temperatura analisadas. Produtos comerciais costumam apresentar uma formulação mais elaborada do que a simples mistura de ingredientes, fazendo associações de diferentes métodos de modificação de lipídios. No entanto, para a produção de emulsões alimentícias A/O probióticas adicionadas de *Bifidobacterium animalis* Bb-12, um valor de consistência mais alto pode ser desejável, pois pode auxiliar na viabilidade do micro-organismo, uma vez que os cristais formados durante a cristalização da mistura de óleos e/ou gorduras irão conferir uma estabilidade física à matriz alimentar, dando proteção física ao micro-organismo (PEDROZO et al., 2012).

A regressão múltipla é uma metodologia estatística de previsão de valores de uma ou mais variáveis de resposta através de um conjunto de variáveis independentes (WALTERS et al., 1991). Ao aplicar o modelo linear de regressão múltipla para avaliar a influência da gordura do leite e da oleína de palma, bem como da interação entre estas, sobre a consistência das misturas GL:OP, foi observado que esta propriedade se mostrou estatisticamente

dependente dos teores de gordura do leite e de oleína de palma nas misturas a $p < 0,05$, o que pode ser inferido pelos valores positivos dos coeficientes β_1 e β_2 (Tabela **Erro! Fonte de referência não encontrada.5**). Os valores mais baixos de β_2 comparados aos de β_1 revelam que a oleína de palma foi a que menos influenciou. Com relação à interação entre os componentes das misturas, todos os coeficientes de regressão múltipla para a interação β_{12} se mostraram negativos. Estes resultados significam que todas as misturas apresentaram consistência menor que a esperada, mostrando que houve interação eutética entre a gordura do leite e a oleína de palma. Segundo TIMMS (1984), em misturas contendo óleo de palma ou suas frações, o comportamento eutético é esperado. A influência dos componentes das misturas e de sua interação sobre a consistência diminui com o aumento de temperatura, pois todos os coeficientes (β_1 , β_2 e β_{12}) tendem a se aproximar de zero, uma vez que com o aumento de temperatura, a propriedade de consistência tende a diminuir.

Tabela 5. Coeficientes de regressão múltipla dos valores de consistência das misturas em função da temperatura e seus respectivos coeficientes de determinação R^2

Temperatura (°C)	Coeficientes			
	β_1	β_2	β_{12}	R^2
5,0	12432,9	4196,3	-23268,10	0,970
10,0	8660,82	250,16	-9645,87	0,970
15,0	4444,15	85,46	-6943,75	0,976
20,0	1310,90	67,98	-2594,61	0,967
25,0	248,491	23,81	-599,05	0,895

Ao ser analisada a influência do conteúdo de ácidos graxos saturados sobre a consistência das misturas, observou-se que quanto maior o teor de saturados, maior foi a consistência obtida (Figura 7). Desta forma, novamente a gordura do leite é apontada como o principal responsável pela consistência devido à sobreposição das moléculas de ácidos graxos saturados (PULIGUNDLA et al., 2012) que tornam a consistência de uma base gordurosa mais rígida.

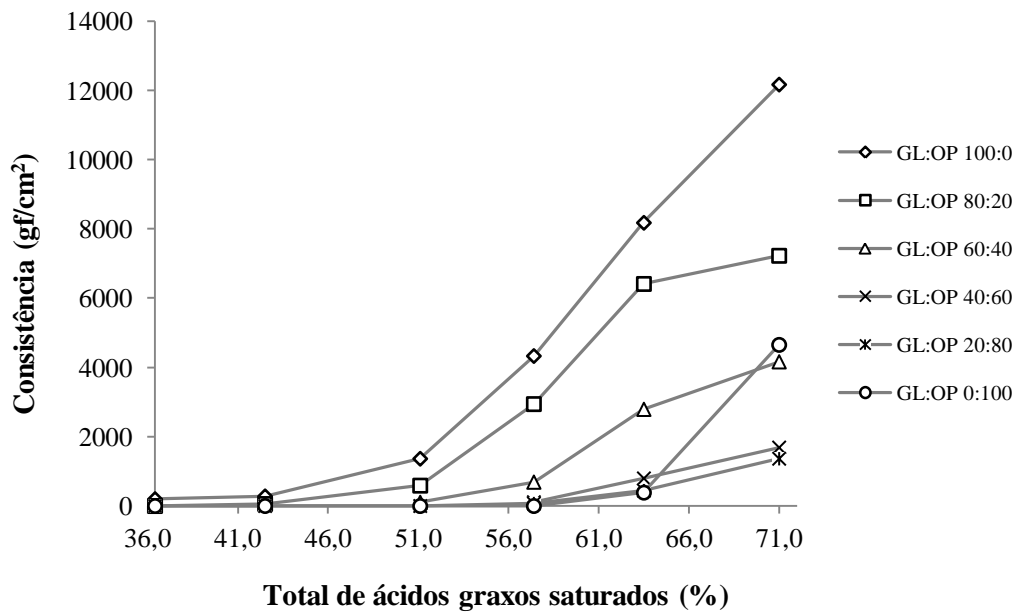


Figura 7. Consistência das misturas em diferentes proporções em função do total de ácidos graxos saturados.

Os resultados de composição em ácidos graxos, comportamento de cristalização e fusão e de consistência das misturas GL:OP mostraram que as misturas GL:OP 40:60 e GL:OP 20:80 apresentaram maiores teores de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados, de 48,8 e 57,5%, respectivamente, o que as levou a demonstrar consistência e comportamento de cristalização e fusão adequados para aplicação em emulsões alimentícias quando comparadas às demais misturas. Visto que a aceitabilidade de margarinas e similares está fortemente relacionada à sua textura, espalhabilidade e sabor, estas misturas foram selecionadas para serem utilizadas no desenvolvimento de uma emulsão alimentícia potencialmente probiótica. A partir deste ponto, a emulsão alimentícia preparada com a mistura GL:OP 40:60 será chamada de EA 40:60 e a emulsão preparada com a mistura GL:OP 20:80, de EA 20:80.

As emulsões EA 40:60 e EA 20:80 apresentaram alta contagem de células viáveis, acima de 8 log UFC/g durante todo o período de armazenamento refrigerado a 5 °C (dados não mostrados). Dessa forma, ambas as formulações puderam ser consideradas como alimentos probióticos. Desta forma, após a produção do terceiro lote das emulsões alimentícias, foi realizada a análise sensorial aos 7 e 21 dias de armazenamento a fim de verificar mudanças nas características organolépticas nas formulações. Aos 7 dias de

armazenamento refrigerado a 5 °C, a consistência das emulsões alimentícias foi analisada (Figura8).

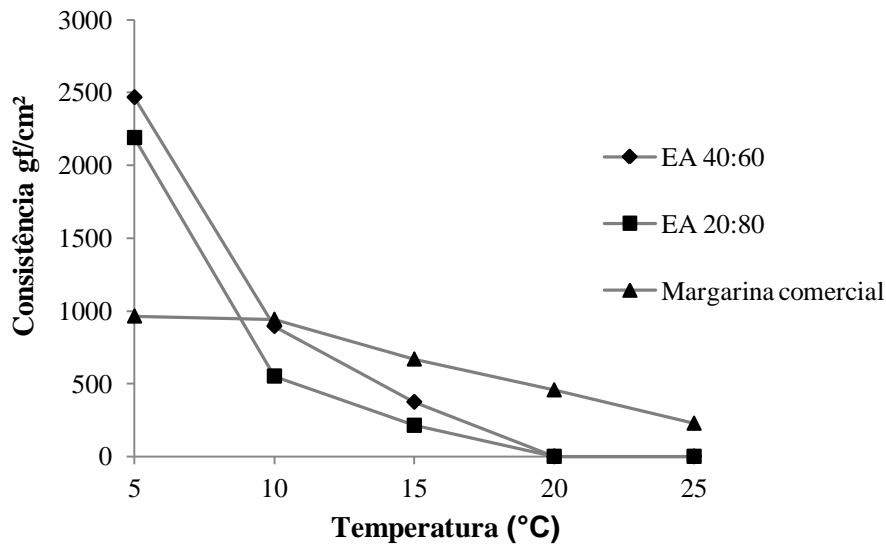


Figura 8. Consistência das emulsões alimentícias produzidas e da margarina comercial em função da temperatura.

As misturas de gordura do leite e oleína de palma previamente selecionadas mostraram-se apropriadas para a aplicação nas emulsões alimentícias potencialmente probióticas. A 5 °C, ambas as emulsões (EA 40:60 e EA 20:80) apresentaram consistência alta e conseqüentemente pouca espalhabilidade. Contudo, um pequeno aumento de temperatura para 10 °C já resultou em espalhabilidade satisfatória, semelhante à da margarina comercial. A espalhabilidade adequada se manteve até os 15 °C, mas nas demais temperaturas analisadas, 20 e 25 °C, a consistência estava baixa e o equipamento não teve sensibilidade para medi-la. Em contrapartida, a margarina comercial apresentou uma curva de consistência mais uniforme, apresentando consistência até 25 °C. No entanto, é de extrema importância ressaltar que oscilações de temperatura em produtos probióticos poderiam acarretar perdas na viabilidade dos micro-organismos devido à coalescência da fase aquosa do produto e ao conseqüente aumento do contato dos micro-organismos probióticos com o oxigênio do ar, além de resultar em maior risco de contaminação por micro-organismos patogênicos (HAIGHTON, 1976; RØNHOLT et al., 2013).

No presente estudo, a inulina não contribuiu como modificador de textura, uma vez que essa possuía baixo grau de polimerização. Apenas a inulina com alto grau de

polimerização pode promover alterações na textura de um alimento ao ser inserida neste, uma vez que sua adição em água forma um gel constituído por cristais de inulina insolúveis em água, conferindo estabilidade física ao alimento (NINESS, 1999; APOLINÁRIO et al., 2014). Entretanto, sua adição em alimentos probióticos ricos em lipídios parece auxiliar na viabilidade destes micro-organismos, sendo utilizada como substrato. SOUZA (2010) não observou alterações de consistência de margarinas probióticas adicionadas de inulina, contudo a sua adição foi primordial para a sobrevivência da *B. animalis* no produto.

3.4. Aceitação sensorial

No total, participaram deste estudo 100 provadores, sendo 52% do sexo feminino e 48% do sexo masculino, com idade média de 26 anos. Não houve diferença estatística significativa da aceitação sensorial em função do tempo de armazenamento, nem entre as formulações ($p > 0,05$) (Tabela 6). Além disso, no presente estudo, entre 50 e 72% das notas atribuídas estavam entre 7 e 8, o que corresponde, na escala hedônica, às opiniões variando entre “gostei regularmente” e “gostei muito”.

Tabela 6. Escores de aceitabilidade para as formulações de emulsão alimentícia (média \pm desvio padrão), após 7 e 21 dias de armazenamento refrigerado a 5 ± 1 °C.

Formulação	Período de armazenamento (dias)	
	7	21
EA 40:60	6,94 \pm 1,33 ^{Aa}	6,92 \pm 1,04 ^{Aa}
EA 20:80	6,44 \pm 1,72 ^{Aa}	6,24 \pm 1,44 ^{Aa}

^{A,B} Letras maiúsculas distintas sobrescritas em uma mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes formulações estudadas no mesmo período de armazenamento.

^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas em uma mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes períodos estudados para uma mesma formulação.

Entre os critérios utilizados para atribuição de escore (sabor, textura e aparência) (Tabela 7), para a formulação EA 40:60 65% (n=39) e 67% (n=42) dos provadores citaram sabor e textura, respectivamente, como atributos positivos. Para a formulação EA 20:80, a textura foi o quesito que mais agradou (n=43) aos provadores. O sabor foi citado como aspecto positivo e negativo igualmente. Os atributos cor e aroma foram poucos citados como aspectos positivos ou negativos das emulsões alimentícias estudadas. Em alguns casos, um

único provador mencionou mais de dois atributos para a mesma amostra, portanto o número de citações obtidas foi superior ao número de provadores que preferiram ou não a amostra.

Tais resultados corroboram com os de BURITI et al. (2008), que observaram que os provadores apontaram o sabor e a textura de queijo simbiótico como os principais atributos positivos, mostrando que tais características são fundamentais para a aceitação deste produto pelo consumidor.

A aceitação sensorial em alimentos probióticos ricos em lipídios já foi reportada na literatura. ONG et al. (2007) observaram boa aceitação sensorial em queijo cheddar probiótico, com gordura total entre 30 e 33% e adicionado de *Lactobacillus* ou de *Bifidobacterium sp.*

Tabela 7. Números de citações de atributos positivos e negativos mencionados pelos provadores às emulsões alimentícias EA 40:60 e EA 20:80, considerando todo o período de armazenamento.

Atributos positivos				
Formulações	Sabor	Cor	Aroma	Textura
EA 40:60	39	10	7	42
EA 20:80	31	11	7	43
Atributos Negativos				
	Sabor	Cor	Aroma	Textura
EA 40:60	21	6	10	21
EA 20:80	31	15	7	17

Alguns participantes avaliaram as amostras como “sem sal”, o que resultou na interpretação de que o gosto era um atributo negativo. No entanto, apenas para a emulsão alimentícia EA 20:80, poucos participantes relataram sentir gosto “amargo” ou “azedo” no produto. Possivelmente a cepa *B. animalis* Bb-12 produziu ácido acético e ácido láctico, influenciando o gosto azedo relatado na formulação EA 20:80. A produção destes compostos pelo gênero *Bifidobacterium* é reportada na literatura (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

Ademais, nesta mesma emulsão alimentícia, a adição de caseinomacropéptido também pode ter cooperado para o gosto residual relatado pelos participantes, devido à sua proteólise. A liberação de alguns aminoácidos e/ou peptídeos pode contribuir para o gosto amargo (KIRIMURA et al., 1969) e a partir destes poderá ocorrer a formação de compostos sulfurosos (SREEKUMAR et al., 2009). A maior aceitação da emulsão alimentícia EA 40:60 pode ter sido devida ao maior teor de gordura do leite contido na base gordurosa, que possivelmente mascarou o sabor residual deixado pela produção do ácido acético e ácido láctico.

4. CONCLUSÃO

A adição de oleína de palma provocou mudanças substanciais na estrutura da rede cristalina da gordura do leite, ocorrendo redução no início da cristalização (*Onset*) e redução do ponto de fusão das amostras. Desta forma, as misturas EA 40:60 e EA 20:80 mostraram-se mais adequadas para a aplicação em emulsões alimentícias probióticas. A consistência das emulsões alimentícias probióticas apresentou textura macia quando refrigeradas apenas a 10 °C. Contudo, ambas as emulsões alimentícias tiveram boa aceitação sensorial nos dias de armazenamento, 7 e 21, sendo a formulação EA 40:60 a que obteve o maior número de citações positivas no quesito “sabor”, possivelmente pelo maior teor de gordura do leite.

5. REFERÊNCIAS

- AGUEDO, M.; HANON, E.; DANTHINE, S.; PAQUOT, M.; LOGNAY, G.; THOMAS, A.; VANDENBOL, M.; THONART, P.; WATHELET, J.P.; BLECKER, C. Enrichment of anhydrous milk fat in polyunsaturated fatty acids residues from linseed and rapeseed oils through enzymatic interesterification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.5, p.1757-1765, 2008.
- AINI, I.N.; MISKANDAR, M.S. Utilization of palm oil and palm products in shortenings and margarines. **European Journal Lipid of Science Technology**, v.109, n.4, p.422-432, 2007.
- APOLINÁRIO, A.C.; DAMASCENO, B.P.G.L.; BELTRÃO, N.E.M.; PESSOA, A.; CONVERTI, A.; SILVA, J.A. Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. **Carbohydrate Polymers**, v.101, p.368-378, 2014.
- BONNAIRE, L.; SANDRA, S.; HELGASON, T.; DECKER, E.A.; WEISS, J.; McCLEMENTS, D.J. Influence of lipid physical state on the in vitro digestibility of emulsified lipids. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.56, n.12, p.3791-3797, 2008.

- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO (MAPA). **Portaria n. 156 de 7 de março de 1996**. Diário Oficial da União, Brasília, 11 de março de 1996.
- 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.
- CODEX ALIMENTARIUS, **Codex Standard for Named Vegetable Oils**. Codex-Stan 210, v.8, 2001.
- DEMAN, J.M. Consistency of fats: a review. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.60, n.1, p.82-87, 1983.
- DUTCOVSKY, S.D. **Análise sensorial dos alimentos**. Curitiba: Champagnat, 1996. 123p.
- FARMANI, J.; SAFARI, M.; HAMEDI, M. Application of palm olein in the production of zero-trans Iranian vanaspati through enzymatic interesterification. **European Journal of Lipid Science Technology**, v.108, n.8, 636–643, 2006.
- GAN, H.L.; TAN, C.P.; CHE MAN, Y.B.; NORAINI, I.; NAZIMAH, S.A.H. Monitoring the storage stability of RBD palm olein using the electronic nose. **Food Chemistry**, v.89, n.2, p.271-282, 2005.
- GEE, P.T. Analytical characteristics of crude and refined palm oil and fractions. **European Journal of Lipids Science Technology**, v.109, n.4, p.373-379, 2007.
- GILLINGHAM, L.G.; HARRIS-JANZ, S.; JONES, P.J.H. Dietary Monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. **Lipids**, v.46, n.3, p.209-228, 2011.
- GLIBOWSKI, P.; ZARZYCKI, P.; KRZEPKOWKA, M. The rheological and instrumental textural properties of selected table fats. **International Journal of Food Properties**, v. 11, n.3, p.678-686, 2008.
- GROTEHUIS, E.; VAN AKEN, G.A.; VAN MALSSSEN, K.F.; SCHENK, H. Polymorphism of milk fat studied by Differential Scanning Calorimetry and Real-Time X-ray Powder Diffraction. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v.76, n.9, p.1031-1039, 1999.
- GUNSTONE, F.D.; HARWOOD, J.L. Occurrence and characterization of oils and fats. . In: GUNSTONE, F.D.; HARWOOD, J.L.; DIJKSTRA, A.J. **The Lipid Handbook**. 2007. 3^{ed}, United States of America: Taylor & Francis Group.2006. cap.2, p.37-142.
- HAIGHTON, A.J. The measurement of the hardness of margarines and fats with cone penetrometers. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v.36, n.8, p.345-348, 1959.
- HAIGHTON, A.J. Blending, chilling, and tempering of margarines and shortenings. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v.53, n.6, p.397-399, 1976.
- HARRIS, W.S.; MOZAFFARIAN, D.; RIMM, E.; KRIS-ETHERTON, P.; RUDEL, L.; APPEL, L.J.; ENGLER, M.M.; ENGLER, M.B.; SACKS, F. Omega-6 fatty acids and risk for cardiovascular disease. **Journal of the American Heart Association**, v.119, p.902-907, 2009.
- HERRERA, M.L.; GATTI, M.D.L.; HARTEL, R.W. A kinetic analysis of crystallization of a milk fat model system. **Food Research International**, v.32, n.4, p.289-298, 1999.

- HILIBRICK, G.; AUGUSTIN, M.A. Milkfat characteristics and functionality: opportunities for improvement. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.57, n.1, p.45-51, 2002.
- HIMAWAN, C.; STAROV, V.M.; STAPLEY, A.G.F. Thermodynamic and kinetic aspects of fat crystallization. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.122, n.1-3, p.3-33, 2006.
- KIRIMURA, J.; SHIMIZU, A.; KIMIZUKA, A.; NINOMIYA, T.; KATSUYA, N. The contribution of peptides and amino acids to the taste of foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.17, n.4, p.689-695, 1969.
- LOPEZ, C.; BOURGAUX, C.; LESIEUR, P. Milk fat and primary fractions obtained by dry fractionation 1. Chemical compositions and crystallization properties. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.144, n.1, p.17-33, 2006.
- LOPEZ, C.; LESIEUR, P.; BOURGAUX, C.; OLLIVON, M. Thermal and structural behavior of anhydrous milk fat. 3. Influence of cooling rate. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.2, p.511-526, 2005.
- MARANGONI, A.G.; LENCKI, R.W. Ternary phase behavior of milk fat fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.10, p.3879-3884, 1998.
- MARANGONI, A.G.; ROUSSEAU, D. The influence of chemical interesterification on physicochemical properties of complex fat systems. 1. Melting and crystallization. **Journal of American Oil Chemistry Society**, Champaign, v.75, n.10, p.1265-1271, 1998.
- METIN, S.; HARTEL, R.W. Milk fat and cocoa butter. In: GARTI, N.; WIDLAK, N. **Cocoa butter and related compounds**. 2012. 1^oed., AOCS Press: United States of America. cap.15 , p.365-392.
- MIAO, S.; MAO, L. DSC Application to characterizing food emulsions. In: CHIAVARO, E. **Differential Scanning Calorimetry: Applications in fat and oil technology**. 2015. 1^oed. CRC Press: United States. cap.10, p.243-269.
- NASSU, R.T.; GONÇALVES, L.A.G. Determination of melting point of vegetable oils and fats by differential scanning calorimetry (DSC) technique. **Grasas y Aceites**, v.50, n.1, p.16-52, 1999.
- MDA, O.I.; DUMONT, M.J.; NGADI, M. Palm oil: Processing, characterization and utilization in the food industry – A review. **Food Bioscience**, v.10, p.26-41, 2015.
- NINESS, K.R. Inulin and oligofructose: What are they? **The Journal of Nutrition**, v.129, n.7, p.1402-1406, 1999.
- O'BRIEN, R.D. Raw materials. In: _____. **Fats and Oils: Formulating and Processing for Applications**. 3^oed. 2009. cap.1, p.1-72.
- ONG, L.; HENR, IKSSON, A.; SHAH, N.P. Chemical analysis and sensory evaluation of Cheddar cheese produced with *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L.*; *L. paracasei*, or *Bifidobacterium* sp. **International Dairy Journal**, v.17, n.8, .p. 938-945, 2007.
- PEDROZO, D.D.L.; THOMAZINI, M.; HEINEMANN, R.J.B.; FAVARO-TRINDADE, C.S. Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. **International Dairy Journal**, v.26, p.127-132, 2012.
- PITINO, I.; RANDAZZO, C.L.; CROSS, K.L.; PARKER, M.L.; BISIGNANO, C.; WICKHAM, M.S.J.; MANDALARI, G.; CAGGIA, C. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains inoculated in cheese matrix during simulated human digestion. **Food Microbiology**, v.31, n.1, p.57-63, 2012.

- POSSEMIERS, S.; MARZORATI, M.; VERSTRAETE, W.; VAN DE WIELE, T. Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. *International Journal of Food Microbiology*, v.141, n.1-2, p.97-103, 2010.
- PULIGUNDLA, P.; VARIYAR, P.S.; KO, S.; OBULAM, V.S.R. Emerging trends in modification of dietary oils and fats and health implications – a review. *Sains Malaysiana*, v.41, n.7, p.871-877, 2012.
- RACT, J.N.R.; COTTING, L.N.; POLTRONIERI, T.P.; SILVA, R.C.; GIOIELLI, L.A. Comportamento de cristalização de lipídios estruturados obtidos a partir de gordura do leite e óleo de girassol. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, v.30, n.1, p.258-267, 2010.
- RAO, R.K.; POLK, D.B.; SETH, A.; YAN, F. Probiotics the good neighbor: guarding the gut mucosal barrier. *American Journal of Infectious Diseases*, v.5, n.3, p.195-199, 2009
- RODRIGUES, J.N.; ANTON, C.; GIOIELLI, L.A. Cristalização de lipídios estruturados obtidos a partir de gordura do leite e óleo de milho. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.39, n.1, p.93-103, 2003.
- RODRIGUES, J.N.; TORRES, R.P.; MANCINI-FILHO, J.; GIOIELLI, L.A. Physical and chemical properties of milkfat and phytosterol esters blends. *Food Research International*, v.40, n.6, p.748-755, 2007.
- RØNHOLT, S.; MORTENSEN, K.; KNUDSEN, J.C. The effective factors on the structure of butter and other milk fat-based Products. *Reviews in Food Science and Food Safety*, v.12, n.5, p.468-482, 2013.
- SIRI-TARINO, P.W.; CHIU, S.; BERGERON, N.; KRAUSS, R.M. Saturated fats versus polyunsaturated fat versus carbohydrates for cardiovascular disease prevention and treatment. *Annual Review of Nutrition*, v.35, p.517-543, 2015.
- SMIDDY, M.A.; HUPPERTZ, T.; VAN RUTH, S. M. Triacylglycerol and melting profiles of milk fat from several species. *International Dairy Journal*, v.24, n.2, p.64-69, 2012.
- SOARES, F.A.S.D.M.; DA SILVA, R.C.; DA SILVA, K.C.G.; LOURENCO, M.B.; SOARES, D.F.; GIOIELLI, L.A. Effects of chemical interesterification on physicochemical properties of blends of palm stearin and palm olein. *Food Research International*, v.42, n.9, p.1287-1294, 2009.
- SOUZA, C.H.B. **Desenvolvimento de margarina probiótica e simbiótica: viabilidade do probiótico no produto e resistência *in vitro***. 2010. 208 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, Área de Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.
- SREEKUMAR, R.; AL-ATTABI, Z.; DEETH, H.C.; TURNER, M.S. Volatile sulfur compounds produced by probiotic bacteria in the presence of cysteine or methionine. *Letters in Applied Microbiology*, v.48, n.6, p.777-782, 2009.
- TOMASZEWSKA-GRAS, J. Melting and crystallization DSC profiles of milk fat depending on selected factors. *Journal of Thermal Analyses and Calorimetry*, v.113, n.1, p.199-208, 2013.
- VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, v.18, n.7, p.714-728, 2008.
- WAHRBURG, U. What are the health effects of fat? *European Journal of Nutrition*, v.43, n.1, p.1-11, 2004.

- WALTERS, F.H.; PARKER Jr., L.R.; MORGAN, S.L.; DEMING, S.N. **Sequential simplex optimization: a technique for improving quality and productivity in research, development, and manufacturing**. 1^oed, Boca Raton: CRC Press, 1991.403p.
- WIKING, L.; DE GRAEF, V.; RASMUSSEN, M.; DEWETTINCK, K. Relations between crystallization mechanisms and microstructure of milk fat. **International Dairy Journal**, v.19, n.8, p.424-430, 2009.
- WILLIAMS C.M.; FRANCIS-KNAPPER J.A.; WEBB D.; BROOKES C.A.; ZAMPELAS A.; TREDGER J.A.; WRIGHT J.; CALDER P.C.; YAQOOB P.; ROCHE H.; GIBNEY M.J.; Cholesterol reduction using manufactured foods high in monounsaturated fatty acids, a randomised cross-over study, **British Journal of Nutrition**, v.81, n.6, p.439–446, 1999.
- WRIGHT, A.J.; SCANLON, M.G.; HARTEL, R.W.; MARANGONI, A.G. Rheological properties of milkfat and butter. **Journal of Food Science**, v.66, n.8, p.1056-1071, 2001.
- YONEJIMA, Y.; HISA, K.; KAWAGUCHI, M.; ASHITANI, H.; KOYAMA, T.; USAMIKRANK, Y.; KISHIDA, N.; KISHINO, S.; OGAWA, J. Lactic acid bacteria-containing chocolate as a practical probiotic with increased acid tolerance. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.4, n.4, p.773-777, 2015.
- ZHANG, X.; LI, L. XIE, H.; LIANG, Z.; SU, J.; LIU, G. ; LI, B. Comparative Analyses of Thermal Behavior, Isothermal Crystallization Kinetics and Polymorphism of palm oil fractions. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 1036-1052, 2013.

CAPÍTULO 3

Viabilidade e sobrevivência gastrointestinal simulada *in vitro* de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 em emulsões alimentícias

RESUMO: O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade no produto e a resistência gastrointestinal *in vitro* de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 incorporada em emulsões alimentícias potencialmente simbióticas durante o seu armazenamento refrigerado. Adicionalmente, foram comparados os métodos de semeadura em ágar seletivo e de qPCR combinado com propidium monoazide (PMA) após o 35º dia de armazenamento. As emulsões testadas consistiam de: 40% de gordura do leite e 60% de oleína de palma (EA 40:60) e de 20% de gordura do leite e 80% de oleína de palma (EA 20:80) e foram analisadas nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a 5 °C. As populações de *B. animalis* Bb-12 nas formulações mantiveram-se entre 8,48 e 9,35 log UFC/g durante os 28 dias de armazenamento e as diferentes proporções de gordura do leite e oleína de palma não afetaram a sua viabilidade. O probiótico demonstrou boa resistência às condições gastrointestinais simuladas após as 6h de ensaio, durante todo o período estudado, com taxa de sobrevivência de 80% e 75% para as formulações EA 40:60 e EA 20:80, respectivamente. No entanto, a maior proporção de gordura do leite na formulação EA 40:60 contribuiu para a sobrevivência do micro-organismo durante a sobrevivência *in vitro*. Dentre os métodos utilizados para a quantificação do micro-organismo estudado, os valores obtidos através dos métodos convencional e qPCR com tratamento PMA foram semelhantes. Porém, o método de qPCR sem o uso de PMA mostrou superestimar a população de bifidobactérias. Desta forma, a formulação EA 40:60 contribuiu para a manutenção da viabilidade do micro-organismo *B. animalis* Bb-12 e a melhor sobrevivência *in vitro* frente às condições gastrointestinais simuladas durante os 28 dias de armazenamento refrigerado, demonstrando ser uma matriz adequada para a cepa probiótica.

Palavras-chave: Alimento funcional; Probiótico; *Bifidobacterium*; *In vitro*; qPCR.

Viability and *in vitro* gastrointestinal survival of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 in tablespreads.

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the viability in the product and the *in vitro* gastrointestinal survival of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 incorporated in potentially synbiotic tablespreads during refrigerated storage. Moreover, the application of Quantitative Real Time PCR (qPCR) combined with the use of propidium monoazide (PMA) was compared with the plate count method to evaluate the survival of the Bb-12 strain during exposure to *in vitro* simulated gastrointestinal tract conditions after 35 days of storage. The spreads evaluated included: 40% milkfat and 60% palm olein (EA 40:60), and 20% milkfat and 80% palm olein (EA 20:80) and were evaluated after 1, 7, 14 and 28 days of storage at 5 °C. Both formulations studied showed probiotic viabilities ranging from 8 to 9 log cfu/g during the 28 days of storage, and the milk fat and olein palm oil in different concentrations did not affect the probiotic viabilities. The probiotic strain showed good survival after six hours of the *in vitro* simulated gastrointestinal tract conditions during the storage period studied, with survival rate of 80% and 75%, respectively, for formulations EA 40:60 and EA 20:80. However, the higher proportion of milk fat showed to contribute for the *in vitro* survival of the strain. The results of both methods, qPCR with PMA and plate count method, were similar, but the qPCR without PMA showed to overestimate the Bb-12 populations. Thus, the tablespread EA 40:60 showed to be the best choice to maintain the microorganism viability, also improving Bb-12 *in vitro* gastrointestinal survival throughout 28 days of storage, showing to be a suitable matrix for the probiotic strain.

Key-words: Functional food; Tablespread; Probiotic; *Bifidobacterium*; *In vitro*; qPCR.

1. INTRODUÇÃO

Diversos benefícios são citados e relacionados ao consumo de probióticos, uma vez que estes auxiliam na manutenção de uma microbiota intestinal considerada mais saudável, sendo eles: redução do risco de doenças intestinais inflamatórias, redução dos sintomas de intolerância à lactose, aumento da biodisponibilidade de nutrientes, prevenção e redução de alergias, redução do risco de câncer, redução do colesterol, efeito anti-hipertensivo, efeito imunomodulador e redução da atividade de *Helicobacter pylori* (COLLADO et al., 2009; VRESE et al., 2011; RIZZARDINI et al., 2012; SHARMA & DEVI, 2014).

Tradicionalmente, os probióticos têm sido incorporados a iogurtes e outros laticínios fermentados. Porém, nos últimos anos tem se estudado outros tipos de alimentos para a incorporação de probióticos, como sobremesas lácteas e bebidas fermentadas à base de frutas, vegetais e cereais vêm sendo explorados como possíveis veículos para estes micro-organismos (BURITI et al, 2010; ABU-GHANNAM & RAJAURIA, 2015; MRIDULA & SHARMA, 2015). Desta maneira, margarinas e similares surgem como matrizes alimentares interessantes para estudar os efeitos da incorporação de culturas probióticas, em virtude da sua composição ser rica em lipídios, quando comparados a iogurtes e leites fermentados (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001; TAMIME, 2002). Essa característica peculiar pode conferir maior proteção e manutenção da cepa probiótica no alimento.

A incorporação de probióticos a uma matriz alimentar adequada e a manutenção de sua viabilidade celular durante o trânsito gastrointestinal é fundamental (RANADHEERA et al., 2012). Testes *in vitro* para avaliar a resistência gástrica e entérica são frequentemente utilizados para a avaliação do potencial probiótico em alimentos (CHARTERIS et al., 1998; VINDEROLA & REINHEIMER, 2003; SCHILLINGER et al., 2005). Adicionalmente, o uso de qPCR para auxiliar na detecção, caracterização e especificação de micro-organismos em alimentos tem sido proposto em alguns estudos (REBRIKOV & TROFIMOV, 2006; VILLARREAL et al., 2013), juntamente com o uso de *Propidium Monoazide* (PMA), agente intercalante ao DNA de micro-organismos que estejam com sua membrana celular rompida ou danificada, levando à omissão da detecção no momento da análise por qPCR (NOCKER et al., 2006).

Dentre os probióticos, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 é uma cepa com efeitos benéficos comprovados descritos na literatura científica (OUWEHAND et al., 2004; O'MAHONY et al., 2005; NABAVI et al., 2014). Esse micro-organismo pertence ao gênero *Bifidobacterium*, o qual é encontrado na microbiota gastrointestinal humana e animal sadia,

possui pH ótimo de crescimento entre 6 e 7 e utiliza uma variedade de substratos para a fermentação (TOJO et al., 2014; DERRIEN & VLIEG, 2015).

Para que haja uma manutenção da viabilidade das bactérias probióticas nos alimentos, o prebiótico inulina frequentemente vem sendo citado em estudos (BURITI et al., 2010; BEDANI et al., 2014; MATIAS et al., 2014). Esta proteção está associada à sua resistência à hidrólise enzimática, sendo, também, um possível substrato para os probióticos. Além de seu efeito prebiótico, a inulina indiretamente contribui para muitos outros benefícios à saúde (ROBERFROID, 2007). Outros ingredientes, como concentrados proteicos (caseinomacropéptido) podem desempenhar um efeito protetor similar aos probióticos, em virtude de suas características físico-químicas e capacidade tamponante.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade no produto e a resistência gastrointestinal *in vitro* da cepa probiótica *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 incorporada em emulsões alimentícias potencialmente simbióticas durante o seu armazenamento refrigerado. Adicionalmente, foram comparados os métodos de semeadura em ágar seletivo e de qPCR isoladamente e combinado com propidium monoazide (PMA) para a determinação da viabilidade e da resistência gastrointestinal *in vitro* de Bb-12 após o 35° de armazenamento das emulsões.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Para o preparo das emulsões alimentícias, foram utilizados os seguintes ingredientes para a fase oleosa: gordura do leite anidra (Fonterra, Goiânia, Brasil) e oleína de palma PN3 (Agropalma, Tailândia, Brasil), emulsificantes monoacilglicerol destilado (Dimodan® HS-F e Dimodan® US/C, Danisco, Cotia, Brasil) e ésteres de poliglicerol de ácido ricinoleico (Grindsted® PGPR Super, Danisco, Cotia, Brasil), vitamina A (Fortitech South América Indústria e Comércio Ltda., Campinas, Brasil), corante β -Caroteno 30% FS (DSM Produtos Nutricionais Brasil, São Paulo, Brasil) e aroma de manteiga (Duas Rodas, Jaraguá do Sul, Brasil). Para a fase aquosa foram utilizados: água, leite em pó desnatado (Molico, Nestlé), sal (Cisne, Cabo Frio, Brasil), inulina (Beneo GR, Orafti, Oreye, Bélgica), caseinomacropéptido (Lacprodan CGMP -10, Arla Foods Ingredients) e a cultura probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Christian Hansen, Valinhos, Brasil) do tipo DVS (*direct vat set*).

2.2. Preparo do inóculo contendo a cultura probiótica

A adição de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 à fase aquosa das emulsões alimentícias foi realizada após uma etapa de pré-incubação da cultura. Para isso, 4 gramas de leite em pó desnatado foram reconstituídos em 40 mL de água, conforme instrução do fabricante. Após a sua esterilização em autoclave, foram adicionadas 15 g da cultura probiótica liofilizada. O leite inoculado foi, então, incubado a 37 °C por 2 horas. Tal procedimento foi realizado com a finalidade de promover a ativação e certa multiplicação do micro-organismo probiótico antes da sua adição aos demais ingredientes, para que o produto apresentasse uma concentração inicial de micro-organismo probiótico de aproximadamente 9,00 log UFC/g.

2.3. Produção das emulsões alimentícias

Foram produzidas duas emulsões alimentícias com 60% de lipídios e em diferentes proporções de gordura do leite (GL) e oleína de palma (OP), no qual a primeira formulação continha proporção de GL:OP de 40:60, e a segunda com teores de 20:80. Todas as emulsões alimentícias foram produzidas em lotes de 3 kg, de acordo com as formulações apresentadas na Tabela 1. Para o preparo da fase aquosa, a inulina e caseinomacropéptido foram adicionados em água aquecida a 40°C para a dissolução completa. Em seguida, a cultura probiótica previamente ativada, conforme descrito no item 2.2, foi adicionada à fase aquosa. A fase oleosa foi preparada com as misturas previamente selecionadas de gordura do leite e oleína de palma. Para o processo de emulsificação, a fase aquosa foi lentamente adicionada à fase oleosa sob agitação constante em batedeira planetária (Kea33 – Stand Mixer, KitchenAid, São Paulo, Brasil) durante 3 minutos à temperatura aproximada de 25 °C.

Posteriormente, a emulsão foi transferida para uma sorveteira (modelo DS-3, Tetra Pak Hoyer Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil) com resfriamento por líquido refrigerante à temperatura de aproximadamente -10 °C, para a cristalização parcial. A emulsão alimentícia foi retirada da sorveteira enquanto apresentava aspecto de um líquido viscoso. Porções de 25 g do produto foram acondicionadas em potes de polipropileno branco (68 mm de diâmetro, 32 mm de altura, 55 mL de volume total, Tries Aditivos Plásticos, São Paulo Brasil), selados com selo aluminizado (alumínio + polietileno – Okra, Sorocaba, Brasil), em seladora Delgo n° 1968 (Delgo Metalúrgica, Cotia, Brasil) e armazenados sob refrigeração em cabine refrigerada (Metalfrio, mod. VB43R, São Paulo, Brasil) a 5 ± 1 °C.

Tabela 1. Ingredientes e respectivas proporções utilizadas nas emulsões alimentícias estudadas.

Ingredientes (%)	Formulação
<i>Fase oleosa</i>	
Base gordurosa*	60,00
Emulsificantes	3,40
Corante	0,001
Aromatizante	0,05
Vitamina A	0,88
<u>Total fase oleosa</u>	64,33
<i>Fase aquosa</i>	
Água	31,00
Sal	0,76
Ácido láctico	0,01
Leite em pó	0,40
Cultura probiótica	0,50
Inulina	2,00
Caseinomacropéptido	1,00
<u>Total fase aquosa</u>	35,67
<u>Total (fase oleosa + fase aquosa)</u>	100,00

*Base gordurosa composta pela mistura GL:OP 40:60 ou GL:OP 20:80, sendo GL = gordura do leite e OP = oleína palma.

2.4. Período de armazenamento e amostragem

Após a produção das emulsões alimentícias (dia 0) e decorrido o período de armazenamento de 1, 7, 14, 21 e 28 dias a 5 °C, realizou-se análises de pH e de viabilidade da cepa probiótica incorporada ao produto. Após 7, 14, 21 e 28 dias, foi realizado o ensaio *in vitro* para avaliar a sobrevivência do probiótico frente às condições gastrointestinais simuladas.

2.5. Determinação de pH

Decorridos os tempos de armazenamento sob refrigeração descritos no item 2.4, foram realizadas as determinações de pH em pHmetro modelo Orion Star A211 (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA), com a utilização de eletrodo tipo penetração, modelo 2A04-GF (Analyser, São Paulo, Brasil).

2.6. Determinação da viabilidade de *B. animalis* Bb-12

Decorridos os períodos de amostragem descritos no item 2.4, porções de 25 g da emulsão alimentícia foram retiradas em condições de assepsia e homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}) previamente aquecida a 40°C, conforme descrito por CHARTERIS et al. (2002), utilizando-se Bag Mixer (Interscience, St. Nom, França) sob agitação constante durante 5 minutos para a completa diluição da amostra. Após a homogeneização da emulsão alimentícia, foi retirada uma alíquota da diluição 10^{-1} para as diluições decimais subsequentes, utilizando-se o mesmo diluente. Posteriormente, a diluição inicial (10^{-1}) ficou em repouso durante 2 minutos para que as fases aquosa e oleosa fossem totalmente separadas. Em seguida, para efeito de comparação de metodologias, foram preparadas novas diluições decimais, conforme descrito anteriormente, desta vez com a fase aquosa do produto.

Para a contagem de *B. animalis* Bb-12, alíquotas de 1 mL de cada diluição de ambas as amostras (emulsão e fase aquosa) foram transferidas para placas de Petri estéreis. Em seguida, foi adicionado ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), suplementado com propionato de sódio (3 g/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e cloreto de lítio (2 g/L) (Merck, Darmstadt, Alemanha) - ágar LP-MRS, de acordo com VINDEROLA & REINHEIMER (2000). Após a homogeneização e endurecimento do ágar, as placas foram incubadas a 37 °C por 3 dias em anaerobiose (Sistema de Anaerobiose Anaerogen, Oxoid).

2.7. Contagem de micro-organismos indicadores de contaminação

Para a contagem de bolores e leveduras, alíquotas de 1 mL das três primeiras diluições foram transferidas para placas Petri e em seguida, adicionou-se meio de cultura PDA (Potato Dextrose Agar, Sigma-Aldrich) acidificado com ácido tartárico (Sigma-Aldrich) a 10% (g/mL). Após o endurecimento do ágar, as placas foram incubadas a 25 °C por 5 dias em aerobiose. Para avaliar a presença de *E. coli*, procedeu-se de acordo com SILVA et al. (2007), com adaptações. Alíquotas de 0,3 mL e 0,4 mL da primeira diluição (10^{-1}) e 1 mL da diluição 10^{-2} foram transferidas para placas Petri contendo meio de cultura EMB (Eosin Methylene Blue, Sigma-Aldrich) e, em seguida, foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

2.8. Sobrevivência da *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 frente às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*

A avaliação da sobrevivência do probiótico adicionado às emulsões alimentícias refrigeradas submetidas às condições gástrica e entéricas simuladas foi realizada de acordo com SOUZA (2010), com protocolo adaptado de BURITI et al. (2010).

Realizou-se a análise de cada emulsão alimentícia em triplicatas de um mesmo lote, provenientes de embalagens distintas, totalizando 9 frascos. Cerca de 10 mL de cada amostra diluída com solução de NaCl a 0,85% foram transferidos para 3 frascos estéreis. O pH das amostras foi ajustado entre 2,0 e 2,5 utilizando-se HCl (Merck) 1N. Em seguida, soluções de pepsina (*Pepsin from porcine stomach mucosa*, Sigma-Aldrich CO. St. Louis, MO, EUA) e de lipase (Amano lipase from *Penicillium camemberti*, Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, EUA) foram adicionadas aos frascos, de modo a obter concentrações de 3,0 g/L e 1,30 mg/L, respectivamente. Os frascos foram postos em banho metabólico a 37 °C, com agitação a 150 rpm (Banho Metabólico Dubnoff MA-095, Marconi, Piracicaba, Brasil) durante 2 h, para a simulação da fase gástrica. Para a próxima etapa, o pH das amostras foi ajustado para entre 4,5 e 5,5, utilizando-se uma solução alcalina, produzida a partir de 150 mL de NaOH 1 N (Synth, Diadema, Brasil), 14 g de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Synth) e água destilada q.s.p. 1 L. Bile (Bile bovine, Sigma-Aldrich) e pancreatina (Pancreatin from porcine pâncreas, Sigma Aldrich) foram adicionadas para atingirem a concentração de 5 g/L e 1,6 g/L, respectivamente. As amostras foram novamente incubadas a 37 °C por 2 h, sob agitação, para a simulação da fase entérica I. Para a última etapa do teste, o pH foi alterado para valores entre 6,5 e 7,5 utilizando-se a mesma solução alcalina, e a bile e pancreatina foram ajustados para as concentrações de 7,95 g/L e 0,79 g/L, respectivamente. Posteriormente, as amostras foram novamente incubadas a 37 °C por 2 h, sob agitação, concluindo-se, então, a simulação da fase entérica II e completando-se as 6 h de ensaio.

Para a enumeração de *B. animalis* Bb-12, alíquotas de 1 mL foram retiradas das amostras provenientes da emulsão alimentícia, após 2 h, 4 h e 6 h e procedeu-se conforme descrito no item 2.6. Os resultados foram apresentados em log UFC/g.

2.8.1. Cálculo da Taxa de Sobrevivência

Para a comparação da análise da sobrevivência do micro-organismo probiótico após o ensaio de sobrevivência *in vitro* das formulações de emulsão alimentícia ao longo do

armazenamento, foi utilizada a taxa de sobrevivência adaptada de WANG et al. (2009) e GUO et al. (2009). A taxa de sobrevivência foi calculada, de acordo com a equação:

$$\text{Taxa de Sobrevivência (\%)} = \frac{N_{\text{final}}}{N_{\text{inicial}}} \times 100$$

Sendo, N_{final} = quantidade de micro-organismo probiótico obtida após o ensaio de sobrevivência sob condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro* (após a fase entérica II); e N_{inicial} = quantidade de micro-organismo probiótico obtida no produto, antes do ensaio.

2.9. Avaliação da sobrevivência do micro-organismo *B. animalis* Bb-12 em qPCR

Para a quantificação dos micro-organismos por métodos independentes de cultivo, o DNA bacteriano da *B. animalis* Bb-12 foi isolado das emulsões alimentícias, de acordo com VILLARREAL et al. (2013), com adaptações. A análise foi realizada apenas no dia 35 de armazenamento das emulsões alimentícias para o ensaio de sobrevivência *in vitro*, para efeito de comparação entre métodos.

Para esse fim, cerca de 2 g de emulsão alimentícia ($t = 0$; fase inicial do ensaio *in vitro*), em triplicata, foram adicionadas em 18 mL de citrato trissódico di-hidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$, pH 7,5, Nuclear, Diadema, Brasil) a 2% (g/mL), pré-aquecido a 40 °C e então, as amostras foram incubadas em banho metabólico (Banho Metabólico Dubnoff MA-095, Marconi) a 45 °C, por 30 minutos. Para as demais fases do ensaio *in vitro* (gástrica, entérica I e II), utilizou-se 3 mL das soluções contendo enzimas digestivas e adicionou-se 27 mL de citrato trissódico di-hidratado, com posterior incubação em banho metabólico.

As amostras foram homogeneizadas em Bag Mixer (Interscience) por 3 minutos e centrifugadas a 4 °C (Centrífuga Refrigerada 2-16 PK, Sigma, Osterode am Harz, Alemanha), por 10 minutos a 8000 g. O sobrenadante foi descartado e, com o auxílio de hastes de algodão estéreis (*Swab*), foi removida toda a gordura presente na parede do tubo. Foi adicionado 1 mL de solução tampão (pH 8) Tris-EDTA (TE) e a amostra foi centrifugada a 7000 g a 4 °C, por 10 minutos. O *pellet* celular foi ressuscitado em 500 µL de solução TE e transferido para um tubo com rosca de 2 mL, contendo 0,3 g de esferas de zircônia (Biospec Products Inc., Bartlesville, EUA) e 150 µL de fenol-TE (Invitrogen, Carlsbad, California, USA).

As amostras foram submetidas a rompimento mecânico, usando disruptor celular (Fast Prep[®]-24, MP Biomedical, Solon, OH, EUA) por 3 pulsos a 5,5 m/s e, então, a várias etapas

de extração com 150 µL de fenol e 150 µL de solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v) (Invitrogen-Life Technologies), até a obtenção de uma interface clara. O DNA foi precipitado com etanol e armazenado a -20 °C. A concentração e qualidade do DNA genômico isolado foi determinada em um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

Para a quantificação pela técnica independente de cultivo, utilizando-se *Propidium Monoazide* (PMA) como agente intercalante de DNA, as amostras armazenadas a -20 °C foram descongeladas, centrifugadas a 4 °C, por 10 minutos, a 5000 g. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 498,75 µl de PBS 1x (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4, Sigma-Aldrich) e 1,25 µl de solução PMA a 20 mM, a fim de se obter a concentração final de 50 µM de PMA nos tubos com as amostras.

Em seguida, as amostras foram incubadas no escuro por 5 minutos, com eventual mistura, de modo a permitir a penetração do PMA nas células mortas. Posteriormente, as amostras foram expostas à luz (lâmpada halógena de 650 W, FCW 120 V, GE Lighting, General Electric Co., Cleveland, EUA), por 15 minutos, dispostas horizontalmente a uma distância de 20 cm entre os tubos e a lâmpada, mantidas em gelo e misturadas ocasionalmente para prevenir o aquecimento excessivo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4 °C, por 10 minutos, a 10.000 g e lavadas com PBS para a remoção do PMA inativo.

Em todas as amostras, com e sem PMA, foi realizada a análise de quantificação da cepa *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12, empregando-se a técnica de PCR em tempo real (qPCR), utilizando-se termociclador de PCR em tempo real (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems-Life Technologies, São Paulo, Brasil), o reagente TaqMan (Applied Biosystems-life Technologies) e os *primers* F_Bifid09c e R_Bifid06 (TAIPALE et al., 2011). As condições da reação utilizadas encontram-se na Tabela 2. Para a quantificação, utilizou-se o método de quantificação absoluta, com uma curva padrão de 6 a 8 pontos (10^8 ou 10^6 - 10^1 cópias), elaborada a partir de quantidades conhecidas de DNA genômico de cultura pura para *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12. O Ct (*Cycle Threshold*) obtido de cada amostra foi comparado ao Ct obtidos na curva padrão, para a obtenção do número de cópias das amostras.

Tabela 2. Condições utilizadas nas reações de qPCR para a quantificação de *B. animalis* Bb-12.

<i>Primers</i>	Programa da reação			
	Concentração de <i>primer</i>	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
F_Bifid09c	200 mM	1	95	10 minutos
R_Bifid06	200 mM	40	95	30 segundos
P_Bifid-sonda	200 mM	40	60	1 minuto

2.10. Análise estatística

Após o cálculo das médias e dos desvios-padrão dos resultados das análises, a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro Wilks, ao nível de 1%. A comparação entre as emulsões alimentícias foi realizada pelo teste *t* de Student para amostras independentes. O nível de confiança utilizado nas análises comparativas foi de 95%. Para as comparações realizadas para o ensaio *in vitro* e a comparação entre os métodos de cultivo convencional e independente de cultivo utilizaram-se modelos de ANOVA, seguidos do teste de médias de Tukey. O programa estatístico utilizado para as análises foi o XLSTAT, 2015.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Valores de pH e viabilidade da cepa probiótica

Os valores de pH das emulsões alimentícias EA 40:60 e EA 20:80 durante o armazenamento refrigerado são apresentados na Tabela 3. Ambos os produtos apresentaram redução de pH ao longo da vida de prateleira ($p < 0,05$). As diferenças de proporções de gordura do leite e oleína de palma entre as emulsões alimentícias possivelmente influenciaram nos valores de pH obtidos apenas na primeira semana de armazenamento dos produtos ($p < 0,05$).

No presente estudo, a presença de inulina nas emulsões alimentícias possivelmente influenciou a redução do pH. No organismo hospedeiro, após ser metabolizada, a inulina é degradada a monossacarídeos e estes, convertidos a hexoses para a via metabólica da fermentação (BROEK et al., 2008). Consequentemente, são produzidos ácidos orgânicos (SELAK, et al., 2016). De forma semelhante, a cepa Bb-12 presente na emulsão alimentícia, ao metabolizar e fermentar a inulina, possivelmente foram produzidos ácido acético e lático, reduzindo assim o pH das formulações.

Tabela 3. Valores de pH (média \pm desvio-padrão) obtidos para as emulsões alimentícias após armazenamento refrigerado.

Período de armazenamento (dias)	Emulsão Alimentícia	
	EA 40:60	EA 20:80
0	4,88 \pm 0,10 ^{Aa}	4,68 \pm 0,00 ^{Bb}
1	4,48 \pm 0,02 ^{Ac}	4,37 \pm 0,01 ^{Bd}
7	4,77 \pm 0,01 ^{Bab}	4,83 \pm 0,00 ^{Aa}
14	4,76 \pm 0,09 ^{Ab}	4,80 \pm 0,07 ^{Aa}
21	4,58 \pm 0,00 ^{Ac}	4,56 \pm 0,00 ^{Ac}
28	4,57 \pm 0,01 ^{Ac}	4,55 \pm 0,02 ^{Ac}

^{A,B} Letras maiúsculas distintas em uma mesma linha, indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$).

^{a,b,c,d} Letras minúsculas distintas em uma mesma coluna, indicam diferenças significativas entre os dias ($p < 0,05$).

A Tabela 4 apresenta os resultados de viabilidade de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 nas emulsões alimentícias EA 40:60 e E 20:80 durante o período de armazenamento. De acordo com os resultados obtidos, a emulsão alimentícia mostrou-se uma matriz adequada para veicular o micro-organismo probiótico estudado, uma vez que apresentou populações superiores a 8 log UFC/g de *B. animalis* Bb-12 ao longo da vida de prateleira. Dessa maneira, a emulsão manteve os valores recomendados pela legislação brasileira (ANVISA, 2008), de 8 a 9 log UFC na porção diária do produto. Vale destacar que as populações de *B. animalis* Bb-12 obtidas na porção diária de 10 g (ANVISA, 2003) para ambas emulsões alimentícias foram superiores às preconizadas pela ANVISA (2008).

Tabela 4. Populações de *B. animalis* Bb-12 (média \pm desvio padrão) obtidas para emulsões alimentícias (emulsão e fase aquosa) ao longo do armazenamento refrigerado.

Viabilidade	Período de armazenamento (dias)	Emulsão Alimentícia	
		EA 40:60	EA 20:80
<i>Emulsão</i> *	0	9,00 \pm 0,22 ^{Ba}	9,35 \pm 0,11 ^{Aa}
	1	9,23 \pm 0,18 ^{Aa}	9,14 \pm 0,25 ^{Aab}
	7	9,25 \pm 0,12 ^{Aa}	9,22 \pm 0,19 ^{Aa}
	14	9,22 \pm 0,12 ^{Aa}	9,07 \pm 0,11 ^{Bab}
	21	9,15 \pm 0,19 ^{Aa}	8,81 \pm 0,37 ^{Ab}
	28	8,92 \pm 0,46 ^{Aa}	8,81 \pm 0,17 ^{Ab}
<i>Fase Aquosa</i> **	0	8,70 \pm 0,17 ^{Aa}	8,97 \pm 0,29 ^{Aa}
	1	8,69 \pm 0,52 ^{Aa}	8,84 \pm 0,33 ^{Aa}
	7	8,79 \pm 0,17 ^{Ba}	9,19 \pm 0,11 ^{Aa}
	14	8,95 \pm 0,08 ^{Aa}	8,84 \pm 0,39 ^{Aa}
	21	8,82 \pm 0,26 ^{Aa}	8,57 \pm 0,90 ^{Aa}
	28	8,63 \pm 0,62 ^{Aa}	8,48 \pm 0,20 ^{Aa}

^{A,B} Letras maiúsculas distintas, em uma mesma linha, indicam diferenças significativas entre as emulsões alimentícias ($p < 0,05$).

^{a,b} Letras minúsculas distintas, em uma mesma coluna, indicam diferenças significativas entre os dias de armazenamento das emulsões alimentícias ($p < 0,05$).

*Populações obtidas para a fase emulsão: produto analisado integralmente, sem separação de fases.

**Populações obtidas para a aquosa: as fases do produto foram separadas e a fase aquosa analisada separadamente.

Em linhas gerais, para a formulação EA 40:60, não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) durante todo o período de armazenamento estudado. Para a formulação EA 20:80, houve apenas uma pequena redução de 0,54 log UFC/g da viabilidade para a fase emulsão ao longo do período de armazenamento avaliado ($p < 0,05$). Para a fase aquosa, ambas as formulações apresentaram populações de *B. animalis* Bb-12 acima de 8 log UFC/g durante todo o período de armazenamento refrigerado, sem variações estatísticas significativas ($p > 0,05$). Dessa forma, as pequenas variações observadas em cada formulação durante o período estudado não tiveram significância microbiológica, uma vez que todas foram menores do que 0,5 log UFC/g.

A alta contagem das populações de *B. animalis* Bb-12 nas formulações possivelmente se deve à matriz alimentar formada em emulsões alimentícias de água em óleo (A/O), do tipo margarina, manteiga e similares, levando a proteção do micro-organismo durante o período de armazenamento estudado. Nestes alimentos, a fase aquosa mistura-se e distribui-se na fase oleosa (fase contínua) durante o processo de emulsificação (DELAMARRE & BATT, 1999).

Sendo assim, os emulsificantes, juntamente com os cristais de lipídios formados durante a cristalização, são responsáveis por conferir uma estabilização ao produto final (GHOSH & ROUSSEAU, 2011). Além disso, em condições de anaerobiose, ocorre o retardo do crescimento de muitos micro-organismos (DELAMARRE & BATT, 1999). No entanto, a baixa concentração de oxigênio em emulsões A/O parece favorecer a manutenção da viabilidade da cepa probiótica Bb-12, particularmente por se tratar de um micro-organismo anaeróbio.

A sobrevivência de micro-organismos em emulsões A/O torna-se restrita, devido às características que este tipo de emulsão apresenta, como baixa atividade de água, por exemplo, e, ainda, em virtude da incapacidade de muitos micro-organismos se moverem entre os pequenos glóbulos e de produzirem lípases (VERRIPS & ZAALBERG, 1980). Porém, o uso de culturas de *Streptococcus lactis*, *S. cremoris* e *Betacoccus cremoris* na fase aquosa de margarinas para a produção de ácido lático e outros compostos responsáveis pela palatabilidade foi reportada por HAIGHTON (1976).

Para PEDROZO et al. (2012), a estrutura cristalina formada após o resfriamento e cristalização das bases gordurosas produzidas a partir de óleos e gorduras, confere proteção ao micro-organismo inserido na matriz lipídica, auxiliando a sua viabilidade no alimento. Outros estudos sugerem que a sobrevivência de micro-organismos em matrizes alimentares em que há um maior teor de lipídios justifica-se pela produção de enzimas lipolíticas por estas bactérias como foi reportado por YADAV et al. (2007) e ESPÍRITO SANTO et al. (2010). Em ambos os estudos foram observadas mudanças no perfil lipídico, com aumento de ácido linoleico conjugado em bebidas probióticas adicionadas de bactérias lácticas e *B. animalis*.

3.2. Micro-organismos indicadores de contaminação – bolores e leveduras e *Escherichia coli*

Na Tabela 5 encontram-se as contagens de bolores e leveduras, para as formulações EA 40:60 e EA 20:80, ao longo do seu armazenamento refrigerado. Conforme pode ser constatado na referida tabela, EA 40:60 manteve a população de bolores e leveduras até 14 dias de armazenamento em níveis de <1 e 1,18 log UFC/g, enquanto EA 20:80 obteve valores entre <1 e 2,24 log UFC/g. Apenas a formulação EA 20:80 obteve população de bolores e leveduras entre 4 e 5 ciclos logaritmos aos 21 e 28 dias.

Os bolores são os principais micro-organismos contaminantes em margarinas e similares. Possuem a capacidade de transitar pela fase oleosa das emulsões A/O devido à presença de hifas, responsáveis pela sustentação e absorção de nutrientes (DELAMARRE & BATT, 1999; PAPAGIANNI, 2004). Em relação à *E. coli*, não houve multiplicação desse micro-organismo ao longo do período de armazenamento analisado das formulações de emulsão alimentícia. Apenas alguns gêneros de bactérias que possuem a capacidade lipolítica. Desta forma, em uma emulsão A/O em que a fase aquosa esteja distribuída uniformemente na fase oleosa, o produto não apresentará coalescência da fase dispersa, reduzindo então, o risco de contaminação e multiplicação de micro-organismos no alimento final (DELAMARRE & BATT, 1999).

Tabela 5. Valores referentes à contagem de bolores e leveduras (log UFC/g)*, obtidos para as emulsões alimentícias refrigeradas, ao longo do seu armazenamento por até 28 dias.

Período de armazenamento (dias)	EA 40:60	EA 20:80
1	< 1- 1,40	< 1- 1,95
7	< 1,00	< 1- 2,22
14	< 1- 1,18	< 1- 2,24
21	< 1- 1,98	< 1- 4,09
28	< 1- 2,60	< 1- 5,50

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

3.3. Sobrevivência da *B. animalis* Bb-12 frente às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*

A sobrevivência da cepa probiótica *B. animalis* Bb-12 nas emulsões alimentícias submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro* após o armazenamento refrigerado encontra-se na Figura 1.

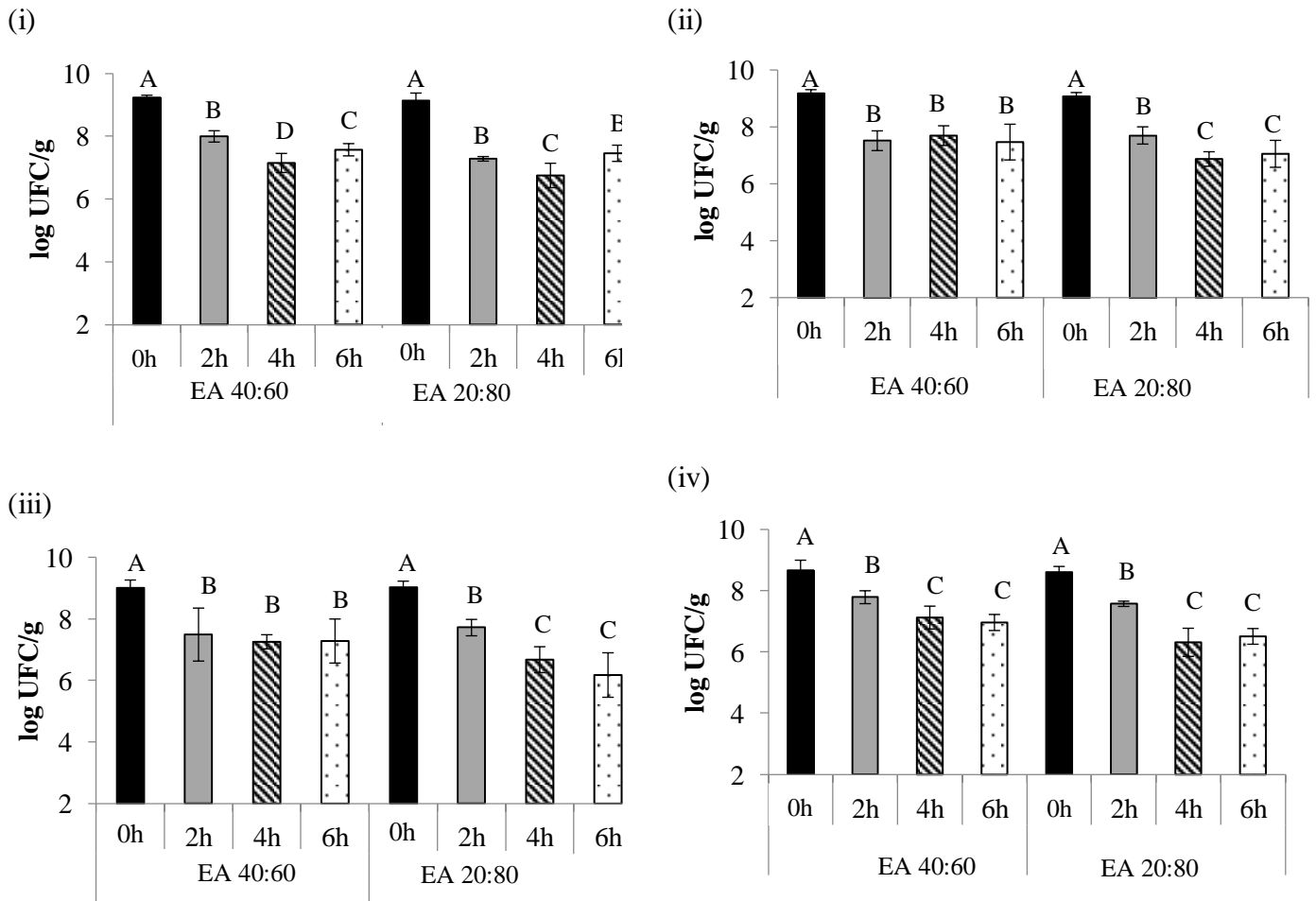


Figura 1. Sobrevivência de *B. animalis* Bb-12 nas emulsões alimentícias probióticas (EA 40:60 e EA 20:80) durante o armazenamento por 7, 14, 21 e 28 dias (i, ii, iii e iv, respectivamente) antes (0h) e durante a exposição às condições gástricas (2 h) e entéricas simuladas (4 h e 6 h).

^{A,B} Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre as fases do ensaio *in vitro*, para cada formulação ($p < 0,05$).

Em ambas as formulações estudadas, foram observadas populações de *B. animalis* Bb-12 satisfatórias durante todo o período de armazenamento refrigerado. Após as 6 h de simulação gastrointestinal, a sobrevivência foi entre 6 e 7 log UFC/g em todos os períodos estudados, ocorrendo reduções na sobrevivência do probiótico entre 1,67 e 2,86 ciclos logaritmos, sendo mais acentuado na formulação EA 20:80. Na etapa gástrica (após 2 h de ensaio) ocorreram reduções significativas ($p < 0,05$), com médias de 1,37 log UFC/g para a emulsão alimentícia EA 40:60 e de 1,39 log UFC/g para a emulsão alimentícia EA 20:80. Já para a fase entérica I, quando comparada com a fase anterior (gástrica), na formulação EA 40:60, observou-se reduções significativas ($p < 0,05$) apenas nos dias 7 e 28, com média de 0,75 log UFC/g, enquanto que na formulação EA 20:80, as reduções na sobrevivência ocorreram nos dias 7, 14 e 28, com valor médio de 0,93 log UFC/g.

Em relação à fase entérica II, com exceção do dia 7 de armazenamento da emulsão alimentícia EA 20:80, em que houve uma leve recuperação da população de bifidobactérias, os demais dias em ambas as formulações as populações de *B. animalis* Bb-12 mantiveram-se estáveis, não apresentando aumento ou redução de células viáveis após a finalização do ensaio *in vitro* ($p > 0,05$).

O período de armazenamento avaliado não influenciou de maneira significativa a taxa de sobrevivência da cepa frente às condições gastrointestinais simuladas (Tabela 6). Para a emulsão alimentícia EA 40:60, não houve diferença significativa entre os dias. Porém, no caso da emulsão alimentícia EA 20:80, houve uma redução apenas no dia 21, mas os dias 7, 14 e 28 não diferiram entre si ($p > 0,05$). Comparando-se as emulsões alimentícias, também não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$), exceto no dia 21, quando foi observada uma queda na taxa de sobrevivência na formulação EA 20:80. No entanto, em outros tipos de matrizes alimentares foram observadas valores menores na taxa de sobrevivência, quando comparado à emulsão alimentícia do presente estudo. CASAROTTI et al. (2015) observaram taxa de sobrevivência de 67% e 62% para *B. animalis* Bb-12 incorporada a leite bovino com e sem adição de inulina, respectivamente. Sendo assim, a matriz alimentar das emulsões alimentícias possivelmente favoreceu a sobrevivência do micro-organismo durante o ensaio de sobrevivência, apresentando taxa de sobrevivência acima de 70%.

Tabela 6. Taxa de sobrevivência (%) de *B. animalis* Bb-12 (média \pm desvio padrão) frente às condições gastrointestinais simuladas *in vitro* nas formulações de emulsões alimentícias.

Período de armazenamento (dias)	Taxa de sobrevivência	
	EA 40:60	EA 20:80
7	81,89 \pm 2,30 ^{Aa}	81,61 \pm 3,47 ^{Aa}
14	81,27 \pm 7,49 ^{Aa}	77,75 \pm 5,76 ^{Aab}
21	80,82 \pm 5,97 ^{Aa}	69,04 \pm 8,84 ^{Bb}
28	80,62 \pm 5,67 ^{Aa}	75,69 \pm 3,32 ^{Aab}

^{A,B} Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre as formulações durante o período de armazenamento. ^{a,b} Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os dias de armazenamento, para cada formulação.

A incorporação de *B. animalis* e sua sobrevivência às condições gastrointestinais também já foi reportada em outros estudos (CHARTERIS et al., 1998; MADUREIRA et al., 2011; BEDANI et al., 2014; KLU & CHEN, 2015). Contudo, o comportamento dos micro-organismos probióticos em diferentes matrizes alimentares durante o ensaio de sobrevivência pode sofrer alterações de acordo com a cepa empregada durante a produção do alimento (RANADHEERA et al., 2012). BURITI et al. (2010) observaram reduções médias na população de *Lactobacillus acidophilus* de 5 log UFC/g em *mousses* refrigeradas após o ensaio *in vitro*, durante os 28 dias de armazenamento. No presente estudo, foram observadas reduções da população de Bb-12 nas emulsões alimentícias entre 1,60 e 2,88 log UFC/g após as 6 h de ensaio *in vitro* durante todo o período de armazenamento.

Sendo assim, a alta proporção de oleína de palma e baixo teor de gordura do leite na base gordurosa da formulação EA 20:80 influenciaram na contagem final das populações de *B. animalis* Bb-12. Esse fato poderia ser atribuído à menor consistência e ponto de fusão do produto (dados não mostrados). Consequentemente, os micro-organismos permaneceram durante um maior tempo de exposição às condições de estresse celular, quando comparado à formulação EA 40:60. No entanto, ambas as emulsões alimentícias aumentaram a sobrevivência da *B. animalis* Bb-12, quando comparado à cultura isolada e submetida às mesmas condições de estresse. Nessa condição, foi relatado que Bb-12 apresentou redução de 4 ciclos logaritmos ao final do ensaio *in vitro* (BEDANI et al., 2013).

Semelhantemente, YONEJIMA et al. (2015) observaram que chocolates com 50% de componentes de cacau e 20% de componentes do leite, adicionados de *L. brevis* subsp. *coagulans* e *L. brevis* NTM003, mostraram contribuir para a sobrevivência dos micro-organismos. Após 2 h de ensaio *in vitro* simulando as condições gástricas, as populações de

probióticos apresentaram redução de apenas 1 log UFC/g, enquanto que a cultura liofilizada apresentou redução de 3 log UFC/g em 0,5 h de ensaio. Da mesma forma, ANDRIANTSOANIRINA et al. (2013) observaram redução de sobrevivência acima de 50% nas cepas de *B. adolescentes*, *B. bifidum*, *B. pseudocatenulatum*, quando expostos sem a presença de uma matriz alimentar.

A incorporação de probióticos em manteiga de amendoim e sua sobrevivência sob as condições gastrointestinais simuladas foram reportadas por KLU & CHEN (2015). No entanto, segundo os autores, os diferentes teores totais de lipídios de 50% e de 39,9% nas formulações não alterou a sobrevivência dos micro-organismos durante e após o ensaio *in vitro*, ocorrendo perdas de viabilidade semelhantes, de aproximadamente entre 1 e 4 log UFC/g nas formulações ao longo do ensaio *in vitro*. Já para PITINO et al. (2012), a tolerância ao estresse ácido e entérico das cepas de *L. rhamnosus* adicionadas em queijo tipo *cheddar* pode ser atribuída ao alto teor lipídico e uma matriz mais sólida que conferiu estabilidade ao micro-organismo.

Alguns estudos sugerem que a resistência do gênero *Bifidobacterium* se deva à capacidade de adaptação de algumas cepas diante do estresse ao pH ácido (JIN et al., 2012), bem como à síntese de enzimas após a acidificação do meio (MATSUMOTO et al., 2004; MÄTTÖ et al., 2006). Na fase entérica, a resistência de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 pode estar associada à sua capacidade de resistência aos sais biliares. A bile promove uma complexa resposta sobre as bifidobactérias, envolvendo diversos mecanismos celulares (RUAS-MADIEDO et al., 2009) como a expressão de diferentes proteínas (SÁNCHEZ et al., 2005) e uso de outros tipos de carboidratos além da glicose (RUAS-MADIEDO et al., 2005).

A fim de realizar um comparativo entre o método de cultivo em ágar seletivo e o método independente de cultivo, utilizando-se PCR quantitativo (qPCR), aos 35 dias de armazenamento refrigerado, realizou-se novamente um ensaio *in vitro* frente às condições gástricas e entéricas simuladas em ambas as emulsões alimentícias. A quantificação do micro-organismo antes e após os diferentes estágios do ensaio *in vitro* durante o 35º dia de armazenamento refrigerado das emulsões alimentícias e utilizando 3 diferentes metodologias (ágar seletivo, qPCR sem PMA e qPCR com PMA) são apresentados na Figura 2.

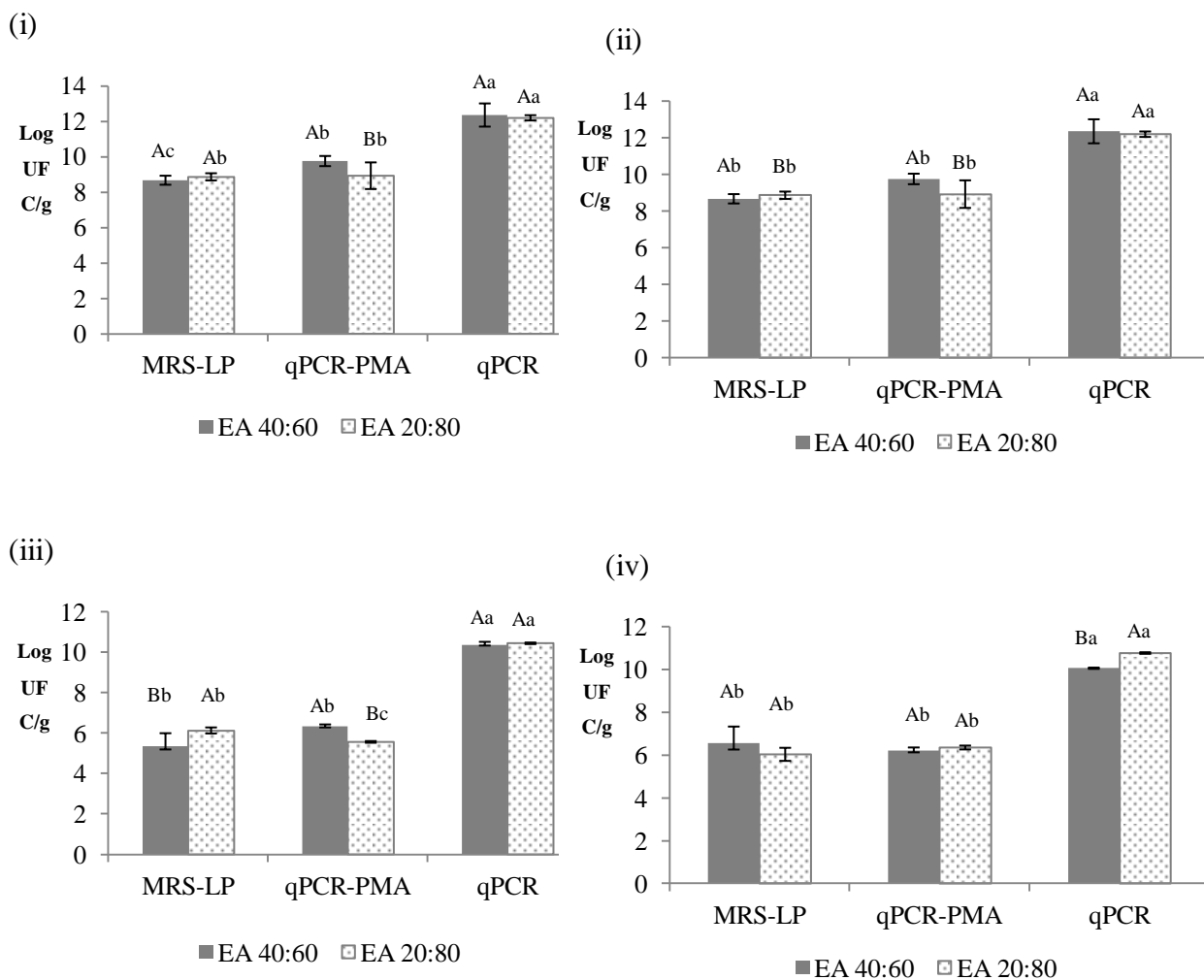


Figura 2. Sobrevivência de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 nas emulsões alimentícias probióticas (EA 40:60 e EA 20:80) durante o armazenamento por 35 dias (i), e durante a exposição às condições gástricas (ii) e entéricas simuladas (iii e iv), através dos métodos convencional (MRS-LP: ágar DeMan-Rogosa-Sharpe, com adição de Cloreto de Lítio e Propionato de Sódio), qPCR com tratamento PMA e sem PMA.

^{A,B} Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre as emulsões alimentícias, para cada fase.

^{a,b} Letras minúsculas representam diferenças entre os métodos, para cada fase.

A viabilidade para o dia 35 de armazenamento manteve-se acima de 8 log UFC/g nas emulsões estudadas. O método qPCR sem o uso de PMA apresentou valores superiores aos valores obtidos pelo método convencional utilizando ágar seletivo para *B. animalis* Bb-12 e qPCR com tratamento de PMA durante todas as fases do ensaio *in vitro* analisadas. Resultados semelhantes foram achados por KIM & KO (2012), os quais observaram a detecção de mais de 80% de vírus inativado em qPCR sem PMA. Isto porque, mesmo após a morte celular, a molécula de DNA pode resistir por dias ou por até 3 semanas, fazendo com que a análise em qPCR superestime o número de células vivas presentes em uma amostra (NOCKER et al., 2006).

De modo geral, não houve diferença significativa entre os métodos de semeadura em ágar seletivo e qPCR com PMA para as formulações EA 40:60 e EA 20:80. A exceção ocorreu para o tempo inicial da formulação EA 40:60, em que a sobrevivência da *B. animalis* Bb-12 utilizando o método convencional (8,67 log UFC/g) foi menor se comparada ao qPCR com PMA (9,75 log UFC/g) ($p < 0,05$) e para a fase entérica I da formulação EA 20:80, em que a quantificação pelo método convencional (6,13 log UFC/g) se mostrou superior ao qPCR com PMA (5,53 log UFC/g) ($p < 0,05$). A diferença nas contagens apresentadas para a formulação EA 40:60 pode ser devido à presença de células viáveis e não cultiváveis, mas que podem se restabelecerem por meio de reparos em seus mecanismos de reposta ao meio em que se encontram (DAVIS, 2014).

Dessa forma, houve uma correlação positiva entre os métodos de semeadura e de qPCR com tratamento PMA, para avaliação da cepa Bb-12, apresentando coeficiente de correlação de Pearson de 0,92 e 0,97 para EA 40:60 e EA 20:80, respectivamente. Os resultados obtidos no presente estudo sobre a efetividade do uso de qPCR com tratamento PMA corroboram com os demais estudos (NOCKER et al., 2006; ANDORRÀ et al., 2010; FUJIMOTO & WATANABE, 2013), uma vez que o PMA penetra apenas das células injuriadas, impedindo que ocorra a amplificação do DNA de células mortas.

Ao comparar ambas as emulsões alimentícias durante a fase inicial, para o método convencional, não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Para as demais fases do ensaio *in vitro*, gástrica e entérica II, a formulação EA 40:60 apresentou valores superiores de 0,53 e 0,98 log UFC/g, respectivamente, comparada à EA 20:80. As populações obtidas para a formulação EA 40:60 durante o método qPCR com PMA foram maiores do que na formulação EA 20:80, com exceção apenas para a fase entérica II em que a viabilidade não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$).

Desta forma, a partir dos resultados obtidos por qPCR com tratamento PMA, pôde-se observar que a formulação EA 40:60 forneceu maior proteção e estabilidade às populações de *B. animalis* Bb-12, quando comparados à formulação EA 20:80. Possivelmente, a gordura do leite em maior proporção auxiliou na obtenção de resultados mais favoráveis. Isto porque a quantidade diversificada de triacilgliceróis que compõe a gordura do leite a leva a ter um comportamento de fusão complexo, ocorrendo, assim, uma fusão gradual da rede cristalina lipídica presente na emulsão alimentícia (GERMAN & DILLARD, 1998). Dessa forma, a exposição das bifidobactérias aos sucos gástrico, pancreático e a bile tornou-se mais lenta.

Assim como no presente estudo, GARCÍA-CAYUELA et al. (2009) também observaram correlação entre os métodos de semeadura em ágar seletivo e de qPCR com PMA durante 28 dias e após expirado o período de armazenamento de leites fermentados comerciais. Já no estudo de VILLARREAL et al. (2013) houve discrepância maiores que 1 ciclo logaritmo entre os métodos de cultivo nas contagens de *B. animalis* e de *L. acidophilus* em queijos *petit-suisse*. Segundo os autores, em condições em que há estresse celular bacteriano, o uso de métodos de semeadura convencional não pode fornecer ferramentas confiáveis para o monitoramento da população bacteriana.

No entanto, ao contrário do observado no estudo anteriormente citado, o teor lipídico da emulsão alimentícia protegeu os micro-organismos probióticos, estando estes viáveis para o cultivo através da semeadura em ágar seletivo, mostrando que este método foi adequado para avaliar a viabilidade e sobrevivência *in vitro* de Bb-12 ao longo do período de armazenamento da emulsão alimentícia. Nesse sentido, a escolha do método para a quantificação de micro-organismos probióticos a ser aplicado deve ser meticulosa, levando-se em consideração o estado fisiológico da população bacteriana e os principais objetivos do estudo.

4. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que em ambas as formulações de emulsão alimentícia apresentaram populações satisfatórias de *B. animalis* Bb-12, com valores entre 8 e 9 log UFC/g durante os 28 dias de armazenamento refrigerado e as diferentes proporções de gordura do leite e oleína de palma não afetaram a viabilidade do micro-organismo probiótico. No entanto, o maior teor de gordura do leite na formulação EA 40:60 proporcionou melhor proteção ao micro-organismo durante o ensaio de sobrevivência *in vitro*. Houve correlação

positiva entre os métodos de semeadura convencional e de qPCR com tratamento PMA, uma vez que os valores de células viáveis de Bb-12 foram semelhantes em ambos os métodos. Desta forma, considerando-se os resultados obtidos no presente estudo, a formulação EA 40:60 mostrou ser a melhor matriz alimentícia para o emprego de *B. animalis* Bb-12, uma vez que apresentou melhor viabilidade e maior sobrevivência durante o período avaliado. Mais estudos são necessários para avaliar se o teor lipídico e diferentes óleos e gorduras utilizados nas bases gordurosas para a produção de emulsões A/O podem influenciar na tolerância dos micro-organismos probióticos aos ensaios gastrointestinais simulados.

5. REFERÊNCIAS

- ABU-GHANNAM, N.; RAJAURIA, G. Non-dairy probiotic product. P.356-374. In: FOERST, P. SANTIVARANGKNA, C. **Advances probiotic technology**. 1^oed. United States of America: CRC Press Taylor & Francis Group, 2015.
- ANDORRÀ, I.; ESTEVE-ZARZOSO, B.; GUILLAMÓN, J.M.; MAS, A. Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, p.257-262, 2010.
- ANDRIANTSOANIRINA, V.; ALLANO, S.; BUTEL, M.J.; AIRES, J. Tolerance of *Bifidobacterium* human isolates to bile, acid and oxygen. **Anaerobe**, v.21, p.39-42, 2013.
- ALP, G.; ASLIM, B. Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium* spp. isolated from infants feces and breast milk. **Anaerobe**, v.16, n.2, p.101-105, 2010.
- BEDANI, R.; ROSSI, E.A.; SAAD, S.M.I. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v.34, n.2, p.382-389, 2013.
- BEDANI, R.; VIEIRA, A.D.S.; ROSSI, E.A.; SAAD, S.M.I. Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to in vitro gastrointestinal stress in synbiotic soy yogurt with okara during storage. **Food Science and Technology**, v.55, n.2, p.436-443, 2014.
- BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em 09 de novembro de 2015.
- BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003**. Aprova Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d12c9e804745947f9bf0df3fbc4c6735/RDC_359.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 15 de dezembro de 2015.

- BROEK, L.A.M. van den.; HINZ, S.W.A.; BELDMAN, G.; WINCKEN, J.P.; VORAGEN, A.G.J. Bifidobacterium carbohydrases-their role in breakdown and synthesis of (potential) prebiotics. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.52, n.1, p.146-163, 2008.
- BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I.; Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotics guava mousses and its survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.137, p.121-129, 2010.
- CASAROTTI, S.N.; TODOROV, S.D.; PENNA, A.L.B. Effect of different matrices on probiotic resistance to *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Dairy Technology**, v.68, n.4, p.595-601, 2015.
- CHAMPAGNE, C.P.; ROSS, R.P.; SAARELA, M.; HANSEN, K.F.; CHARALAMPOPOULOS, D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**, v.149, n.3, p.185-193, 2011.
- CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, n.5, p.759-768, 1998.
- CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Edible table (bio)spread containing potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species. **International Journal of Dairy Technology**, v.55, n.1, p.44-56, 2002.
- COLLADO, M.C.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; SANZ, Y. The impact of probiotic on gut health. **Current Drug Metabolism**, v.10, n.1, p.68-78, 2009.
- DAVIS, C. Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v.103, p.9-17, 2014.
- DELAMARRE, S.; BATT, C.A. The microbiology and historical safety of margarine. **Food Microbiology**, v.16, n.4, p.327-333, 1999.
- DERRIEN, M.; VLIEG, J.E.T.H. Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. **Trends in Microbiology**, v.23, n.6, p.354-366, 2015.
- ESPÍRITO SANTO, A.P.; SILVA, R.C.; SOARES, F.A.S.M.; ANJOS, D.; GIOIELLI, L.A.; OLIVEIRA, M.N. Açai pulp addition improves fatty acid profile and probiotic viability in yoghurt. **International Dairy Journal**, v.10, n.6, p.415-422, 2010.
- GARCÍA-CAYUELA, T.; TABASCO, R.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using Propidium Monoazide and real-time PCR. **International Dairy Journal**, v.19, n.6-7, p.405-409, 2009.
- GERMAN, J.B.; DILLARD, C.J. Fractionated milk fat: Composition, structure and functional properties. **Food Technology**, Chicago, v.52, n.2, p.33-38, 1998.
- GHOSH, S.; ROUSSEAU, D. Fat crystals and water-in-oil emulsion stability. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.16, p.421-431, 2011.
- GUO, Z.; WANG, J.; YAN, L.; CHEN, W.; LIU, X.M.; ZHANG, H.P. *In vitro* comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic with selected probiotic strains. **LWT – Food Science and Technology**, v.42, p.1640-1646, 2009.

- HAIGHTON, A.J. Blending, chilling, and tempering of margarines and shortenings. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v.53, n.6, p.397-399, 1976.
- JIN, J.; ZHANG, B.; GUO, H.; CUI, J.; JIANG, L.; SONG, S.; SUN, M. REN, F. Mechanism analysis of acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BBMN 68 by gene expression profile using RNA-sequencing. **PLOS one**, v.7, n.12, p.1-18, 2012.
- KIM, S.Y.; KO, G. Using propidium monoazide to distinguish between viable and nonviable bacteria, MS2 and murine norovirus. **Letters in Applied Microbiology**, v.55, n.3, p.182-188, 2012.
- KLU, Y.A.K.; CHEN, J. Effect of peanut butter matrices on the fate of probiotics during simulated gastrointestinal passage. **Food Science and Technology**, v.62, n.2, p.983-988, 2015.
- LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carries food. **International Dairy Journal**, v.11, n.1-2, p.1-17, 2001.
- MADUREIRA, R.A.; AMORIM, M.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Protective effect of the whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v.44, n.1, p.465-470, 2011.
- MATIAS, N.S.; BEDANI, R.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. A probiotic soy-based innovative product as an alternative to petit-suisse cheese. **LWT – Food Science and Technology**, v.59, n.1, p.411-417, 2014.
- MATSUMOTO, M.; OHISHI, H.; BENNO, Y. H⁺ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. **International Journal of Food Microbiology**, v.93, n.1, p.109-113, 2004.
- MÄTTÖ, J.; ALAKOMI, H.L.; VAARI, A.; VIRKAJÄRVI, I.; SAARELA, M. Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. **International Dairy Journal**, v.16, n.9, p.1029-1037, 2006.
- MRIDULA, D.; SHARMA, M. Development of non-dairy drink utilizing sprouted cereals, legume and soymilk. **Food Science and Technology**, v.62, n.2, p.482-487, 2015.
- NABAVI, S.; RAFRAF, M.; SOMI, M.H.; HOMAYOUNI-RAD, A.; ASGHARI-JAFARABADI, M. Effects of probiotic yogurt consumption on metabolic factors in individuals with nonalcoholic fatty liver disease, **Journal of Dairy Science**, v.97, n.12, p.7386-7393, 2014.
- NOCKER, A.; CHEUNG, C.Y.; CAMPER, A.K. Comparison of *Propidium Monoazide* with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. **Journal of Microbiological Methods**, v.67, n.2, p.310-320, 2006.
- O'MAHONY, L.; MCCARTHY, J.; KELLY, P.; HURLEY, G.; LUO, F.; CHEN, K.; O'SULLIVAN, G. C.; KIELY, B.; COLLINS, J. K.; SHANAHAN, F.; QUIGLEY, E.M.M. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in Irritable Bowel Syndrome: Symptom Responses and Relationship to Cytokine Profiles. **Gastroenterology**, v.128, n.3, p.541-551, 2005.
- OUWEHAND, A.C.; KURVINEN, T.; RISSANEN, P. Use of a probiotic *Bifidobacterium* in a dry food matrix, an *in vivo* study. **International Journal of Food Microbiology**, v.95, n.1, p.103-106, 2004.

- PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v.22, n.3, p.189-259, 2004.
- PEDROZO, D.D.L.; THOMAZINI, M.; HEINEMANN, R.J.B.; FAVARO-TRINDADE, C.S. Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. **International Dairy Journal**, v.26, p.127-132, 2012.
- PITINO, I.; RANDAZZO, C.L.; CROSS, K.L.; PARKER, M.L.; BISIGNANO, C.; WICKHAM, M.S.J.; MANDALARI, G.; CAGGIA, C. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains inoculated in cheese matrix during simulated human digestion. **Food Microbiology**, v.31, n.1, p.57-63, 2012.
- RANADHEERA, C.S.; EVANS, C.A.; ADAMS, M.C.; BAINES, S.K. *In vitro* analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Reserch International**, v.49, n.2, p.619-625, 2012.
- REBRIKOV, D.V.; TROFIMOV, D.Y. Real-time PCR: A review of approaches to data analysis. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.42, n.5, p.455-463, 2006.
- RIZZARDINI, G.; ESKESEN, D.; CALDER, P.C.; CAPETTI, A.; JESPERSEN, L.; CLERICI, M. Evaluation of the immune benefits of two probiotic strains *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, Bb-12 and *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *L. casei* 431 in an influenza vaccination model: A randomised, double-blind, placebo-controlled study. **British Journal of Nutrition**, v.107, n.6, p.876-884, 2012.
- ROBERFROID, M. Prebiotics: The concept revisited. **The Journal of Nutrition**, v.137, n.3, p.8305-8375, 2007.
- RUAS-MADIEDO, P.; GUEIMONDE, M.; ARIGONI, F.; REYES-GAVILÁN, C.G.D.L.; MARGOLLES, A. Bile affects the synthesis of exopolysaccharides by *Bifidobacterium animalis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.4, p.1204-1207, 2009.
- RUAS-MADIEDO, P.; HERNÁNDEZ-BARRANCO, A.; MARGOLLES, A.; REYES-GAVILÁN, C.G.D.L. A bile salt resistant derivative of *Bifidobacterium animalis* has an altered fermentation pattern when grown on glucose and maltose. **Applied and Environmental Microbiology**, n.71, n.11, p.6564-6570, 2005.
- SÁNCHEZ, B.; CHAMPOMIER-VERGES, M.C.; ANGLADE, P.; BARAIGE, F.; DE LOS REYES-GAVILAN, C.G.; MARGOLLES, A. Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809. **Journal of Bacteriology**, v.187, n.16, p.5799-5808, 2005.
- SHARMA, M.; DEVI, M. Probiotics: A comprehensive approach toward health foods. **Critical reviews in food science and nutrition**, v.54, n.4, p.537-552, 2014.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R.; OKAZAKI, M.M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela. 3ªed. 2007. 536p.
- SOUZA, C.H.B. **Desenvolvimento de margarina probiótica e simbiótica: viabilidade do probiótico no produto e resistência *in vitro***. 2010. 208 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, Área de Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.
- TAIPALE, T.; PIENIHÄKKINEN, K.; ISOLAURI, E.; LARSEN, C.; BROCKMANN, E.; ALANEN, P.; JOKELA, J.; SÖDERLING, E. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 in reducing the risk of infections in infancy. **British Journal of Nutrition**, v.105, n.3, p.409-416, 2011.

- TAMIME, A.Y. Fermented milks: a historical food with modern applications – a review. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.56, n.4, p.2-15, 2002.
- TOJO, R.; SUÁREZ, A.; CLEMENT, M.G.; REYES-GAVILÁN, C.G.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M.; RUAS-MADIEDO, P. Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis. **World Journal of Gastroenterology**, v.20, n.41, p.15163-15176, 2014.
- VERRIPS, C.T.; ZAALBERG, J. The intrinsic microbial stability of water-in-oil emulsions. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.10, n.3, p.187-196, 1980.
- VILLARREAL, M.L.M.; PADILHA, M.; VIEIRA, A.D.S.; FRANCO, B.D.G.M.; MARTINEZ, R.C.R.; SAAD, S.M.I. Advantageous direct quantification of viable closely related probiotics in petit-suisse cheeses under *in vitro* gastrointestinal conditions by Propidium Monoazide - qPCR. **PLOS ONE**, v.8, n.12, p.1-11, 2013.
- VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Enumeration of *L. casei* in the presence of *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v.10, n.4, p.271-275, 2000.
- VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative *in vitro* study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, v.36, n.9-10, p.895-904, 2003.
- VRESE, M.; KRISTEN, H.; RAUTENBERG, P.; LAUE, C.; SCHREZENMEIR, J. Probiotic lactobacilli and bifidobacteria in a fermented milk product with added fruit preparation reduce antibiotic associated diarrhea and *Helicobacter pylori* activity. **Journal of Dairy Research**, v.78, n.4, p.396-403, 2011.
- WANG, J.; GUO, Z.; ZHANG, Q.; YAN, L.; CHEN, W.; LIU, X.M.; ZHANG, H.P. Fermentation characteristics and transit tolerance of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang in soymilk and bovine milk during storage. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.6, p.2468-2476, 2009.
- YADAV, H.; JAIN, S.; SINHA, P.R. Production of free fatty acid and conjugated linoleic acid in probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* during fermentation and storage. **International Dairy Journal**, v.17, n.8, p.1006–1010, 2010.
- YONEJIMA, Y.; HISA, K.; KAWAGUCHI, M.; ASHITANI, H.; KOYAMA, T.; USAMIKRANK, Y.; KISHIDA, N.; KISHINO, S.; OGAWA, J. Lactic acid bacteria-containing chocolate as a practical probiotic with increased acid tolerance. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.4, n.4, p.773-777, 2015.

CONCLUSÕES GERAIS DO TRABALHO

No presente estudo, foi possível avaliar a composição físico-química e o comportamento térmico de misturas simples produzidas a partir de gordura do leite (GL) e oleína de palma (OP), para que posteriormente se selecionasse as misturas mais adequadas para a obtenção de uma emulsão alimentícia probiótica, adicionada de inulina e caseinomacropéptido (CMP) e da cepa probiótica *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12.

Baseado nos resultados deste estudo, EA 40:60 pode ser considerada a melhor formulação, pois se encaixa na maioria das características desejáveis, como boa aceitação sensorial, melhores parâmetros tecnológicos de consistência, composição em ácidos graxos e de comportamento de cristalização e fusão. Além da boa viabilidade de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 durante o período de 28 dias de armazenamento e maior sobrevivência deste micro-organismo, comparado à formulação EA 20:80, quando submetido às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*. Ademais, a formulação EA 40:60 quando analisada por meio de qPCR com tratamento PMA, demonstrou um maior efeito protetor sobre a cepa probiótica. Desta forma, a gordura do leite aliada aos ingredientes inulina e caseinomacropéptido, associados em uma mesma formulação, reforçam a possibilidade de se desenvolver uma emulsão alimentícia com ingredientes diferenciados, com sabor agradável próximo ao de manteiga e conferir benefícios à saúde pela cepa probiótica *B. animalis* Bb-12.

**ANEXOS****ANEXO I****Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado**

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

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

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

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

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

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

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

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

São Paulo, 23 de maio de 2014.
Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

ANEXO II

Parecer Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Aprimoramento das características sensoriais de margarina probiótica e avaliação de seu potencial funcional.

Pesquisador: Susana Marta Isay Saad

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 40426115.5.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 959.264

Data da Relatoria: 23/03/2015

Apresentação do Projeto:

O presente trabalho tem por objetivo melhorar as características sensoriais de uma margarina probiótica previamente desenvolvida pelo grupo de pesquisa, elaborada com a cepa probiótica *Bifidobacterium animalis* Bb-12, inulina e concentrado de caseína (caseinamacropeptídeo – CMP), bem como caracterizar e avaliar a aceitabilidade do produto sob o ponto de vista sensorial, suas características físico-químicas e de textura instrumental, durante seu armazenamento refrigerado, e verificar a viabilidade da cepa probiótica incorporada à margarina e a sua sobrevivência *in vitro* a condições que simulam o trato gastrointestinal. Serão preparadas 6 misturas binárias de gordura do leite (x1) e oleína de palma (x2) em diferentes proporções, sendo que duas amostras representarão os componentes isoladamente e quatro serão formadas por misturas binárias. Entre essas 6 amostras, serão selecionadas 2 bases gordurosas para a produção de margarinas contendo cultura probiótica *Bifidobacterium animalis* Bb-12, inulina (2%) e concentrado de caseína (1%). A seleção dessas bases será feita pela comparação de seus perfis de fusão com perfis de bases gordurosas que compõem margarinas comerciais, de acordo com a literatura. Para a caracterização das bases gordurosas, serão determinados o índice de acidez por titulação, a composição em ácidos graxos por cromatografia gasosa, a consistência por análise de textura e os comportamentos de

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepfci@usp.br

 A parte de imagem com identificação de relação r1855 não foi encontrada no arquivo.



FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 959.264

probiótica de *Bifidobacterium animalis* Bb-12 incorporada à margarina e sua resistência às condições gástricas e entéricas simuladas in vitro no produto durante o seu armazenamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não foram encontradas evidências de risco ou desconforto relacionado à análise sensorial em estudos deste tipo, com alimentos contendo microorganismos que contribuem para função intestinal e fibras alimentares solúveis nas proporções adicionadas à este produto. Os demais ingredientes são reconhecidamente seguros, os possíveis desconfortos são mínimos.

Benefícios:

Os participantes estarão contribuindo de forma voluntária para o desenvolvimento de uma dissertação de mestrado que contribuirá para o desenvolvimento de um produto que poderá promover efeitos benéficos aos consumidores através de ingredientes bioativos (possuem funções específicas) que irá contribuir para melhorar a qualidade de vida e bem-estar da população.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto trata de uma análise sensorial de uma margarina probiótica contendo cultura probiótica *Bifidobacterium animalis* Bb-12, com a adição de inulina (2%) e concentrado de caseína (1%). Está bem escrito e embasado em literatura da área tendo uma proposta de melhorar o produto pela introdução de elementos que possam promover um efeito benéfico aos consumidores. É uma das linhas de pesquisa da proponente que tem desenvolvido outros projetos similares.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE está dentro dos padrões para este tipo de estudo sensorial, é escrito sob forma de convite ao participante de pesquisa, deixando claro a sua participação voluntária e sigilosa. Estão presentes os procedimentos e responsabilidades em caso de qualquer desconforto do participante.

Recomendações:

Recomenda-se a aprovação do projeto de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepfci@usp.br



FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 959.264

Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEP entende que o projeto pode ser aprovado.

SAO PAULO, 23 de Fevereiro de 2015

Assinado por:
Mauricio Yonamine
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepfc@usp.br

ANEXO III

Ficha do Aluno

about:blank

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9133 - 8868649/1 - Clara Simone dos Santos

Email: santosclara@usp.br
Data de Nascimento: 02/11/1990
Cédula de Identidade: RG - 47.220.733-7 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Nutrição - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade Presbiteriana Mackenzie - São Paulo - Brasil - 2013

Curso: Mestrado
Programa: Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área: Tecnologia de Alimentos
Data de Matrícula: 31/01/2014
Início da Contagem de Prazo: 31/01/2014
Data Limite para o Depósito: 01/08/2016
Orientador: Prof(a). Dr(a). Susana Marta Isay Saad - 31/01/2014 até o presente. Email: susaad@usp.br
Co-orientador: Prof(a). Dr(a). Juliana Neves Rodrigues Ract - 12/11/2014 até o presente. Email: julianaract@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 31/01/2014
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 13/03/2015
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 31/01/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 01/02/2016
Impresso em: 08/03/2016 08:42:06

about:blank

Janus - Sistema Administrativo de Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9133 - 8868649/1 - Clara Simone dos Santos

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBT5787-1/3	Aplicação Biotecnológica de Bactérias Láticas	04/03/2014	07/04/2014	45	3	100	A	N	Concluída
FBA5699-2/3	Biodisponibilidade de Nutrientes e de Substâncias Bioativas em Alimentos e Dietas	10/03/2014	20/04/2014	90	6	92	A	N	Concluída
EDM5791-8/1	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	03/09/2014	120	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
VPS5717-5/3	Preparação Pedagógica (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	09/05/2014	17/07/2014	30	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBT5773-7/4	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	04/08/2014	12/10/2014	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5728-3/10	Aprimoramento Didático	19/08/2014	15/09/2014	60	4	100	A	N	Concluída
FBT5735-7/1	Modificação Industrial de Óleos e Gorduras	02/10/2014	05/11/2014	75	5	100	A	N	Concluída
FBT5708-1/3	Cristalização Aplicada a Fármacos e Alimentos	20/10/2014	23/11/2014	45	3	100	A	N	Concluída
FBT5781-4/2	Culturas Probióticas: Aplicações Tecnológicas	21/10/2014	13/11/2014	60	4	100	B	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	27
Estágios:			
Total:	0	25	27

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 01/02/2016

Impresso em: 08/03/2016 08:42:06