UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Alimentos

Desenvolvimento de margarina probiótica e simbiótica: viabilidade do
probiótico no produto e resistência *in vitro*

Cínthia Hoch Batista de Souza

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad
Co-Orientador:
Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli

São Paulo
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Alimentos

Desenvolvimento de margarina probiótica e simbiótica: viabilidade do
probiótico no produto e resistência *in vitro*

Cíntia Hoch Batista de Souza

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad
Co-Orientador:
Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli

São Paulo
2010

Cíntia Hoch Batista de Souza

Desenvolvimento de margarina probiótica e simbiótica: viabilidade do probiótico no
produto e resistência *in vitro*

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

orientador/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, _____ de 2010.

Dedicatória

À minha amada família e ao Mário, meu amor

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me guiou, me dando força e coragem, que muito me ajudaram durante essa longa caminhada.

À minha querida família, pelo apoio incondicional em todas as fases de minha vida e por todo amor dedicado a mim. Obrigada por estarem sempre de acordo com minhas escolhas e dispostos a me auxiliar.

À minha avô, Elizene, pelas orações e pelas longas conversas, repletas de palavras de fé e positivismo. A você e ao vô Cido, meus eternos agradecimentos por tudo que fizeram por mim.

Ao Mário, por sua compreensão e carinho sem medida e por todo apoio durante longos anos de minha vida acadêmica. Você foi o suporte afetivo que proporcionou a tranquilidade necessária para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad, por acreditar no meu trabalho e no meu potencial. Obrigada por toda atenção e por não medir esforços para me auxiliar durante todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli, por toda confiança depositada em mim e no meu trabalho, e por toda paciência, auxílio e ensinamentos transmitidos durante a realização deste trabalho.

À amiga Dra. Roberta Claro da Silva, por toda amizade e o importante auxílio nas análises relacionadas aos lipídios.

À estagiária de iniciação científica Regina Célia, que não mediu esforços para me auxiliar na execução dos ensaios de resistência *in vitro* e na análise sensorial.

Às estagiárias de iniciação científica Marcia Hazzan e Isabele Renata Capacla, pelo auxílio nas análises de DSC.

À Profa. Inar Alves de Castro pelo direcionamento na realização das análises estatísticas.

Aos meus amigos, sempre presentes, me apoiando e auxiliando, André, Luquinhas, Chuei e Raquel. Obrigada por todo carinho, convivência e conselhos.

Aos colegas do departamento pela convivência e auxílio.

Ao técnico Alexandre Mariani, pelo auxílio na realização de análises e pelas discussões técnicas, indispensáveis durante todo meu doutorado.

A todos os demais funcionários do departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, aos secretários da pós-graduação Jorge e Elaine, aos funcionários da informática, Márcio, Auriluce e Renato, pelo suporte técnico.

À FAPESP, pelo apoio financeiro (Bolsa e Auxílio à Pesquisa, processos nº 06/54843-5 e 07/59260-0)

À CAPES, pelo apoio financeiro (PROAP) e ao CNPq, pela bolsa concedida no início do doutorado.

À *Federation of European Microbiological Societies* (FEMS) pela concessão da *FEMS Young Scientist Meeting Grant* (YSMG), para a participação no IX *Symposium on Lactic Acid Bacteria*, realizado em Egmond aan Zee, Holanda, em 2008.

Às empresas Agropalma, Kerry Bio-Science, DSM, Danisco, Fortitech, Purac Sínteses, Orafti e Arla Foods, pelo fornecimento de parte dos ingredientes utilizados neste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a finalização deste trabalho.

Para sonhar o que poucos ousaram sonhar.
Para realizar aquilo que já te disseram que não podia ser feito.
Para alcançar a estrela inalcançável.
Para isso tu tens uma única tarefa.
Essa será a tua tarefa: alcançar essa estrela.

RESUMO

Souza, C.H.B. **Desenvolvimento de margarina probiótica e simbiótica: viabilidade do probiótico no produto e resistência *in vitro***. 2010. 208p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O presente trabalho teve como objetivo verificar a viabilidade da cepa probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 incorporado em margarina, suplementada com inulina, concentrado protéico de soro (WPC) e concentrado de caseína (CMP), bem como avaliar as características do produto e a resistência do probiótico às condições simuladas do trato gastrointestinal humano. Foram produzidos 7 diferentes tipos de margarinas de mesa (60% de lipídios: 60 % de óleo de palma + 40% de óleo de canola), empregando-se um modelo de mistura, onde inulina, WPC e CMP foram as variáveis estudadas. Uma formulação controle foi produzida (M8), sem adição desses ingredientes. A utilização da mistura do óleo de palma com óleo de canola favoreceu nutricionalmente as formulações, fornecendo produtos contendo ácidos graxos essenciais em sua composição e ausência de ácidos graxos *trans*. As formulações M1 a M7, exceto a formulação M2 após o 21º dia de armazenamento, apresentaram populações satisfatórias de Bb-12 para um alimento probiótico, com populações acima de 6 log UFC/g durante 35 dias de armazenamento. Margarinas suplementadas com inulina apresentaram populações satisfatórias durante todo o armazenamento, atingindo populações de 8,01 log UFC/g ao 35º dia (M1). Além disso, M3 e M6, revelaram populações de Bb-12 de 6,87 log UFC/g e 7,27 log UFC/g (dia 35), respectivamente. Por outro lado, M8 não foi caracterizada como margarina probiótica, uma vez que apresentou populações abaixo de 6 log UFC/g, já ao 1º dia de armazenamento. Embora WPC seja utilizado em pesquisas para aumentar a viabilidade de probióticos em alimentos, a suplementação de margarina com WPC sem inulina ou CMP não resultou em populações satisfatórias de Bb-12, apresentando decréscimo de 7,82 (dia 1) para 4,64 log UFC/g (M2, dia 35) ($p < 0,05$). Durante todo o ensaio de resistência *in vitro*, Bb-12 apresentou sobrevivência significativamente superior ($p < 0,05$) em M1 e revelou populações acima de 6 log UFC/g após 6h de ensaio mesmo ao 28º dia. As populações observadas para M2 diminuíram drasticamente durante o ensaio *in vitro* (5 log UFC/g após 2h no dia 7). Para as outras formulações, as populações de Bb-12 diminuíram 2 log UFC/g após 2h de ensaio *in vitro*. Entretanto, M1, M2 e M5 (dias 14 e 28) revelaram aumento significativo nas populações de Bb-12 ($p < 0,05$) entre a fase gástrica (2h) e a segunda fase entérica (6h). As margarinas suplementadas com inulina, principalmente M1, revelaram decréscimo significativo no pH durante todo o armazenamento ($p < 0,05$). Entretanto, isto não afetou a qualidade sensorial dos produtos, uma vez que não foram detectadas diferenças significativas entre as formulações após 7 e 14 dias de armazenamento ($p > 0,05$). A suplementação de margarina com inulina e CMP garantiu populações apropriadas de Bb-12 durante o armazenamento estudado pelo menos até o 28º dia. Além disso, contribuiu para sua sobrevivência durante o ensaio de resistência *in vitro*. Os resultados revelaram que a margarina apresenta-se como uma matriz alimentar adequada para administração de Bb-12, principalmente quando a inulina foi adicionada.

Palavras chaves: Margarina. *Bifidobacterium*. Probiótico. Simbiótico. Inulina. WPC.

ABSTRACT

Souza, C.H.B. **Development of probiotic and synbiotic margarine: viability of probiotic in the product and *in vitro* resistance.** 2010. 208p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

This study aimed to determine the viability of probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 incorporated in margarine, with inulin, whey protein concentrate (WPC) and caseinomacropeptide (CMP) supplementation. In addition, the *in vitro* resistance of Bb-12 incorporated in margarine and related properties were evaluated. Seven margarine-making trials (60% of fat: 60% of palm oil +40% canola oil) were produced, using a mixture model, where inulin, WPC and CMP were the variables studied. Also, a control formulation without these ingredients was manufactured. The use of blending palm oil with canola oil improved the margarine formulations nutritionally, providing products containing essential fatty acids in its composition and absence of *trans* fatty acids. The formulations M1 to M7, except M2 after 21 days of storage, revealed satisfactory Bb-12 populations for a probiotic food, with counts above 6 log CFU/g during 35 days of storage at 5±1°C. Margarines supplemented with inulin presented suitable Bb-12 populations throughout the whole storage period, reaching up to 8 log CFU/g by the end of storage (M1). Also, M3 and M6, revealed Bb-12 populations of 6.87 log CFU/g and of 7.27 log CFU/g (day 35), respectively. In contrast, M8 was not characterized as probiotic margarine, since it showed Bb-12 populations below 6 log CFU/g on day 1. Even though whey protein is largely employed in probiotic foods, margarine supplementation with WPC without inulin or CMP did not lead to Bb-12 satisfactory populations, decreasing from 7.82 (day 1) to 4.64 log CFU/g (M2, day 35) ($p<0.05$). During the whole *in vitro* assays, Bb-12 survived significantly better ($p<0.05$) in M1 and revealed populations above 6 log CFU/g after 6h even after 28 days. M2 populations decreased drastically during the *in vitro* assays for all storage period tested (reduction of 5 log CFU/g after 2h of *in vitro* assays on day 7 and populations of 2.8 log CFU/g after 6h). For the other formulations, Bb-12 populations decreased 2 log CFU/g after 2h of the *in vitro* assays. However, for M1, M2 and M5 (on day 14 and 28) the populations of Bb-12 increased significantly ($p<0.05$) between the gastric phase (2h) and the enteric phase (6h). Formulations containing inulin, mainly M1, showed a significant decrease in pH values during the whole storage period ($p<0.05$). However, this ingredient did not affect the sensory quality of products, since no significant differences between formulations after 7 and 14 days of storage were observed ($p>0.05$). The supplementation of margarine with inulin and CMP guaranteed appropriate Bb-12 populations during storage for at least 28 days, and also contributed for its survival throughout the *in vitro* assays. Therefore, margarine might be considered an appropriate food matrix for Bb-12 survival, mainly when inulin is also added.

Keywords: Margarine. *Bifidobacterium*. Probiotics. Synbiotic. Inulin. WPC.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Delineamento experimental empregado na fabricação das margarinas.....	74
Tabela 2. Descrição das variáveis envolvidas na fabricação das margarinas.....	74
Tabela 3. Proporções dos ingredientes utilizados na formulação da margarina.....	77
Tabela 4. Populações de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 (média ± desvio padrão) obtidas para as margarinas M1 a M7 (emulsão) durante o processamento (dia 0) e após 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de armazenamento refrigerado (5±1°C).....	95
Tabela 5. Populações de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 (média ± desvio padrão) obtidas para as margarinas M1 a M7 (fase aquosa) durante o processamento (dia 0) e após 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de armazenamento refrigerado (5±1°C).....	96
Tabela 6. Coeficientes calculados por regressão múltipla, seus respectivos erros-padrão e intervalos de confiança (IC) de 95% obtidos para o modelo quadrático, a partir dos resultados experimentais de contagem do microrganismo probiótico <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 nas margarinas M1 a M7 (emulsão), ao 21º dia de armazenamento refrigerado (5±1°C).....	108
Tabela 7. Análise de variância obtida para o modelo quadrático, ajustado aos resultados experimentais de contagem do microrganismo probiótico <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 nas margarinas M1 a M7 (emulsão), ao 21º dia de armazenamento refrigerado (5±1°C).....	108
Tabela 8. Coeficientes calculados por regressão múltipla, seus respectivos erros-padrão e intervalos de confiança (IC) de 95% obtidos para o modelo quadrático, a partir dos resultados experimentais para sobrevivência de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 às condições simuladas <i>in vitro</i> do trato gastrintestinal humano, após 6 horas de ensaio ao 21º dia de armazenamento refrigerado (5±1°C) das margarinas M1 a M7.....	129
Tabela 9. Análise de variância obtida para o modelo linear, ajustado aos resultados experimentais obtidos para sobrevivência de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 às condições simuladas <i>in vitro</i> do trato gastrintestinal humano, após 6 horas de ensaio ao 21º dia de armazenamento refrigerado (5±1°C) das margarinas M1 a M7.....	130
Tabela 10. Valores de pH (média ± desvio padrão) obtidos para as margarinas T1 a T7, após 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de armazenamento refrigerado (5±1°C).....	134

Tabela 11. Coeficientes calculados por regressão múltipla, seus respectivos erros-padrão e intervalos de confiança (IC) de 95% obtidos para o modelo linear, a partir dos resultados experimentais de pH observados para as margarinas M1 a M7, ao 21º dia de armazenamento refrigerado ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$).....	137
Tabela 12. Análise de variância obtida para o modelo linear, ajustado aos resultados experimentais de pH observados para as margarinas M1 a M7, ao 21º dia de armazenamento refrigerado ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$).....	137
Tabela 13. Composição em ácidos graxos (% em massa) do óleo de palma, óleo de canola e mistura, utilizados na fabricação da margarina.....	140
Tabela 14. Teores de ácidos graxos na porção de margarina.....	143
Tabela 15. Classificação da consistência de gorduras, margarinas e <i>shortenings</i> , segundo o <i>yield value</i>	146
Tabela 16. Composição em triacilgliceróis da mistura (60% de óleo de palma + 40% de óleo de canola) antes e após a reação de interesterificação química.....	150
Tabela 17. Comparação dos dados de cristalização (média $\pm$ desvio padrão) para o óleo de palma, óleo de canola, mistura (60% palma + 40% canola), mistura interesterificada e água, obtidos por calorimetria diferencial de varredura.....	154
Tabela 18. Comparação dos dados de cristalização (média $\pm$ desvio padrão) das margarinas M1 a M7, obtidos por calorimetria diferencial de varredura.....	155
Tabela 19. Comparação dos dados de fusão (média $\pm$ desvio padrão) para óleo de palma, óleo de canola, mistura (60% palma + 40% canola), mistura interesterificada e água, obtidos por calorimetria diferencial de varredura.....	160
Tabela 20. Comparação dos dados de fusão (média $\pm$ desvio padrão) das margarinas M1 a M7, obtidos por calorimetria diferencial de varredura.....	161
Tabela 21. Média das notas (média $\pm$ desvio padrão)* obtidas na análise sensorial realizada após 7 e 14 dias de armazenamento refrigerado ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$) das margarinas M1 a M7.....	163

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais mecanismos de ação dos microrganismos probióticos envolvidos na promoção da saúde humana.....	27
Figura 2. Morfologia de bactérias pertencentes ao gênero <i>Bifidobacterium</i> spp.....	35
Figura 3. Comportamento da inulina como prebiótico no trato digestivo humano.....	43
Figura 4. Representação esquemática dos tipos de ácidos graxos: insaturado (monoinsaturado e poli-insaturado) e saturado.....	49
Figura 5. Esquema representativo das configurações <i>Cis</i> e <i>Trans</i>	50
Figura 6. Representação da estrutura de emulsões óleo em água e água em óleo.....	69
Figura 7. Micrografia ilustrando a estrutura da gordura cristalizada em margarina e representação física da estrutura da margarina.....	69
Figura 8. Inulina distribuída no interior dos glóbulos de água em uma emulsão água em óleo.....	71
Figura 9. Tecnologia utilizada na fabricação da margarina probiótica e simbiótica.....	76
Figura 10. Diagrama triangular representando um modelo de mistura de 3 componentes.....	94
Figura 11. Microscopia de margarina apresentando a matriz lipídica cristalizada sustentando o glóbulo de água.....	98
Figura 12. Diagrama triangular para a viabilidade de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 nas margarinas M1 a M7, ao 21º dia de armazenamento.....	110
Figura 13. Sobrevivência de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 nas margarinas M1 a M7 submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas <i>in vitro</i> , após 7 dias de armazenamento refrigerado (5±1°C).....	114
Figura 14. Sobrevivência de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 nas margarinas M1 a M7 submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas <i>in vitro</i> , após 14 dias de armazenamento refrigerado (5±1°C).....	115
Figura 15. Sobrevivência de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 nas margarinas M1 a M7 submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas <i>in vitro</i> , após 21 dias de armazenamento refrigerado (5±1°C).....	116
Figura 16. Sobrevivência de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 nas margarinas M1 a M7 submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas <i>in vitro</i> , após 28 dias de armazenamento refrigerado (5±1°C).....	117

Figura 17. Diagrama triangular para sobrevivência de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 nas margarinas M1 a M7, submetidas a ensaios de resistência <i>in vitro</i> às condições simuladas do trato gastrointestinal humano após 6 horas de ensaio no 21º dia de armazenamento refrigerado ($5\pm1^{\circ}\text{C}$).....	131
Figura 18. Diagrama triangular para valores de pH para as formulações de margarina M1 a M7 aos 21 dias de armazenamento refrigerado ($5\pm1^{\circ}\text{C}$).....	138
Figura 19. Valores do conteúdo de gordura sólida obtidos para as amostras de óleo de palma e mistura (60% de óleo de palma + 40% de óleo de canola), em função da temperatura.....	144
Figura 20. Consistência do óleo de palma e da mistura (60% de óleo de palma + 40% de óleo de canola) em função da temperatura, após 7 dias de armazenamento refrigerado ($5\pm1^{\circ}\text{C}$).....	145
Figura 21. Consistência das margarinas M1 a M7 em função da temperatura, após 7 dias de armazenamento refrigerado ($5\pm1^{\circ}\text{C}$).....	147
Figura 22. Consistência da mistura (60% de óleo de palma + 40% de óleo de canola) (M) comparada à mistura submetida ao processo de interesterificação química (MI) em função da temperatura, após 7 dias de armazenamento refrigerado ($5\pm1^{\circ}\text{C}$).....	149
Figura 23. Termograma com as curvas de cristalização ($10^{\circ}\text{C}/\text{min}$) do óleo de canola, óleo de palma, mistura (60% óleo de palma + 40% óleo de canola), mistura interesterificada e margarina (formulação M1).....	152
Figura 24. Termograma com as curvas de cristalização ($10^{\circ}\text{C}/\text{min}$) da margarina (formulação M1) e da água analisada isoladamente.....	153
Figura 25. Termograma com as curvas de fusão ($5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) do óleo de canola, óleo de palma, mistura (60% óleo de palma + 40% óleo de canola), mistura interesterificada e margarina (formulação M1).....	158
Figura 26. Termograma com as curvas de fusão ($5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) da margarina e da água analisada isoladamente.....	158
Figura 27. Frequência das notas obtidas na análise sensorial realizada após 7 dias de armazenamento refrigerado ($5\pm1^{\circ}\text{C}$) das margarinas M1 a M7.....	164
Figura 28. Frequência das notas obtidas na análise sensorial realizada após 14 dias de armazenamento refrigerado ($5\pm1^{\circ}\text{C}$) das margarinas M1 a M7.....	164

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOCS	American Oil Chemists' Society
Bb-12	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12
CLA	Ácido linoléico conjugado
CMP	Concentrado de caseína
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
DVS	Direct vat set
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FOS	Fruto-oligossacarídeos
GOS	Galacto-oligossacarídeos
GP	Grau de polimerização
GRAS	Generally recognised as safe
TGI	Trato gastrointestinal
TOS	Transgalacto-oligossacarídeos
UFC	Unidades formadoras de colônia
U.I.	Unidades internacionais
WHO	World Health Organization
WPC	Concentrado protéico de soro
x_1	inulina
x_2	WPC
x_3	CMP

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	18
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1.1. Os alimentos funcionais	20
1.2. Os alimentos funcionais probióticos, prebióticos e simbióticos.....	23
1.3. O gênero <i>Bifidobacterium</i> spp. e a cepa <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12	35
1.4. Prebióticos.....	40
1.4.1. Inulina	42
1.5. Concentrado protéico de soro (WPC), caseinomacropeptídeo (CMP) e a suplementação de produtos alimentícios	45
1.6. Óleos e gorduras	48
1.6.1. Lipídios e a saúde humana.....	49
1.6.2. Alterações nos processos tecnológicos visando à obtenção de produtos mais saudáveis.....	53
1.6.3. Óleo de canola e óleo de palma: importância na tecnologia de fabricação de margarinas e na saúde humana	55
1.6.4. Utilização de óleo de palma na fabricação de <i>spreads</i> : vantagens para a indústria de alimentos	57
1.7. Breve histórico: as modificações na produção industrial de margarinas visando produtos mais saudáveis	60
1.8. A suplementação de margarina visando à obtenção de produtos mais saudáveis.....	64
1.9. A margarina como produto alimentício em potencial para a administração de microrganismos probióticos.....	67
2. OBJETIVOS	72
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	73
3.1. Delineamento experimental	73

3.2. Fabricação da margarina	74
3.2.1. Preparo do inóculo contendo a cultura probiótica.....	74
3.2.2. Tecnologia empregada na fabricação da margarina probiótica e simbiótica	76
3.3. Análise microbiológica	79
3.3.1. Populações de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12	79
3.3.2. Bactérias indicadoras de contaminação - coliformes totais, <i>Escherichia coli</i> , bolores e leveduras	80
3.4. Avaliação <i>in vitro</i> da resistência da cultura probiótica de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 às condições gástrica e entérica simuladas durante o armazenamento dos produtos sob refrigeração a 5±1°C	80
3.5. Análises para a caracterização do produto	83
3.5.1. Composição em ácidos graxos.....	83
3.5.1.1. Cálculo dos teores de ácidos graxos na porção da margarina	83
3.5.2. Conteúdo de gordura sólida	84
3.5.3. Consistência	84
3.5.4. Interesterificação química	85
3.5.5. Composição em triacilgliceróis	86
3.5.6. Determinação do pH.....	87
3.5.7. Calorimetria diferencial de varredura – DSC	87
3.6. Análise sensorial.....	88
3.7. Análise estatística	89
4. RESULTADOS	94
4.1. Parâmetros microbiológicos.....	94
4.1.1. Viabilidade da bactéria probiótica	94
4.1.2. Bactérias indicadoras de contaminação - coliformes totais, <i>Escherichia coli</i> , bolores e leveduras	110

4.2. Sobrevivência de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 nas diferentes margarinas, quando submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas <i>in vitro</i>	112
4.3. Valores de pH	132
4.4. Análises para caracterização do produto	140
4.4.1. Composição em ácidos graxos da matéria-prima e cálculo dos teores de ácidos graxos na porção da margarina desenvolvida	140
4.4.2. Conteúdo de gordura sólida	143
4.4.3. Consistência	144
4.4.4. Calorimetria diferencial de varredura – DSC	151
4.5. Análise sensorial	162
5. CONCLUSÕES	166
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹	168
ANEXOS	200
I. Protocolo de Aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (OFÍCIO CEP Nº 133/2006)	201
II. Modelo de ficha utilizada na análise sensorial	202
III. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	203
IV. Tabela com o controle do pH durante cada etapa do ensaio de resistência <i>in vitro</i>: 0-2h: etapa gástrica, 2h-4h: 1ª etapa entérica (intestino delgado) e 4h-6h: 2ª etapa entérica (intestino grosso)	205
V. Ficha do aluno gerada pelo sistema Janus	206
VI. Informações para os membros de bancas julgadoras de Mestrado e Doutorado	208

INTRODUÇÃO

A procura por alimentos mais saudáveis e que possam resultar em benefícios à saúde do consumidor tem aumentado a cada ano, em virtude da ocorrência de doenças crônico-degenerativas e consequente aumento na conscientização dos consumidores com questões relacionadas à saúde e bem estar. Dentro desse grupo de alimentos benéficos, encontram-se os alimentos funcionais. Os alimentos funcionais podem ser subdivididos em diferentes grupos, dentre os quais destacam-se os alimentos probióticos, prebióticos e simbióticos.

Os alimentos probióticos são adicionados de microrganismos vivos, como *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* spp., que promovem efeitos benéficos à saúde humana, e os prebióticos são aqueles adicionados de ingredientes não digeríveis pelo trato gastrointestinal humano, como a inulina e os fruto-oligossacarídeos, que atuam seletivamente no cólon (principalmente) estimulando a multiplicação e atividade de bactérias benéficas endógenas. Os alimentos classificados como simbióticos são aqueles no quais culturas probióticas e ingredientes prebióticos estão combinados.

O desenvolvimento de alimentos probióticos, prebióticos e simbióticos durante a última década sinalizou um avanço importante na indústria de alimentos, que resultou na produção de novos alimentos funcionais. Os consumidores estão cada vez mais conscientes da importância da alimentação para uma boa saúde física e mental. Esse fato tem estimulado o desenvolvimento de novos alimentos que atendam às necessidades desse público, associando qualidade, boas características tecnológicas e a promoção da saúde, evitando o aparecimento de doenças, resultando, portanto, em um quadro de bem estar e saúde geral.

Tradicionalmente, os probióticos e prebióticos são adicionados a produtos lácteos, como queijos, leites fermentados e iogurtes. Entretanto, atualmente, existe

uma crescente demanda dos consumidores por produtos não lácteos que também sejam adicionados desses ingredientes. Tal procura se dá, em virtude de vários motivos diferentes, dentre eles a necessidade da diversificação dos produtos disponíveis, uma vez que tais alimentos devem ser consumidos com regularidade. Destaca-se, ainda, a impossibilidade de algumas pessoas consumirem os alimentos lácteos por algum tipo de problema, como a intolerância à lactose, por exemplo.

Nesse sentido, diversas pesquisas científicas têm sido desenvolvidas utilizando produtos, muitos deles não lácteos, como matriz alimentícia para o desenvolvimento de alimentos probióticos, prebióticos ou simbióticos. Dentre esses alimentos, destacam-se o extrato solúvel de soja fermentado, sorvete, chocolates, sobremesas (pudim, mousse e manjar), alimentos de origem vegetal fermentados, produtos cárneos, maçã minimamente processada, “queijo” de soja, diferentes tipos de sucos e bebidas, maionese, mingau de maisena, além de *table biospread* (alimentos a base de emulsão contendo microrganismos probióticos).

Assim, o desenvolvimento de margarina probiótica e simbiótica, apresenta-se como uma importante contribuição aos alimentos contendo probióticos e fibras prebióticas disponíveis para o consumidor.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Os alimentos funcionais

As pesquisas na área de nutrição, saúde e tecnologia de alimentos têm sido estimuladas, devido à grande preocupação da população mundial em relação à dieta, saúde, bem-estar e qualidade de vida. Tal fato se deu em virtude do maior conhecimento, por parte dos consumidores, sobre as doenças e os motivos que levam ao seu aparecimento, bem como o conhecimento sobre os possíveis efeitos benéficos da alimentação equilibrada e balanceada sobre a saúde. Aliado a esse fato, as indústrias de alimentos têm procurado desenvolver novas tecnologias, com o objetivo de suprir as necessidades do comércio, colocando novos produtos à disposição do consumidor. Esses produtos devem ser atrativos ao consumidor, resultando em efeitos positivos sobre a sua saúde.

Os alimentos têm como principal função fornecer os nutrientes necessários para uma alimentação balanceada. Além disso, podem beneficiar o organismo, auxiliando na promoção e melhora da saúde, como é o caso dos alimentos denominados funcionais.

O termo alimento funcional foi proposto pela primeira vez no Japão na década de 80, quando iniciou-se o desenvolvimento de pesquisas com alimentos fortificados com ingredientes especiais, ingredientes estes que contribuíam com efeitos fisiológicos positivos à saúde. Depois, em 1991, a denominação de alimento funcional foi legalmente aprovada, de acordo com o sistema “Alimento Destinado a Uso Específico de Saúde” (Food for Specific Health Use – FOSHU) (ROBERFROID, 2000; KWAK & JUKES, 2001; STANTON *et al.*, 2005). Entretanto, é importante ressaltar que as denominações das alegações funcionais, bem como os critérios para a sua aprovação variam de acordo com a regulamentação de cada país, sendo que a maioria dos países

possue suas próprias legislações regulatórias para alimentos funcionais (STRINGHETA *et al.*, 2007; FERGUSON, 2009).

Atualmente, alguns conceitos estão bem definidos para essa categoria de alimentos denominados funcionais: os alimentos funcionais devem permanecer em sua forma original (ou seja, alimentos) e devem demonstrar efeitos benéficos à saúde em quantidades normalmente ingeridas na dieta. Além disso, é importante destacar que os alimentos funcionais não são administrados na forma de pílulas, cápsulas ou ampolas, mas sim constituem parte da dieta habitual. Esse grupo de alimentos pode apresentar-se como um alimento natural ou como um alimento ao qual algum componente tenha sido adicionado (DIPLOCK *et al.*, 1999; ALZAMORA *et al.*, 2005). Assim, tais alimentos podem ser facilmente incorporados à dieta.

Em contraste, o termo nutracêutico não deve ser confundido com o termo alimento funcional. Os nutracêuticos possuem compostos bioativos independentemente da existência de uma matriz alimentar e são apresentados ao consumidor geralmente na forma de pílulas, ampolas ou cápsulas. Como exemplo, pode-se citar cápsulas contendo flavonóides ou ácido gama-linolênico (JONES, 2002). Igualmente, os alimentos funcionais não devem ser confundidos com medicamentos: os alimentos estão ligados à nutrição e são destinados à população em geral. Em contrapartida, os medicamentos estão ligados à área médica, têm como objetivo curar doenças e são receitados especificamente ao indivíduo doente (HASLER, 1998).

Portanto, em uma definição simples, pode-se dizer que os alimentos funcionais são alimentos (modificados ou não) semelhantes aos alimentos convencionais que, além de promoverem as funções nutricionais básicas, exercem efeitos benéficos à saúde do consumidor, efeitos esses úteis na manutenção da boa saúde física e mental, podendo auxiliar na redução do risco de aparecimento de doenças crônico-degenerativas (LAJOLO, 1999; BERGAMINI *et al.*, 2005; MICHIDA *et al.*, 2006).

O grupo de alimentos denominados “alimentos funcionais” compreendem diferentes tipos de alimentos, dentre eles, os alimentos probióticos, prebióticos e simbióticos (STANTON *et al.*, 2005; SHAH, 2007). Nos últimos anos, o conceito de alimentos funcionais passou a concentrar-se de maneira intensiva nos aditivos alimentares que podem exercer efeitos benéficos sobre a composição da microbiota intestinal humana. Os probióticos e os prebióticos são atualmente os aditivos alimentares que compõem esses alimentos funcionais (SAAD, 2006a).

Os consumidores tornam-se, a cada dia, mais conscientes da relação entre dieta e saúde. Por isso, a procura por dietas balanceadas e por produtos funcionais que concentrem benefícios à saúde tem aumentado constantemente. Alimentos considerados mais saudáveis podem ser caracterizados por vários atributos como, por exemplo, baixa concentração de sódio, baixa concentração de açúcar e livres de ácidos graxos *trans* (PALZER, 2009). Após o grande aumento na procura e consumo de alimentos *diet* e *light*, os alimentos funcionais passaram a receber maior atenção por parte dos consumidores, e conseqüentemente, da indústria. Com isso, a indústria de alimentos funcionais tem explorado, cada vez mais, novos processos e tecnologias, aumentando, assim, a diversidade de produtos alimentícios funcionais disponíveis para o consumo humano (SAARELA *et al.*, 2000; MICHIDA *et al.*, 2006), dentre os quais destacam-se os alimentos probióticos, prebióticos e simbióticos. No ano de 2008, estimou-se que o mercado mundial de alimentos funcionais estava próximo de 60 bilhões de dólares (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS PARA FINS ESPECIAIS E CONGÊNERES – ABIAD, 2008). Para o ano de 2013, estima-se que as vendas no mercado de alimentos funcionais ultrapasse a marca de 90 bilhões de dólares (JUST-FOOD, 2008).

Dentre os diversos tipos de alimentos com propriedades funcionais disponíveis para o consumo humano podem ser encontrados: cereais, produtos de panificação,

refeições prontas, produtos de confeitaria, produtos lácteos, petiscos, bebidas energéticas, produtos cárneos, sucos e margarinas (ALZAMORA *et al.*, 2005; BECEL, 2008; CHAMPAGNE *et al.*, 2008).

Esses alimentos funcionais são associados a diferentes tipos de benefícios à saúde, causados por seus ingredientes especiais, com foco principalmente em fortificações com vitaminas e minerais, capacidade de atuação na redução do colesterol através da adição de fitosteróis, propriedades antioxidantes, fonte de fibras, adição de ervas; além da adição de culturas probióticas e fibras prebióticas.

1.2. Os alimentos funcionais probióticos, prebióticos e simbióticos

Os alimentos podem ser modificados e, assim, tornarem-se funcionais. Um alimento funcional pode ser aquele submetido a algum tipo de alteração/modificação, que resulte em efeitos benéficos sobre a saúde do consumidor. A adição de microrganismos benéficos (não patogênicos) e/ou substâncias não digeríveis pelo trato gastrointestinal humano, capazes de estimular a multiplicação de microrganismos benéficos à saúde humana, é uma das maneiras como um alimento pode ser modificado para tornar-se “funcional”. Esses alimentos são denominados probióticos e prebióticos, respectivamente.

Os probióticos possuem uma longa história de uso. Os primeiros registros que relatam seu uso por humanos revelam a ingestão de bebidas contendo microrganismos probióticos (GIBSON, 2004). O desenvolvimento do conceito de probióticos é atribuído a Metchnikoff, após ter observado que o consumo de produtos como leites fermentados e iogurtes poderia reverter efeitos putrefativos causados por microrganismos patogênicos em humanos. Tal observação resultou em um importante impulso na fabricação e no consumo de iogurtes (STANTON *et al.*, 2005; SHAH, 2007).

Os probióticos eram classicamente definidos como “suplementos alimentares à base de microrganismos vivos que afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o balanço de sua microbiota intestinal” (FULLER, 1989). Diversas outras definições de probióticos foram publicadas nos últimos anos (SANDERS, 2003). Entretanto, a definição atualmente aceita internacionalmente é “probióticos são microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; SANDERS, 2003).

No entanto, para serem considerados probióticos e serem então, adicionados a alimentos, os microrganismos, além de atuarem favoravelmente no produto alimentício ao qual foram adicionados, devem atender aos seguintes requisitos: sobreviver à passagem através do trato gastrointestinal humano e também possuir a capacidade de se desenvolver no intestino humano. Isto significa que tais microrganismos devem resistir à ação do baixo pH encontrado no trato gastrointestinal humano (principalmente no estômago), suco gástrico e pancreático e à bile. Além disso, o microrganismo deve possuir capacidade de adesão às células intestinais do hospedeiro, ter origem na microbiota intestinal humana sadia, apresentar capacidade de estabilizar a microbiota intestinal, resistir à baixa atividade de água e possuir propriedades antigenotóxicas e não-patogênicas (GOLDIN, 1998; GUARNER *et al.*, 2005; MARAGKLOUDAKIS *et al.*, 2006; SHEEHAN *et al.*, 2007; KRAVTSOV *et al.*, 2008; MAI & DRAGANOV, 2009).

A função principal dos microrganismos probióticos é realizar a reposição da microbiota intestinal normal que pode ter sido desbalanceada devido à dieta, uso de medicamentos e/ou situações de estresse do hospedeiro (TESHIMA, 2003; RAO *et al.*, 2009).

O trato gastrointestinal humano possui uma ampla e dinâmica colonização. Esse ecossistema complexo é formado por mais de 500 diferentes espécies de bactérias. Essa microbiota residente compreende, em número, aproximadamente 95% do total de células do corpo humano e desempenha um importante papel na manutenção da saúde e na prevenção do aparecimento de doenças, ação esta que é alvo crescente de estudos científicos (KOLIDA *et al.*, 2002; VOROBJEVA, 2005; MAKRAS & VUYST, 2006; LAPARRA & SANZ, 2010). O intestino grosso possui um dinâmico ecossistema, com uma alta densidade de células vivas, chegando a atingir a concentração de 10^{10} - 10^{12} células por grama de conteúdo intestinal. Essas concentrações são similares às observadas em colônias que se multiplicam sob condições ótimas em laboratório (DEL PIANO *et al.*, 2006a).

A microbiota intestinal exerce influência importante sobre uma série de reações bioquímicas do hospedeiro e, quando em equilíbrio, impede que microrganismos potencialmente patogênicos presentes se multipliquem e exerçam seus efeitos patogênicos. As funções principais dessa microbiota natural do organismo humano são: a proteção ecológica (impedindo a proliferação de microrganismos patogênicos), a imunomodulação (resposta rápida e adequada do sistema imune às agressões infecciosas) e a contribuição nutricional (regula a fisiologia digestiva, fornecendo vitaminas e fontes energéticas). Por outro lado, o desequilíbrio dessa microbiota pode resultar na proliferação de patógenos, com consequente infecção bacteriana (ZIEMER & GIBSON, 1998; SPILLER, 2008). Além disso, a microbiota intestinal contribui para a fisiologia humana, através da transformação de nutrientes complexos, como fibras, que de outra forma poderiam ser eliminados pelo humano, em açúcares simples, ácidos graxos de cadeia curta, aminoácidos e outros nutrientes que podem ser absorvidos. Tais microrganismos também são capazes de produzir alguns compostos importantes, como vitaminas, incluindo a vitamina K, vitamina B12 e ácido fólico. Além disso, esses

microrganismos são capazes de transformar substâncias cancerígenas potenciais, como compostos N-nitrosos (CONs) e aminas heterocíclicas (HCAs) (MAI & DRAGANOV, 2009).

A modulação da microbiota intestinal pelos microrganismos probióticos ocorre através de um mecanismo denominado “exclusão competitiva”. Os probióticos impedem a colonização da mucosa intestinal por microrganismos potencialmente patogênicos através da competição por sítios de adesão nessa mucosa, da competição por nutrientes necessários para a multiplicação de microrganismos indesejáveis e/ou os efeitos antagônicos. A produção de compostos antimicrobianos como bacteriocinas, ácidos orgânicos e outros compostos como peróxido de hidrogênio também faz parte do mecanismo de exclusão competitiva (GUARNER & MALAGELADA, 2003; ROUZAUD, 2007; O’FLAHERTY & KLAENHAMMER, 2010).

Como exemplo da competição por nutrientes, pode-se citar a competição por ferro, um elemento essencial para quase todos os microrganismos. *Lactobacillus acidophilus* é capaz de ligar o hidróxido férrico disponível à sua superfície, tornando-o indisponível para os microrganismos patogênicos (ELLI *et al.*, 2000; OELSCHLAEGER, 2010).

É importante destacar que a adesão do microrganismo probiótico à mucosa intestinal humana é de extrema importância para posterior colonização. Esse mecanismo torna a eliminação dos probióticos pelos movimentos peristálticos do intestino dificultada, o que provê uma vantagem competitiva sobre os microrganismos patogênicos (KOS *et al.*, 2003).

Além disso, os probióticos podem proteger o hospedeiro contra patógenos, através da formação de uma barreira física e da modulação dos mecanismos próprios de defesa do hospedeiro. Esses efeitos podem ser resultantes do antagonismo exercido pelo probiótico contra os patógenos e do aumento da efetividade da resposta

imune (secreção de IgA, fagocitose), com consequente aumento na resistência a infecções. O sistema imune do intestino possui duas vias de defesa: exclusão imune (realizada pelo sistema secretor de imunoglobulinas) e eliminação imune, que realiza a remoção de antígenos que penetram na mucosa (HASCHKE *et al.*, 1998).

Os principais mecanismos de ação dos microrganismos probióticos envolvidos na promoção da saúde humana citados anteriormente estão ilustrados na Figura 1.

Figura 1. Principais mecanismos de ação dos microrganismos probióticos envolvidos na promoção da saúde humana. Adaptado de FUSTER & GONZÁLES-MOLERO (2007).

Além dos fatores citados anteriormente, a influência benéfica dos microrganismos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui outros fatores como a degradação, inibição da síntese e inibição da ação de toxinas patogênicas (NICOLI *et al.*, 2003; JAIN *et al.*, 2004).

Esse conjunto de mecanismos resulta no aumento da resistência contra patógenos, garantindo, assim, a presença dos microrganismos com atividade benéfica à saúde e impedindo a manifestação dos chamados patógenos (NICOLI *et al.*, 2003). Assim sendo, a utilização de culturas probióticas em alimentos garante a presença dos

microrganismos benéficos à saúde humana na mucosa intestinal, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro. Essa resistência aumentada contra patógenos é a característica mais promissora no desenvolvimento de probióticos eficazes (PUUPPONEN-PIMIÄ *et al.*, 2002).

Adicionalmente, dados experimentais indicam que diversos probióticos são capazes de modular algumas características da fisiologia digestiva, como a imunidade da mucosa. Essa modulação é decorrente da resposta imune no tecido linfóide associado ao intestino, resultando na circulação de células T (que atuam contra antígenos externos) e células B (que produzem anticorpos). Consequentemente, há uma ativação da imunidade da mucosa e da permeabilidade intestinal (FIORAMONTI *et al.*, 2003; JAIN *et al.*, 2004; O'FLAHERTY & KLAENHAMMER, 2010). Além disso, os microrganismos probióticos estão envolvidos na produção de certas vitaminas do complexo B (GORBACH, 2000; LÓPEZ-MOLINA *et al.*, 2005).

Assim, o emprego de probióticos em alimentos, associados ou não às terapias já existentes, pode representar uma estratégia eficiente no combate às infecções que acometem os humanos. Esses novos métodos de tratamento ganham destaque diante do quadro preocupante da resistência a antibióticos, cada vez maior entre os microrganismos patogênicos (SCHIFFRIN & BLUM, 2002).

Os alimentos mais utilizados como veículos de microrganismos probióticos são geralmente produtos lácteos, como iogurtes, queijos, leites fermentados e sobremesas lácteas (SAARELA *et al.*, 2000; CHAMPAGNE *et al.*, 2005). Entretanto, GARDINER *et al.* (1999) alegaram que produtos como leites fermentados e iogurtes podem não configurar ótimas matrizes alimentares para a manutenção de elevadas concentrações de algumas cepas probióticas.

Em 2007, estimou-se que 70 produtos distintos contendo cepas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* spp., incluindo iogurtes, *buttermilk* (originalmente um subproduto do processamento da manteiga, fermentado por culturas aromáticas mesofílicas, o qual também pode ser fabricado pela fermentação de leite integral ou desnatado), sobremesas lácteas e produtos de leite em pó, dentre outros, estavam disponíveis para comercialização no mercado mundial (ANTUNES *et al.*, 2007; SHAH, 2007). Somente no Japão, devido à alta popularidade dos probióticos, mais de 53 diferentes tipos de alimentos probióticos já foram encontrados disponíveis no comércio (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

Diversos autores reportaram a incorporação de microrganismos probióticos a diferentes tipos de alimentos, como leites fermentados e iogurtes (STANTON *et al.*, 1998; SVENSSON, 1999; LAMOUREUX *et al.*, 2002; GUEIMONDE *et al.*, 2004; LUCAS *et al.*, 2004; CAPELA *et al.*, 2006; AKALIN *et al.*, 2007), extrato solúvel de soja fermentado (SHIMAKAWA *et al.*, 2003; BEHRENS *et al.*, 2004; GARRO *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2006; YEO & LIONG, 2010), “iogurtes” de soja (FARNWORTH *et al.*, 2007), sorvete e sorvete de iogurte (DAVIDSON *et al.*, 2000; FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2006; AKIN *et al.*, 2007; MAGARIÑOS *et al.*, 2007; HOMAYOUNI *et al.*, 2008; TURGUT & CAKMAKCI, 2009), produtos nutritivos em pó (INGHAM, 1999), chocolates (NEBESNY *et al.*, 2007; POSSEMIERS *et al.*, 2010), sobremesas (dentre elas: pudim, mousse e manjar), produtos à base de leite e sobremesas congeladas (HELLAND *et al.*, 2004b; ARAGON-ALEGRO *et al.*, 2007; BURITI *et al.* 2007b; MAGARIÑOS *et al.*, 2008; CORRÊA *et al.*, 2008; BURITI *et al.*, 2010a), alimentos de origem vegetal fermentados, produtos cárneos (ARIHARA *et al.*, 1998), maçã minimamente processada (RÖßLE *et al.*, 2010), “queijo” de soja (LIU *et al.*, 2006), diferentes tipos de sucos (KLEWICKA *et al.*, 2004; LUCKOW & DELAHUNTY, 2004; YOON *et al.*, 2006; CHAMPAGNE *et al.*, 2008; KUN *et al.*, 2008; PRADO *et al.*, 2008), bebida a base de

malte (ROZADA-SÁNCHEZ *et al.*, 2008), maionese (KHALIL & MANSOUR, 1998), mingau de maisena (HELLAND *et al.*, 2004a), fórmulas infantis, bebidas a base de soro de leite e vários tipos de queijos (STANTON *et al.*, 1998; GARDINER *et al.*, 1999; SAARELA *et al.*, 2000; SUÁREZ-SOLÍS *et al.*, 2002; BERGAMINI *et al.*, 2005; BURITI *et al.*, 2005a; BURITI *et al.*, 2005b; SAARELA *et al.*, 2006; BURITI *et al.*, 2007a; BURITI *et al.*, 2007c; MODZELEWSKA-KAPITULA *et al.*, 2007; SALEM *et al.*, 2007; CARDARELLI *et al.*, 2008, CICHOSKI *et al.*, 2008; SOUZA & SAAD, 2009). Além desses produtos, estudos realizados com *table biospread* (alimentos a base de emulsão contendo microrganismos probióticos) demonstraram que esse tipo de alimento apresentou populações satisfatórias, quando suplementado com culturas probióticas (CHARTERIS *et al.*, 2002; DOMMELS *et al.*, 2009).

A dose mínima necessária para que um alimento probiótico exerça seus efeitos benéficos no hospedeiro é motivo de discussão entre a comunidade científica e os órgãos regulamentadores. Vários autores defenderam em seus trabalhos que a dose de 10^5 UFC/g ou mL de produto seria suficiente para que o probiótico exercesse efeitos benéficos sobre o hospedeiro (LEE & SALMINEN, 1995). Em contrapartida, outros pesquisadores defenderam que a concentração mínima de bactérias probióticas viáveis em um alimento no momento de sua compra deveria ser de 10^6 UFC/g ou mL (SHAH *et al.*, 1995) ou 10^7 UFC/g ou mL de produto (RYBKA & FLEET, 1997; VINDEROLA & REINHEIMER, 2000). No Brasil, a Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, instituída junto à Câmara Técnica de Alimentos recomendou, no ano de 2001, que um alimento funcional probiótico deveria apresentar a concentração mínima de probióticos de 10^6 UFC/g ou mL de produto, dentro do prazo de validade do mesmo (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2001). Entretanto, a referida Comissão efetuou alterações nessa recomendação e estabeleceu que a quantidade mínima diária de

microrganismos probióticos viáveis a ser ingerida, para resultar em efeitos terapêuticos, é de 10^8 a 10^9 UFC/dia. A legislação brasileira vigente alerta, ainda, que valores inferiores a esses citados podem ser aceitos, desde que a empresa fabricante do alimento probiótico em questão comprove a sua eficácia (ANVISA, 2008).

Contudo, é impossível para o consumidor controlar as populações de probióticos presentes em um alimento no momento de seu consumo. Por isso, as empresas fabricantes possuem a responsabilidade de realizar testes microbiológicos periódicos, para verificar a viabilidade do probiótico durante todo o período de vida de prateleira estabelecido para cada produto disponível para comercialização (ROY, 2005).

A seleção e avaliação de microrganismos candidatos a serem classificados como probióticos resultam de um processo que compreende aspectos de segurança, funcionais e tecnológicos (HUYS *et al.*, 2006). Sendo assim, além de se apresentarem viáveis, as culturas probióticas devem manter-se em populações satisfatórias no intestino humano, sendo essas algumas das condições exigidas para que um microrganismo seja classificado como probiótico. Além disso, as propriedades tecnológicas são pré-requisitos para a potencial utilização de culturas probióticas em alimentos (KASK *et al.*, 2003).

Contudo, a seleção de cepas baseada nas propriedades tecnológicas é um aspecto crítico no desenvolvimento de alimentos probióticos, uma vez que é essencial que tais cepas exibam, além da resistência às enzimas estomacais e entéricas, resistência aos processos tecnológicos aplicados na produção dos alimentos aos quais serão adicionadas. Além disso, os produtos devem manter suas características sensoriais e físico-químicas ao longo do armazenamento (ROY, 2005; SOUZA *et al.*, 2008).

Para serem incorporadas a produtos alimentícios, as cepas devem ser consideradas bioseguras ou GRAS (*generally recognised as safe*) (KOSIN & RAKSHIT 2006).

Bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são mais frequentemente empregadas como suplementos probióticos em alimentos. A opção por esses microrganismos pode ser atribuída ao fato deles serem isolados de todas as porções do trato gastrointestinal do humano saudável (SHAH, 2007). O íleo terminal e o cólon parecem ser os locais de preferência para a colonização intestinal dos lactobacilos e bifidobactérias, respectivamente (CHARTERIS *et al.*, 1998b; SAARELA *et al.*, 2000; BIELECKA *et al.*, 2002).

Por outro lado, algumas investigações científicas têm sido realizadas para testar potenciais propriedades probióticas de *Sacharomyces boulardii* e de bactérias dos gêneros *Pediococcus*, *Leuconostocs* e *Propionibacterium*, além de *Enterococcus faecium* (que é mais estável às alterações de pH, quando comparado a *L. acidophilus* e, também, é capaz de produzir bacteriocinas com atividade contra patógenos) como potenciais microrganismos para serem aplicados como probióticos em alimentos (CZERUCKA *et al.*, 2007; SHAH, 2007). Além disso, a cepa *Streptococcus thermophilus*, habitualmente utilizada para a produção de iogurtes, também é alvo de pesquisas, uma vez que a produção de β -galactosidase por essa cepa é considerada como uma atividade probiótica por alguns pesquisadores (DROUAULT *et al.*, 2002; MATER *et al.*, 2005).

Apesar das culturas de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. serem consideradas bioseguras ou GRAS (GRAS - *generally recognised as safe*), é necessária a determinação da segurança na utilização de qualquer cepa antes da divulgação e lançamento um novo produto probiótico ou simbiótico. Assim, a realização de uma avaliação crítica dos efeitos causados pelos probióticos aos humanos torna

seus benefícios acessíveis ao consumidor (SALMINEN *et al.*, 1998; O'BRIEN *et al.*, 1999).

Sendo assim, a presença dos probióticos deve, necessariamente, resultar em efeitos benéficos mensuráveis sobre a saúde, substanciados por estudos conduzidos no hospedeiro ao qual ele se destina (estudos *in vivo*). Em outras palavras, probióticos destinados para o uso em humanos requerem comprovação da sua eficácia, através de ensaios em humanos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; SANDERS, 2003). Como exemplo, pode-se citar as cepas Bb-12 de *Bifidobacterium animalis* e La-5 de *Lactobacillus acidophilus*, cujo efeito probiótico em humanos é comprovado e bem documentado (HASCHKE *et al.*, 1998; JUNTUNEN *et al.*, 2001; JAIN *et al.*, 2004; OUWEHAND *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2004; MOHAN *et al.*, 2006).

A incorporação de prebióticos em alimentos, juntamente com os microrganismos probióticos, parece ser uma excelente alternativa para garantir a multiplicação desses microrganismos no intestino humano. De fato, a presença de prebióticos caracteriza-se, segundo BIEDRZYCKA & BIELECKA (2004), como um *pool* de substratos para a multiplicação de bactérias endógenas benéficas.

Os prebióticos são atualmente definidos como “ingredientes seletivamente fermentáveis que permitem modificações específicas na composição e/ou na atividade da microbiota gastrintestinal que resultam em benefícios ao bem estar e à saúde do hospedeiro” (ROBERFROID, 2007; WANG, 2009). Os principais prebióticos utilizados pela indústria de alimentos mundial são os fruto-oligossacarídeos (FOS), a inulina, os isomalto-oligossacarídeos (IMO), os glico-oligossacarídeos (GOS) e os transgalacto-oligossacarídeos (TOS). Dentre os citados, a inulina e os FOS são os mais estudados (SIRÓ *et al.*, 2008), sendo ainda os únicos para os quais a alegação de efeito sobre a composição da microbiota intestinal é permitida no Brasil (ANVISA, 2008).

Alguns dos principais substratos utilizados por bactérias endógenas do cólon são os carboidratos não digeridos no trato gastrointestinal superior. Esses carboidratos são metabolizados, preferencialmente, por bifidobactérias, promovendo a proliferação no cólon (NORIEGA *et al.*, 2004). Por outro lado, sabe-se que algumas cepas de lactobacilos são aptas a degradar inulina e oligofrutose (KAPLAN & HUTIKINS, 2000; MAKRAS *et al.*, 2005).

Um produto referido como simbiótico é aquele no qual culturas probióticas e ingredientes prebióticos estão combinados. A interação entre o probiótico e o prebiótico *in vivo* pode ser favorecida por uma adaptação do probiótico ao substrato prebiótico anteriormente ao seu consumo, ou seja, quando ambos estão inseridos no alimento. Isto pode, em alguns casos, resultar em uma vantagem competitiva para a cultura probiótica, quando ingerida juntamente com o ingrediente prebiótico. Alternativamente, esse efeito simbiótico pode ser direcionado às diferentes regiões “alvo” do trato gastrointestinal: os intestinos delgado e grosso. O consumo de probióticos e prebióticos, selecionados apropriadamente, pode aumentar os efeitos benéficos de cada um deles, uma vez que o estímulo de cepas probióticas conhecidas leva à escolha dos pares simbióticos substrato-microrganismo ideais (BIELECKA *et al.*, 2002; PUUPPONEN-PIMIÄ *et al.*, 2002; SAAD, 2006b).

Entre várias cepas de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., somente poucas são capazes de sobreviver às condições ácidas normalmente encontradas em produtos fermentados e no trato gastrointestinal humano. Uma vez que a cultura é escolhida para ser adicionada a um alimento, ela deve apresentar-se estável em relação à sua viabilidade durante a produção e estocagem desse alimento (KOSIN & RAKSHIT, 2006).

1.3. O gênero *Bifidobacterium* spp. e a cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12

As bifidobactérias são microrganismos Gram-positivos, anaeróbios estritos, que habitam naturalmente o trato gastrointestinal dos humanos. Não possuem motilidade, não formam esporos e apresentam-se em formas bifurcadas (forma de Y ou V), embora em condições desfavoráveis possam também apresentar outras formas (SOLANO-AGUILAR *et al.*, 2008) (Figura 2).

Figura 2. Morfologia de bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* spp. (Fonte: <http://microbewiki.kenyon.edu/images/0/06/Bifidobacterium.jpg>).

Tais microrganismos são descritos como sendo estritamente anaeróbios, embora algumas espécies consigam tolerar o oxigênio. São ácidos tolerantes e os valores ótimos de pH para a sua multiplicação variam entre 6,0 e 7,0. A temperatura ótima para a multiplicação desses microrganismos está na faixa entre 37°C e 41°C, sendo as temperaturas mínimas e máximas compreendidas nas faixas entre 25-28°C e 43-45°C, respectivamente (SHAH, 2007; RIVERA-ESPINOZA & GALLARDO-NAVARRO, 2010). As bifidobactérias são microrganismos sacarolíticos e possuem a capacidade de fermentar glicose, galactose e frutose, produzindo principalmente ácido

acético e ácido láctico, bem como ácido succínico e CO₂, em pequenas concentrações (LEAHY *et al.*, 2005; ANAL & SINGH, 2007; JALILI *et al.*, 2009).

Esses microrganismos foram originalmente isolados e descritos no período entre 1899 e 1900 por Henry Tissier, que observou abundância de bactérias com uma forma peculiar (formato em “Y”) nas fezes de bebês saudáveis, quando comparadas às fezes de crianças com diarreia. Tissier, então, sugeriu que esses microrganismos, até então chamados de “*bifid bactéria*”, poderiam ser utilizados no tratamento de pacientes com diarreia (BROEK *et al.*, 2008).

Estima-se que mais de 500 espécies de bactérias habitem o trato gastrointestinal humano, sendo o gênero *Bifidobacterium* pertencente ao grupo dominante dos microrganismos anaeróbios da microbiota intestinal (ROY, 2005; VOROBJEVA, 2005; SOLANO-AGUILAR *et al.*, 2008; O’FLAHERTY & KLAENHAMMER, 2010). Tal população se estabelece rapidamente após o nascimento do ser humano. Porém, diminui no intestino humano adulto, quando passa a ser a terceira maior população presente depois de *Eubacterium* e *Bacteroides*. Durante a vida adulta, as populações de *Bifidobacterium* spp. do homem permanecem estáveis, sendo relativamente elevadas (10^9 - 10^{10} UFC/g), correspondendo a proporções entre 3 e 6% da microbiota total. Essa população apresenta um declínio considerável, quando o indivíduo atinge a fase senil. Além disso, a dieta, o uso de antibióticos e/ou outros medicamentos e situações de estresse são indicados como fatores importantes capazes de influenciar o decréscimo nas populações de *Bifidobacterium* presentes no intestino humano (SHAH, 2007).

Os microrganismos do gênero *Bifidobacterium* auxiliam a saúde do hospedeiro, por promoverem o balanço da microbiota intestinal, fermentando carboidratos que não são digeridos e absorvidos no trato gastrointestinal superior e, também, por apresentarem efeitos adversos às bactérias patogênicas. Tais efeitos antagônicos são

resultantes da produção de ácidos orgânicos, em particular, ácido acético e ácido láctico. Algumas cepas do gênero *Bifidobacterium* (especialmente *B. bifidum* NCFB, *B. longum* e *B. infantis* BCRC 14602) podem produzir moléculas antibacterianas específicas, como bifidocina B, bifidolina, *bifilong* e bifidina I, as quais inibem bactérias patogênicas. Além disso, as bifidobactérias também são capazes de sintetizar vitaminas (YILDIRIM *et al.*, 1999; ALANDER *et al.*, 2001; LÓPEZ-MOLINA *et al.*, 2005; AHMAD *et al.*, 2010).

Diversos mecanismos são sugeridos para a eficácia da inibição de patógenos Gram-negativos por bifidobactérias. Esses mecanismos incluem a diminuição do pH pela produção de ácidos orgânicos, a competição por nutrientes e sítios de adesão, além da estimulação da imunidade do hospedeiro (MAKRAS & VUYST, 2006).

Estudos realizados com ensaios *in vitro* e *in vivo* reportaram ampla inibição, por bifidobactérias, de microrganismos patogênicos, por bifidobactérias incluindo *Escherichia coli*, *Salmonella* e rotavírus (YILDIRIM *et al.*, 1999; LEAHY *et al.*, 2005; MAKRAS & VUYST, 2006; SHAH, 2007).

As espécies de *Bifidobacterium* mais utilizadas como probióticas são *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidus*, *Bifidobacterium essensis*, *Bifidobacterium laterosporus*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis* e *Bifidobacterium lactis* (atualmente classificado como *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) (ANAL & SINGH, 2007; SHAH, 2007). A taxonomia de *B. animalis* subsp. *lactis* apresenta controvérsias, desde a sua descrição original, feita por Meile e colaboradores (MEILE *et al.*, 1997). Vários estudos têm investigado a sua similaridade com a cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*. Entretanto, estudos realizados por VENTURA & ZINK (2002), ZHU & DONG (2003) e MASCO *et al.* (2004) concluíram que *B. animalis* subsp. *lactis* e *B. animalis* subsp. *animalis* devem ser considerados

como dois microrganismos de subespécies diferentes, por apresentarem características e propriedades diferenciadas.

O uso seguro dessas cepas em alimentos é embasado em um longo histórico de utilização e consumo desses microrganismos em alimentos como, por exemplo, leites fermentados, e no amplo conhecimento existente a respeito de sua taxonomia e fisiologia (PICARD *et al.*, 2005). Além disso, estudos realizados com diferentes cepas de *Bifidobacterium* spp. concluíram que tais microrganismos são seguros para utilização em alimentos. Essa conclusão foi embasada no fato de que infecções sistêmicas e/ou locais, incluindo septicemia, meningite e endocardite, não foram relatadas devido à ingestão de produtos lácteos contendo bifidobactérias por humanos (BORRIELLO *et al.*, 2003; ROY, 2005; MEILE *et al.*, 2008).

Cepas de *Bifidobacterium* spp. são amplamente empregadas em diversos tipos de alimentos: *buttermilk*, sorvetes, “iogurte” de soja, diferentes tipos de queijos, pudim, iogurtes, leites fermentados, extrato solúvel de soja fermentado, *table biospread* (alimentos a base de emulsão contendo microrganismos probióticos), sucos, leite enriquecido (não fermentado) e manjar (SAARELA *et al.*, 2000; VINDEROLA *et al.*, 2000; BREARTY *et al.*, 2001; CHARTERIS *et al.*, 2002; LAMOUREUX *et al.*, 2002; OUWEHAND *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2002; BEHRENS *et al.*, 2004; BOYLSTON *et al.*, 2004; HELLAND *et al.*, 2004b; WANG *et al.*, 2004; FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2006; MARUYAMA *et al.*, 2006; SAARELA *et al.*, 2006; ANTUNES *et al.*, 2007; AKIN *et al.*, 2007; FARNWORTH *et al.*, 2007; CARDARELLI *et al.*, 2008; CORRÊA *et al.*, 2008; CHAMPAGNE *et al.*, 2009; FRITZEN-FREIRE *et al.*, 2010).

No Brasil, como exemplo de produto probiótico comercializado contendo cepas de *Bifidobacterium* spp. pode ser citado o iogurte Activia, produzido e comercializado pela Danone, que contém *Bifidobacterium animalis*, o iogurte BioFibras (Batavo) que contém, além do *Lactobacillus acidophilus*, a cepa *Bifidobacterium lactis* (atualmente

classificada como *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) e o leite fermentado Nesvita (*B. animalis*). Além desses produtos, recentemente, foram lançados mais um iogurte contendo Bb-12 (iogurte Lactive, da Leco) e o único queijo probiótico existente no país: o queijo minas frescal Sanbios, adicionado de *Bifidobacterium lactis*, produzido pela Cooperativa Santa Clara.

A cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 é amplamente utilizada em fórmulas infantis, suplementos e produtos lácteos há mais de 25 anos, em diversos países. Tal fato tem como base as propriedades imunológicas e tecnológicas dessa cepa, que possui excelente capacidade de sobreviver durante a passagem pelo trato gastrointestinal humano.

A resistência desse microrganismo às condições encontradas durante a sua passagem pelo trato gastrointestinal humano pode ser explicada pela presença de um determinado gene. As bifidobactérias possuem um gene denominado gene K. Tal gene, que também é encontrado em muitas outras bactérias, possui a função de proteção contra inúmeras condições desfavoráveis, incluindo choque térmico e estresse osmótico. A expressão desse gene tem sido associada ao aumento da resistência de bifidobactérias, quando expostas à ação da bile (SCHMIDT & ZINK, 2000; VERNAZZA *et al.*, 2006).

Além de elevada resistência aos processos digestivos do humano, a cepa *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 configura entre as cepas mais utilizadas como probióticos em alimentos. Esse fato se deve à sua comprovada capacidade de adesão à mucosa intestinal humana, resultando em elevada colonização do epitélio (MOHAN *et al.*, 2006; GARRIGUES *et al.*, 2010). Tal cepa também é reconhecida por possuir potente eficácia sobre a saúde humana, em se tratando de situações relacionadas à diarreia causada por rotavírus, má absorção da lactose, diarreia associada ao uso de antibióticos e

diarréia associada ao *Clostridium difficile* (HASCHKE *et al.*, 1998; MÄTTÖ *et al.*, 2006b; ANTUNES *et al.*, 2007; SHAH, 2007; KUN *et al.*, 2008; GUEIMONDE *et al.*, 2010).

Quando comparada a outras cepas de bifidobactérias, *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 possui características tecnológicas de interesse para a indústria alimentícia. Como por exemplo, pode ser citada a sua tolerância à presença de oxigênio, bem como de ácidos. Tais características tornam esse microrganismo apto para ser empregado em diversos alimentos, como os citados anteriormente. Entretanto, devido à sua baixa capacidade de multiplicação no leite, a incorporação de suplementos nutricionais a alimentos, juntamente com as bifidobactérias, tem sido realizada a fim de melhorar e/ou aumentar a sua multiplicação. Diversos pesquisadores associaram a incorporação de microrganismos do gênero *Bifidobacterium* em alimentos a outros ingredientes, como concentrados protéicos de soro e prebióticos, como inulina, a fim de obterem produtos com maiores populações de probióticos (SHIN *et al.*, 2000; CRITTENDEN *et al.*, 2001; JANER *et al.*, 2004; CAPELA *et al.*, 2006; AKALIN *et al.*, 2007).

1.4. Prebióticos

O grupo dos alimentos prebióticos compreende, dentre outros oligossacarídeos, os galacto-oligossacarídeos (GOS), os fruto-oligossacarídeos (FOS), a lactulose e a inulina. Essas fibras são capazes de promover a multiplicação de bactérias benéficas presentes no intestino humano, preferencialmente as bifidobactérias, uma vez que esses microrganismos são capazes de fermentar tais compostos (RASTALL & MAITIN, 2002; KELLY, 2008). Esses prebióticos podem ser encontrados naturalmente em alimentos, como cebola, alcachofra, aspargos, banana, alho, soja, raízes da chicória, dentre outros (FRANCK, 2008).

Os ingredientes prebióticos, assim como os probióticos, devem possuir alguns pré-requisitos para que sejam incorporados a alimentos. Devem resistir aos processos de digestão, absorção e adsorção e serem fermentáveis pela microbiota saudável presente no intestino humano. Consequentemente, irão exercer uma atividade bifidogênica, estimulando seletivamente a multiplicação das bactérias benéficas presentes no intestino humano (principalmente no cólon) (HOLZAPFEL & SCHILLINGER, 2002; GIBSON, 2004; SAAD, 2006a).

Assim, os ingredientes chamados prebióticos correspondem a nutrientes que são restritos ao cólon, contendo substâncias químicas resistentes aos processos digestivos no trato gastrointestinal superior. Geralmente são oligossacarídeos e polissacarídeos, que atuam como substratos específicos para as bactérias probióticas intrínsecas do hospedeiro e estimulam a sua multiplicação, modificando, consequentemente, a composição da microbiota intestinal (HAMILTON-MILLER, 2004; ROBERFROID, 2008a,b). Entretanto, embora os prebióticos atuem especificamente no intestino grosso, também podem resultar em algum impacto nos microrganismos do intestino delgado (GILLILAND, 2001).

Os prebióticos não são metabolizados pela microbiota não-probiótica do intestino. Dessa forma, não promovem a multiplicação de potenciais patógenos, como clostrídios produtores de toxinas, bacteróides proteolíticos e *Escherichia coli* toxigênica, por exemplo. Assim, a composição de uma microbiota saudável é obtida quando bifidobactérias e lactobacilos tornam-se predominantes no intestino, exercendo seus efeitos benéficos à saúde (HAMILTON-MILLER, 2004; MANNING & GIBSON, 2004).

Dentre os diferentes tipos de prebióticos citados anteriormente, a inulina e os fruto-oligossacarídeos são os prebióticos de maior interesse nas pesquisas científicas, por configurarem entre os prebióticos mais estudados e bem caracterizados

(HOLZAPFEL & SCHILLINGER, 2002; KOLIDA *et al.*, 2002; LÓPEZ-MOLINA *et al.*, 2005).

1.4.1. Inulina

A inulina é composta por polímeros de glicose e frutose, ligados através de ligações β -(2 $\rightarrow$ 1). Possui grau de polimerização (GP) variando entre 2 e 65, com GP médio de 12. É encontrada em alimentos como cebola, alcachofra, aspargos, banana, alho, tomate e alho poró. Entretanto, comercialmente, esse prebiótico é extraído da beterraba e raízes da chicória, principalmente (GRIFFIN *et al.* 2003; HENNELLY *et al.*, 2006; KOLIDA & GIBSON, 2008; ROBERFROID, 2008a,b).

A inulina é frequentemente adicionada a produtos alimentícios, uma vez que atende a todos os pré-requisitos necessários para um ingrediente prebiótico: não é hidrolisada ou absorvida na parte superior do trato gastrointestinal humano, é fermentada por um limitado número de bactérias da microbiota intestinal humana sadia, principalmente por bifidobactérias, estimulando essas bactérias a manterem-se viáveis, conferindo, portanto, efeitos benéficos ao hospedeiro (KOLIDA *et al.*, 2002) (Figura 3).

Figura 3. Comportamento da inulina como prebiótico no trato digestivo humano. Adaptado de KOLIDA *et al.* (2002).

A inulina não é digerida no trato gastrintestinal superior do humano, devido à sua estrutura química, atingindo o cólon com sua estrutura intacta. A fermentação desse ingrediente pela microbiota presente no intestino, principalmente as bifidobactérias, resulta no aumento da biomassa bacteriana. Resulta, ainda, na produção de acetato, propionato e butirato (ácidos graxos de cadeia curta), ácido lático e gases (CO_2 e H_2) (MENDOZA *et al.*, 2001; MEYER & STASSE-WOLTHUIS, 2009). Os ácidos graxos de cadeia curta sintetizados são rapidamente utilizados pela microbiota ou são absorvidos, principalmente através da superfície da mucosa no cólon, para posterior utilização como fonte de energia pelo hospedeiro. Além disso, o butirato é utilizado de maneira eficiente pelas células da mucosa intestinal para a sua manutenção e tem demonstrado particular efeito na diminuição do risco de transformação maligna das células do cólon (POMPEI *et al.*, 2008). Tal processo de fermentação resulta na diminuição do pH do cólon, que favorece (melhora) a absorção de alguns minerais, como cálcio, magnésio e

ferro, além de prevenir o câncer de cólon (VAN LOO *et al.*, 1999; SCHOLZ-AHRENS *et al.*, 2007; THAMMARUTWASIK *et al.*, 2009).

Dessa maneira, os produtos finais obtidos após a fermentação da inulina pela microbiota intestinal podem auxiliar na manutenção da estrutura da barreira intestinal, por fornecerem importantes fontes de energia para o epitélio intestinal (BOSSCHER *et al.*, 2006).

Dessa maneira, a inulina adicionada a alimentos pode alterar positivamente a microbiota humana sadia, uma vez que é fermentada por bactérias endógenas benéficas presentes no intestino humano (LÓPEZ-MOLINA *et al.*, 2005) e, consequentemente, a saúde do hospedeiro.

A incorporação desse ingrediente a alimentos é tema constante de pesquisa, uma vez que apresenta-se como substrato para a multiplicação de bactérias benéficas (CRITTENDEN *et al.*, 2001). Alterações positivas na composição da microbiota intestinal humana, compreendendo desde o aumento da população de bifidobactérias até a redução de bacteróides, fusobactérias e clostrídios, foram demonstradas em estudos realizados com humanos, utilizando-se doses entre 4 e 20 gramas diárias de inulina e/ou oligofrutose, com um período de administração do prebiótico de, pelo menos, 2 semanas (ROBERFROID, 2005).

No Brasil, a alegação de propriedade funcional para alimentos contendo prebióticos é permitida, desde que a porção do produto pronto para consumo forneça, no mínimo, 3 g do prebiótico em questão, se o alimento for sólido ou 1,5 g, se o alimento for líquido (ANVISA, 2008).

A ingestão de inulina é associada à melhora do funcionamento do trato gastrointestinal. Além disso, estudos demonstraram outros benefícios, como o aumento na absorção de minerais, como cálcio, magnésio e ferro. Além disso, estudos conduzidos também relataram aumento na retenção do cálcio no organismo. Reduções

nos níveis de colesterol e efeito sobre os processos envolvidos no metabolismo lipídico, resultando em benefícios sobre doenças relacionadas às desordens do metabolismo lipídico como, por exemplo, a arteriosclerose, são outros efeitos positivos da inulina na saúde humana (GRIFFIN *et al.*, 2002; KAUR & GUPTA, 2002; LÓPEZ-MOLINA *et al.*, 2005; AZORÍN-ORTUÑO *et al.*, 2009).

Na tecnologia de alimentos, a inulina pode contribuir para a melhoria da textura, bem como dos atributos sensoriais dos produtos (MOSCATTO *et al.*, 2004; KIP *et al.*, 2006; CARDARELLI *et al.*, 2008). Além disso, tem função importante na fabricação de alimentos simbióticos, auxiliando na manutenção da viabilidade de produtos que contenham microrganismos probióticos (SHIN *et al.*, 2000; AKIN *et al.*, 2007; RAMCHANDRAN & SHAH, 2010).

1.5. Concentrado protéico de soro (WPC), caseinomacropeptídeo (CMP) e a suplementação de produtos alimentícios

Dentre os diferentes nutrientes adicionados a alimentos para melhorar a viabilidade de microrganismos probióticos, além dos ingredientes prebióticos, destacam-se os componentes derivados do leite, como o concentrado protéico de soro (WPC) e o concentrado de caseína (CMP). As propriedades funcionais do WPC e do CMP fazem desses compostos ingredientes interessantes para serem empregados no desenvolvimento de novos alimentos com possíveis efeitos benéficos sobre a saúde.

Proteínas são agentes estruturais em alimentos. Portanto, a sua inclusão na matriz pode influenciar as características reológicas do alimento. Para a produção de novos alimentos, as propriedades bioativas e as funções tecnológicas do CMP podem ser simultaneamente importantes. Entretanto, pouca informação a respeito das funções

tecnológicas de CMP e sua aplicação em matrizes alimentares estão disponíveis na literatura (THOMÄ-WORRINGER, 2006).

Caseínomacropeptídeo (CMP) é um composto bioativo naturalmente presente no leite bovino. CMP é um fragmento que possui 64 aminoácidos e nitrogênio disponível, que pode ser fermentado por bifidobactérias (GUSTAFSONA *et al.*, 2001; JANER *et al.*, 2004). Estudos demonstraram que CMP possui propriedades biológicas e funcionais, fazendo desse composto uma excelente fonte de proteína, de grande utilização nas indústrias alimentícia e farmacêutica (MORENO *et al.*, 2002).

O soro liofilizado e os subprodutos do soro liofilizado são aditivos importantes dentro da indústria alimentícia. Proteínas do soro são frequentemente utilizadas como ingredientes alimentares, devido ao seu alto valor nutritivo e também por serem consideradas compostos GRAS (*generally recognised as safe*) (HUDSON *et al.*, 2000; HERCEG *et al.*, 2007). Além disso, possuem características desejáveis, como gelatinização e viscosidade. Igualmente, proteínas do soro são excelentes fortificantes para diversos tipos de alimentos, uma vez que promovem aumento em seu valor nutricional (CARUNCHIA WHETSTINE *et al.*, 2005).

Os ingredientes WPC e CMP têm sido utilizados em pesquisas realizadas com suplementação de alimentos contendo microrganismos probióticos, principalmente cepas do gênero *Bifidobacterium* spp. (BURY *et al.*, 1998; JANER *et al.*, 2004; ANTUNES *et al.*, 2005). Esses componentes contêm nitrogênio disponível para utilização pelos microrganismos, bem como aminoaçúcares, como ácido siálico e N-acetilgalactosamina, que podem ser fermentados pelos microrganismos probióticos, podendo, dessa maneira, auxiliar de forma positiva a sua multiplicação.

O concentrado protéico de soro (WPC) é um ingrediente de baixo custo, que, quando adicionado conjuntamente com um microrganismo probiótico em um alimento, pode atuar positivamente, auxiliando na multiplicação desses microrganismos,

aumentando tais populações no produto ao qual foram adicionados (KAILASAPATHY & SUPRIADI, 1996; MARTÍN-DIANA *et al.*, 2003; JANER *et al.*, 2004; ANTUNES *et al.*, 2005; CHRISTOPHER *et al.*, 2006).

Embora os concentrados protéicos não sejam classificados como prebióticos, diversos trabalhos esclarecem que esses concentrados podem ser empregados em alimentos para promover uma maior multiplicação de microrganismos probióticos.

Adicionalmente, os efeitos biológicos de CMP têm recebido muita atenção por parte de pesquisadores, devido à capacidade desse composto em reter endotoxinas produzidas por *E. coli*, inibir a adesão de vírus e bactérias patogênicas ao epitélio intestinal, além de atuar na supressão da secreção gástrica e na regularização da circulação sanguínea. A presença de CMP também pode auxiliar na nutrição da microbiota intestinal saudável, o que torna esse composto, segundo THOMÄ-WORRINGER *et al.* (2006), um potencial ingrediente prebiótico. Entretanto, é importante ressaltar que o conceito de prebióticos se restringe a ingredientes seletivamente fermentáveis, o que não é o caso do CMP.

Além de auxiliarem na multiplicação e/ou manutenção da viabilidade de microrganismos probióticos, quando adicionados conjuntamente em alimentos, proteínas do leite também podem auxiliar na estabilidade de alguns produtos, como produtos à base de emulsões. Uma variedade de proteínas do leite é empregada como emulsificante em alimentos, dentre elas, proteínas do soro de leite e caseínas (McCLEMENTS, 2005). Sendo assim, esses compostos apresentam-se como potenciais ingredientes para serem utilizados na fabricação de margarinas probióticas e/ou simbióticas.

1.6. Óleos e gorduras

Os óleos e as gorduras fazem parte de um grupo de compostos conhecidos como lipídios. Por definição, lipídios são compostos insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Esse grupo de compostos compreende um grande número de moléculas distintas, podendo ser simples (acilgliceróis e ceras) ou compostas (fosfoacilgliceróis, esfingomielinas, ésteres de esteroi, entre outros) (McCLEMENTS, 2005).

Os óleos e as gorduras provêm de fontes variadas, incluindo plantas, sementes e animais. Denomina-se “*gordura*” o composto que é sólido à temperatura ambiente e “*óleo*” o que permanece líquido nessa mesma condição. Entretanto, tais termos são frequentemente utilizados indistintamente (ROBINSON & RAJAH, 2002).

Os triacilgliceróis são os principais componentes dos lipídios presentes em alimentos. Os lipídios são essenciais para a dieta humana, uma vez que desempenham diferentes e importantes papéis no organismo humano: são precursores de hormônios e ácidos biliares, participam como fontes calóricas na dieta, fornecem componentes nutricionais específicos como os ácidos graxos essenciais (linoléico e linolênico); são fontes de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e exercem ação lubrificante. Além disso, são importantes ingredientes para a indústria alimentícia, uma vez que conferem características desejáveis para alimentos como queijos, cremes, produtos de panificação e margarinas, conferindo sabor e contribuindo para o aroma, textura e maciez dos mesmos.

Os lipídios, tanto de origem animal como vegetal, são constituídos por ácidos graxos saturados e insaturados (podendo ser monoinsaturados ou poli-insaturados), dependendo da presença e do número de duplas ligações na cadeia dos ácidos graxos

(AUED-PIMENTEL *et al.*, 2003; McCLEMENTS, 2005; DAS, 2006; HUR *et al.*, 2009)

(Figura 4).

Figura 4. Representação esquemática dos tipos de ácidos graxos: insaturado (monoinsaturado e poli-insaturado) e saturado.

1.6.1. Lipídios e a saúde humana

Os componentes lipídicos, especialmente os ácidos graxos, estão presentes nas mais diversas formas de vida, desempenhando importantes funções na estrutura das membranas celulares e nos processos metabólicos. Nos humanos, os ácidos graxos linoléico (18:2; n-6) e α -linolênico (18:3; n-3) são extremamente necessários para manter sob condições normais as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. Esses ácidos graxos também participam da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, da síntese da hemoglobina e da divisão celular, sendo denominados essenciais por não serem sintetizados pelo organismo humano. Tais ácidos graxos são elementos estruturais

necessários à síntese de lipídios de tecidos e têm papel importante na regulação de vários processos metabólicos, de transporte, excreção e estrutura de membranas celulares (MARTIN *et al.*, 2006).

A carência dos ácidos graxos essenciais na alimentação dos mamíferos (especialmente do homem) conduz a alterações imunológicas e neurológicas, além de causar alterações no crescimento, na pele e sérios transtornos comportamentais (TINOCO *et al.*, 2007).

Os ácidos graxos são encontrados na natureza principalmente como ésteres de glicerol, que originam os triacilgliceróis. No reino animal e vegetal, os ácidos graxos geralmente apresentam-se na configuração *cis*. Nessa configuração, os hidrogênios ligados aos carbonos estão em um mesmo lado da molécula. Entretanto, outra configuração, muitas vezes decorrente da aplicação de determinados processos tecnológicos empregados na modificação industrial de óleos e gorduras (embora também seja observada na natureza com menor frequência), pode ocorrer, e é denominada configuração *trans*. Nessa forma, os hidrogênios estão ligados aos carbonos, porém, em lados opostos da molécula (MARTIN *et al.*, 2007) (Figura 5).

Figura 5. Esquema representativo das configurações *Cis* e *Trans*. (Fonte: www.4.liber.se/.../gymkeb/bilder/cistrans.jpg).

Os ácidos graxos *trans* presentes em alimentos podem ter origem em três principais fontes: transformação de ácidos graxos insaturados no rumem de animais (processo denominado bio hidrogenação) através da atuação de bactérias (leite, manteiga e outros produtos lácteos), processo de hidrogenação parcial (processo para aumentar a quantidade de cristais de gordura sólida em lipídios insaturados) e desodorização (processo para refino de óleos, que promove a eliminação de substâncias responsáveis por sabores e odores indesejáveis) (UPRITCHARD *et al.*, 2005).

A alteração na estrutura dos ácidos graxos para a configuração denominada *trans* pode afetar vários processos fisiológicos do humano e influenciar na função e metabolismo dos ácidos graxos, como por exemplo, na sua incorporação nos fosfolipídios e sua transformação em prostaglandinas (MARTIN *et al.*, 2007).

Os ácidos graxos *trans*, também denominados gorduras *trans*, não são sintetizados no organismo humano (CHIARA *et al.*, 2002). Entretanto, tais ácidos graxos sempre estiveram presentes na alimentação humana, através do consumo de alimentos provenientes de animais ruminantes (como leite, manteiga e outros produtos lácteos). Contudo, a introdução dos ácidos graxos *trans* em quantidades consideráveis na dieta humana iniciou-se com a utilização do processo de hidrogenação de óleos vegetais, utilizado para aumentar a quantidade de cristais de gordura sólida em lipídios insaturados e com a aplicação do processo de desodorização, utilizado no refino de óleos com a finalidade de eliminar substâncias responsáveis por sabores e odores indesejáveis (MARTIN *et al.*, 2004; UPRITCHARD *et al.*, 2005). No Brasil, a produção de gordura vegetal hidrogenada iniciou-se por volta do ano de 1960 (MARTIN *et al.*, 2004).

O processo de hidrogenação parcial dos óleos vegetais poli-insaturados produz isomerização de algumas duplas ligações e migração de outras, resultando no aumento

da concentração de ácidos graxos *trans* e gerando gorduras com ponto de fusão mais alto, maior plasticidade e melhor estabilidade oxidativa que os óleos originais. Por esses motivos, no passado, a formação de ácidos graxos *trans* chegou a ser considerada um aspecto vantajoso da reação de hidrogenação (PETRAUSKAITE *et al.*, 1998). Além do processo de hidrogenação, os isômeros geométricos *trans* de ácidos graxos insaturados são também formados no processo de fritura (SANIBAL & FILHO, 2004).

O principal efeito da ingestão de ácidos graxos *trans* sobre a saúde está relacionado ao aumento das LDL (*Low-density lipoprotein*) - colesterol no plasma, de forma semelhante aos ácidos graxos saturados, e, portanto, ao aumento do risco de aparecimento das doenças cardiovasculares. A ingestão de *trans* tem sido correlacionada com a etiologia de várias disfunções metabólicas, como por exemplo, a inibição do metabolismo de ácidos graxos essenciais, que pode afetar o desenvolvimento infantil (MARTIN *et al.*, 2006). A ingestão de *trans* também pode afetar o processo inflamatório na arterosclerose, por promover o aumento da produção de citocinas inflamatórias nas células periféricas mononucleadas do sangue (LIBBEY *et al.*, 2002). Adicionalmente, estudos realizados por MANTZIORIS *et al.* (1994) e KUMMEROW *et al.* (2004) demonstraram que os ácidos graxos *trans* inibem o metabolismo que converte os ácidos linoléico e α -linolêncio em ácido araquidônico, eicosapentaenóico e docosahexaenóico, além de inibir a formação das prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina, compostos importantes na regulação da pressão arterial, frequência cardíaca e resposta imunológica, além de atuarem nos processos de coagulação sanguínea e no funcionamento do sistema nervoso central.

1.6.2. Alterações nos processos tecnológicos visando à obtenção de produtos mais saudáveis

Embora a ingestão de ácidos graxos saturados seja um assunto de atual e constante discussão, DECKERE & VERSCHUREN (2000) afirmaram que já na década de 50, pesquisadores alertavam a respeito dos malefícios causados pela ingestão desses ácidos graxos e seu efeito sobre a ocorrência de doenças cardiovasculares.

Devido aos problemas citados anteriormente, produtos com reduzidas concentrações de lipídios são cada vez mais populares entre os consumidores (RYHÄNEN *et al.*, 2001). Consequentemente instalou-se uma tendência mundial, por parte da indústria alimentícia, em reduzir a concentração de lipídios totais nos alimentos, bem como reduzir a proporção dos lipídios indesejáveis (saturados e *trans*) (McCLEMENTS, 2005; MALLA *et al.*, 2007).

Segundo LARQUÉ *et al.* (2001) os alimentos contendo gordura parcialmente hidrogenada podem contribuir com cerca de 80% a 90% da ingestão diária de *trans*. Para alimentos provenientes de animais ruminantes, esta contribuição é bem menor, sendo estimada em torno de 2% a 8%. Os óleos refinados apresentam níveis de ácidos graxos *trans* considerados razoavelmente baixos: 1,0 a 1,5%. Entretanto, a reutilização desses óleos, principalmente no preparo de alimentos fritos, pode tornar significativa a sua contribuição na ingestão diária de *trans* (SANIBAL & FILHO, 2004).

As gorduras parcialmente hidrogenadas podiam ser facilmente encontradas em um grande número de alimentos processados, como margarinas, massas; formulações bases para sopas e cremes, coberturas; sorvetes; biscoitos, produtos de pastelaria; biscoitos recheados e produtos de panificação, como pães, bolos, tortas e massas, dentre outros alimentos industrializados (TINOCO *et al.*, 2007). Entretanto, atualmente, as gorduras hidrogenadas estão sendo substituídas pelas indústrias de alimentos por

matérias-primas que não são submetidas a esse processo, como por exemplo, os óleos vegetais interesterificados.

Com o objetivo de reduzir os lipídios saturados presentes nos alimentos processados, as indústrias alimentícias passaram a substituir, progressivamente, a gordura de origem animal por óleos e gorduras de origem vegetal. Os óleos vegetais, por sua vez, possuem em sua constituição alta percentagem de ácidos graxos insaturados (GARG *et al.*, 2006).

Em 2002, ROBINSON & RAJAH relataram que margarinas com baixa concentração ou isentas de ácidos graxos *trans* configuravam entre os principais produtos adquiridos por consumidores. Atualmente, a procura por alimentos mais saudáveis, bem como o conhecimento dos malefícios causados ao organismo humano pela ingestão de ácidos graxos *trans*, requer cada vez mais da indústria alimentícia produtos com a funcionalidade desejada, porém, que sejam ricos em ácidos graxos mono e poli-insaturados e isentos de ácidos graxos *trans*.

Em 1994, os órgãos Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) e World Health Organization (WHO) recomendaram que o consumo de ácidos graxos *trans* por humano fosse menor que 4% do total de lipídios ingeridos, notificando a indústria alimentícia a reduzir a concentração de *trans* em seus produtos a percentagens abaixo dessa marca (TAVELLA *et al.*, 2000). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu a Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003, que aprovou o regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados, sendo que os teores de isômeros *trans* nos produtos alimentícios deveriam ser declarados em seus respectivos rótulos. Para tal, as empresas tiveram prazo até 31 de julho de 2006 para se adequarem às exigências (ANVISA, 2003).

A utilização de óleos vegetais como o óleo de milho, canola, girassol e soja, entre outros, pode resultar em produtos mais saudáveis e com características sensoriais desejáveis, promovendo equilíbrio na nutrição, além de possuírem custos de produção mais baixos (RODRIGUES *et al.*, 2003).

Como exemplo da utilização de um desses óleos, pode-se citar a utilização do óleo de soja, que entre os anos de 1951 e 2000, configurou como o óleo predominante nas formulações de margarina nos Estados Unidos, provavelmente devido a aspectos econômicos e à presença de ácidos graxos poli-insaturados (O'BRIEN, 2009). Com relação ao equilíbrio na nutrição, pode-se citar a utilização de óleos ricos em ácido oléico, como o óleo de canola, uma vez que a substituição de ácidos graxos saturados por insaturados (principalmente ácido oléico) pode contribuir para a redução dos níveis de colesterol sanguíneo e consequente risco de incidência de doenças cardiovasculares, dentre outras (DECKERE & VERSCHUREN, 2000).

1.6.3. Óleo de canola e óleo de palma: importância na tecnologia de fabricação de margarinas e na saúde humana

O óleo de canola é um dos mais importantes óleos produzidos em diferentes partes do mundo. Nos últimos anos, devido à grande adaptação da canola a diferentes condições climáticas, sua produção tem recebido maior atenção por parte dos produtores e a área cultivada aumentou de 19.000 (em 2000) para 280.000 hectares em 2006 (OMIDI *et al.*, 2010).

O óleo de canola configura, dentre os óleos citados anteriormente, como um dos mais saudáveis, por possuir elevada concentração de ácidos graxos ômega-3 (ω -3 ou n-3) que auxiliam na redução dos níveis de triglicerídeos e auxiliam no controle da arterosclerose. Adicionalmente, é fonte de vitamina E (antioxidante que reduz radicais

livres), ácidos graxos poli-insaturados (reduzem LDL) e possui o menor teor de ácidos graxos saturados (pode, portanto, auxiliar no controle do colesterol sanguíneo), quando comparado aos demais óleos vegetais. Por esses motivos, o óleo de canola é classificado por médicos e nutricionistas como sendo um óleo de composição equilibrada em ácidos graxos, indicado para integrar uma dieta saudável (EMBRAPA, 2008; KIM *et al.*, 2008). O óleo de canola é apropriado para a produção de margarinas e/ou cremes vegetais, devido ao seu alto conteúdo de ácidos graxos benéficos, que possuem efeito neutro sobre o colesterol plasmático, além de favorecer propriedades de aroma aos produtos (KIM *et al.*, 2005).

Da mesma maneira, o óleo de palma possui importantes componentes funcionais, incluindo carotenóides, tocoferóis, fosfolipídios, fitosteróis, e coenzima Q10 (Co Q10). Além disso, o baixo teor de ácidos graxos poli-insaturados (faixa variável entre 9-12% de C 18:2 e aproximadamente 0,5% de C 18:3), associado à presença de tocoferóis e tocotrienóis torna esse óleo altamente estável à oxidação (CODEX ALIMENTARIUS, 2005; AINI & MISKANDAR, 2007).

O óleo de palma é derivado do mesocarpo dos frutos da palmeira oleaginosa *Elaeis guineensis*, que contém de 45 a 55% de óleo, e no ano de 2008 ocupou a primeira posição na produção mundial de óleos e gorduras, sendo largamente utilizado pela indústria alimentícia na produção de margarinas, massas de sorvetes, achocolatados, extrusados, gorduras para frituras, panificação e biscoitos, devido à sua estabilidade, características físicas e preço competitivo (ONG *et al.*, 1995; EDEM, 2002; GARBOLINO *et al.*, 2005; TAN *et al.*, 2007; TANAKA *et al.*, 2007; AGROPALMA, 2008; MALAYSIAN PALM OIL BOARD, 2008). O óleo de palma é extraído por métodos físicos (prensagem mecânica) sem uso de solventes ou outras substâncias químicas. O refino deste óleo é feito de forma natural (fisicamente) - apenas produtos naturais são usados no seu processamento (exemplo: ácido cítrico). Isso difere dos processos

convencionais de refino químico que utilizam soda cáustica para a neutralização dos ácidos graxos livres. No refino físico do óleo de palma os ácidos graxos livres são removidos por destilação (AGROPALMA, 2008).

Segundo RODRIGUES *et al.* (2003) o aumento na procura do consumidor por *spreads* (margarinas ou cremes vegetais) que, além de serem agradáveis ao paladar, possuam boas propriedades físicas como textura e cremosidade, tem servido de impulso para a produção industrial de manteigas modificadas ou produtos à base de manteiga. Dessa maneira, o desenvolvimento de margarinas contendo menor teor de lipídios, utilizando-se misturas de óleos e gorduras que contenham menores teores de ácidos graxos saturados e isentos de isômeros *trans*, como misturas de óleo de palma e óleo de canola, parece promissor, uma vez que a procura por alimentos considerados mais saudáveis, como alimentos probióticos, prebióticos e com baixa concentração de lipídios saturados vem aumentando significativamente.

1.6.4. Utilização de óleo de palma na fabricação de *spreads*: vantagens para a indústria de alimentos

O óleo de palma, bem como os produtos obtidos com sua utilização, desempenha papel importante dentro da indústria de alimentos. Tal gordura é considerada única em termos de composição em triacilgliceróis e pode ser modificada fisicamente por fracionamento, além dos processos de hidrogenação e interesterificação, que modificam suas características químicas e físicas, a fim de obter-se o produto desejado. O fracionamento seguido da reação de interesterificação também pode ser utilizado para a obtenção de gorduras apropriadas para a fabricação de margarinas, que não contenham componentes hidrogenados (UPRITCHARD *et al.*, 2005).

Desde 1920, o processo de interesterificação vem sendo utilizado para a produção de *spreads* (margarinas e/ou cremes vegetais) com composição, propriedades físicas e nutricionais específicas. Tal processo oferece a possibilidade da distribuição dos ácidos graxos na molécula de glicerol de maneira randomizada ou a incorporação de outros ácidos graxos nos triacilgliceróis (DECKERE & VERSCHUREN, 2000; AINI & MISKANDAR, 2007; SILVA *et al.*, 2008).

Produtos como margarinas e *shortenings* são alimentos plásticos e semi-sólidos que contém óleo líquido e gordura solidificada (cristalizada) em sua estrutura. O emprego do óleo de palma para a fabricação desses produtos é considerado muito apropriado, uma vez que, naturalmente, essa gordura é semi-sólida a temperatura ambiente, ao contrário de outras que apresentam-se mais consistentes nessa mesma condição. Essa propriedade é devida à sua composição balanceada em ácidos graxos. Conforme citado anteriormente, a baixa concentração de ácidos graxos poli-insaturados, juntamente com a presença de tocoferóis e tocotrienóis, que são antioxidantes naturais, faz com que o óleo de palma torne-se resistente à oxidação. Por isso, o óleo de palma promove estabilidade oxidativa em produtos como margarinas e *shortenings*.

Misturas de óleo de palma, oleína de palma e estearina de palma com outros tipos de óleos e gorduras podem resultar em gorduras com boa plasticidade para a utilização na indústria de alimentos. Por outro lado, formulações contendo altas concentrações de óleo de palma cristalizam lentamente. A cristalização lenta se dá devido à composição em triacilgliceróis e à presença de diacilgliceróis (5-8%) no óleo de palma (IDRIS & DIAN, 2005; LIN & YOO, 2009).

O óleo de palma e os seus subprodutos tornaram-se importantes para a indústria de alimentos. Tal óleo é considerado único entre os óleos vegetais e gorduras, quando considerada sua composição em ácidos graxos: as concentrações de ácidos

graxos saturados (aproximadamente 50%) e insaturados (aproximadamente 39% de monoinsaturados e 11% de poli-insaturados) são equivalentes (AINI & MISKANDAR, 2007).

O óleo de palma quando presente nesses produtos pode proporcionar melhora na consistência, textura e estrutura dos produtos (AINI & MISKANDAR, 2007). Tal fato apresenta-se como uma vantagem para a indústria de alimentos, uma vez que durante muitos anos, o perfil de textura de alimentos permaneceu como um atributo esquecido, por receber pequena atenção por parte dos consumidores, quando comparado ao sabor. Posteriormente, passou a ser considerado um dos maiores determinantes da preferência e aceitação de alimentos e bebidas, de maneira que a textura, juntamente com a aparência e sabor, passou a ser considerada uma das características mais importantes para os alimentos, especialmente para os produtos que se encontram na categoria dos chamados *spreads* (GUINARD & MAZZUCHELLI, 1996; KOLANOWSKI *et al.*, 2004). O perfil de textura pode ser considerado como a manifestação das propriedades reológicas do material, sendo um atributo muito importante nos alimentos, já que pode ser afetado pelas condições de processamento e armazenamento. Por isso, o conhecimento das propriedades reológicas de produtos como margarinas tornou-se importante para o processo industrial, controle da qualidade e no desenvolvimento de novos produtos (SEGURA *et al.*, 1995).

É importante ressaltar que em processos tecnológicos para fabricação de margarinas, a aplicação do óleo de palma apresenta-se como boa alternativa para a substituição de gorduras que tenham sido submetidas ao processo de hidrogenação. A hidrogenação parcial dos óleos vegetais poli-insaturados, catalisada principalmente por níquel, produz isomerização de algumas duplas ligações e migração de outras resultando no aumento dos ácidos graxos *trans* e gerando gorduras com ponto de fusão mais alto, maiores plasticidade e estabilidade oxidativa que os óleos originais.

Além disso, a hidrogenação aumenta a vida de prateleira das gorduras submetidas a esse processo e altera suas propriedades físicas, de maneira que tais gorduras apresentem propriedades bem diferentes do seu estado original (VEGA-LÓPEZ *et al.*, 2006). Sendo assim, a hidrogenação parcial permite a obtenção de produtos interessantes dos pontos de vista industrial e comercial. Entretanto, tal processo trouxe introdução dos ácidos graxos *trans* em quantidades consideráveis na dieta humana moderna, o que pode originar diversos problemas no metabolismo humano (VAZ *et al.*, 2006), conforme discutido anteriormente.

Devido a questões de saúde e nutrição, a produção de óleos e gorduras isentos ou com baixas concentrações de *trans* tem aumentado. Para tal, são necessárias modificações nos processos de produção. Assim, alternativas para o processo de hidrogenação estão sendo empregadas pela indústria alimentícia que atualmente tem utilizado com maior frequência a interesterificação para a obtenção desses produtos com baixas concentrações ou isentos de ácidos graxos *trans* (AINI & MISKANDAR, 2007; KARUPAIAH & SUDRAM, 2007).

1.7. Breve histórico: as modificações na produção industrial de margarinas visando produtos mais saudáveis

A margarina foi inicialmente desenvolvida em 1869, pelo químico francês Hippolyte Mège Mouriès, após o Imperador da França Luiz Napoleão III ter oferecido um prêmio para a pessoa que desenvolvesse um produto substituto de manteiga, porém, mais barato e fácil de ser conservado. As indústrias produtoras de manteiga apresentavam quedas em suas produções devido à baixa na produção de leite no Oeste Europeu. Após a invenção da margarina, Mouriès patenteou o produto, que recebeu o nome de “*oléomargarina*”. Outros registros apontam que, devido ao fato de o

produto inventado possuir um tom perolado, recebeu o nome de margarina – do grego *margaron* (pérola) (BECCEL, 2008). Assim, a margarina foi inventada para substituir a manteiga de maneira suficientemente econômica e nutritiva. Tal produto foi comercializado pela primeira vez pela companhia americana “T. Wilson and Co. (USA)” que introduziu a chamada “*yellow margarine*” no mercado americano (O'BRIEN, 2009; AINI & MISKANDAR, 2007). O grande aumento na popularidade desse produto se deu devido à possibilidade de alterações físicas no produto de acordo com sua finalidade e/ou aplicação.

A partir de 1920, a qualidade das margarinas aumentou significativamente. Durante o processo de fabricação, óleos vegetais hidrogenados eram extensivamente utilizados com gordura animal, que foi parcialmente substituída pela adição de gordura de coco. No ano seguinte, taxas excessivas incidentes sobre produtos importados, dentre eles a gordura de coco, impediu a utilização dessa matéria-prima na fabricação de margarinas. Com isso, desenvolveu-se a fabricação deste produto com dois outros óleos vegetais disponíveis: óleo de soja e de algodão.

A maior inovação na produção de margarinas ocorreu no ano de 1927, quando foram produzidas, pela primeira vez, margarinas adicionadas de vitaminas. Depois, em 1950, o desenvolvimento da tecnologia trouxe melhorias ao produto: começou-se a utilizar uma folha de alumínio para envolver os produtos, oferecendo, dessa maneira, maior proteção contra a oxidação. Ao mesmo tempo, tal modificação trouxe maior aceitação dos produtos por parte dos consumidores. Em 1956, a margarina (denominada na época de *premium*), formulada com aroma de manteiga e que necessitava de condições de estocagem sob refrigeração, foi introduzida no mercado com sucesso.

Um ano depois, o consumo *per capita* de margarinas ultrapassou o de manteiga nos Estados Unidos e em 1958, a margarina produzida com óleo de milho foi

apresentada ao mercado consumidor, obtendo sucesso de vendas, uma vez que o produto chamava a atenção por apresentar altas concentrações de um ácido graxo essencial: o ácido linoléico. No início da década de 60, foram introduzidos no mercado americano os produtos chamados *soft tubs*, seguidos da margarina na forma líquida. Nesse período, a Unilever desenvolveu o primeiro produto contendo concentração variando entre 50 e 55% de ácidos graxos poli-insaturados, que foi inserido na dieta em substituição à utilização da manteiga. Originalmente, esse produto era distribuído ao consumidor via venda em farmácias e durante os três primeiros anos de comercialização, só podia ser comprado com prescrição médica (UPRITCHARD *et al.*, 2005).

Depois, em 1962, a primeira margarina *soft* embalada em potes de plástico chegava ao mercado. Em 1964, um produto contendo metade das calorias presentes em uma margarina comum foi introduzido no mercado americano. Nessa mesma década, aproximadamente no ano de 1965, surgiram no mercado os produtos considerados “saudáveis para o coração”, ricos em ácidos graxos poli-insaturados, bem como as halvarinas contendo baixas calorias (produtos de base lipídica produzidos com lipídios de origem vegetal e sem adição de leite, atualmente classificada como creme vegetal).

Em 1968, as indústrias de margarinas investiram em *marketing* e as embalagens apresentaram-se mais decoradas para atrair o consumidor. Em 1973, no Brasil, a Unilever lançou a margarina Becel®: o nome do produto vinha da idéia original do projeto da empresa - "*Blood Cholesterol Lowering*" - ou “redução do nível de colesterol no sangue”. A campanha publicitária realizada na época era voltada para a prevenção de problemas cardiovasculares, assunto que até então não despertava interesse do público. No fim da década de 70, as halvarinas contendo diferentes concentrações de conservantes foram apresentadas ao mercado consumidor pela primeira vez.

Entre os anos de 1975 e 1980, as concentrações de lipídios nos produtos tradicionais disponíveis para comercialização começaram a ser reduzidos. Surgiam assim, os chamados “produtos com teor reduzido de lipídios” (contendo cerca de 60%). Em 1981, produtos contendo mistura de margarina e manteiga foram lançados no mercado. Tais produtos continham concentrações de 5 a 40% de manteiga e o preço variava entre os valores da manteiga e da margarina, quando vendidos separadamente. Além disso, apresentavam aroma de manteiga bem definido, porém, com mais benefícios à saúde e com propriedades de espalhabilidade característicos de margarinas. No final dessa mesma década, surgiram os produtos com teor de lipídios ainda mais reduzidos: 20%. Nesse mesmo período, a Unilever relançou a margarina Becel®, dessa vez contendo óleo de girassol em sua composição, para auxiliar na redução e no controle do colesterol. Com isso, a empresa reforçou a idéia de saúde associada ao produto. Em 1995, foi lançado o produto contendo vitaminas. Depois, em 1998, o primeiro produto com benefícios à redução do colesterol foi lançado (Benecol®), seguido pela margarina Becel pro-activ®, em 2000, enriquecido com fitosteróis – extratos naturais de óleos vegetais que podem reduzir os níveis de colesterol total e LDL (ANTTOLAINEN *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2004; BECEL, 2008).

Mais recentemente, em 2006, surgiu no mercado mais um produto visando à promoção de saúde: uma margarina enriquecida com Folic B (ácido fólico + vitamina B6 + vitamina B12) (ROBINSON & RAJAH, 2002; BECEL, 2007).

Frente a essas constantes modificações nos produtos disponíveis para comercialização, o estudo e desenvolvimento da tecnologia de produção de margarina probiótica e simbiótica parece ser um importante complemento à linha de margarinas já desenvolvidas anteriormente.

1.8. A suplementação de margarina visando à obtenção de produtos mais saudáveis

Além do desenvolvimento de novas tecnologias para a obtenção de novos alimentos atraentes ao consumidor, a indústria também procura oferecer produtos com alegações de “mais saudáveis”.

Dentre esses novos alimentos, pode-se destacar, atualmente, barras de cereais, sorvetes à base de extrato solúvel de soja, suco de laranja fortificado com cálcio, alimentos com teor reduzido de lipídios e margarinas que podem auxiliar na redução do colesterol sanguíneo (PARVEZ *et al.*, 2006; CHENG *et al.*, 2008).

Conforme discutido no item anterior, a suplementação de margarinas com ingredientes que possam tornar esse tipo de produto mais saudável e mais atrativo ao consumidor vem aumentando progressivamente. Sendo assim, a indústria de margarinas vem dando atenção especial à matérias-primas como compostos bioativos, fibras, fitosteróis/fitostanóis, óleos vegetais poli-insaturados, dentre outros ingredientes, que já estão presentes em margarinas comerciais.

Os fitosteróis são componentes naturais presentes nas membranas celulares de plantas. Na dieta, esses componentes são encontrados em uma variedade de castanhas, sementes, legumes, vegetais e óleos vegetais não refinados (FAHY *et al.*, 2004). Os fitosteróis não podem ser sintetizados *in vivo*. Portanto, devem ser obtidos através da dieta. A dieta rica em óleos vegetais é uma importante fonte de fitosteróis: a ingestão diária de 30 gramas de óleo de milho pode fornecer 286 miligramas de fitosteróis, quantidade esta considerada bioativa na redução do colesterol sanguíneo (GYLLING & MIETTINEN, 2000).

No Brasil, a adição de fitosteróis a alimentos é permitida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008). Tais componentes são importantes para a

saúde humana, uma vez que eles reduzem a absorção do colesterol proveniente da dieta, ou seja, são capazes de atuar na redução dos níveis de colesterol total e lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Margarinas adicionadas de fitosteróis também são chamadas de margarinas funcionais, uma vez que possuem tais compostos benéficos (RACT & GIOIELLI, 2008; ADHIKARI *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, *spreads* com propriedades capazes de reduzir o nível de colesterol vêm ganhando relevância, devido à introdução de margarinas funcionais no mercado, como, por exemplo, a margarina Becel da Unilever, chamada Becel pro-activ[®], contendo fitosteróis, que auxiliam na diminuição dos níveis de colesterol sanguíneo (SIRÓ *et al.*, 2008).

JONG *et al.* (2007) estudaram o efeito do consumo de margarinas enriquecidas com fitosteróis e estanois sobre o colesterol sanguíneo. Os pesquisadores observaram que embora não atue igualmente aos efeitos de um medicamento para esse mesmo fim, as concentrações totais de colesterol podem ser reduzidas com a ingestão de margarinas enriquecidas com tais compostos. Assim, a margarina funcional enriquecida com fitosteróis, pode atuar positivamente sobre a saúde, combinada ou não à utilização de medicamentos que possuem a finalidade de atuar na redução do colesterol sanguíneo.

Ainda relacionado ao estudo de margarinas funcionais, GOLI *et al.* (2008) demonstraram que a incorporação de CLA (ácido linoléico conjugado) à margarina é possível. A principal fonte natural de CLA está nos produtos derivados de ruminantes (carne e produtos lácteos). Nos óleos vegetais, o CLA está presente em pequenas quantidades, e é formado durante o processo de refino (principalmente na etapa de desodorização) (GNADIG *et al.*, 2003). Após a realização da reação de interesterificação enzimática entre o CLA (mistura dos isômeros *cis*9, *trans*11 e *trans*10, *cis*12) e óleo de canola, GOLI *et al.* (2008) estudaram diferentes

concentrações de mistura desse lipídio estruturado com estearina de palma e concluíram que é possível a obtenção de uma mistura lipídica adequada para a formulação de margarinas ou produtos similares, livre de ácidos graxos *trans* e enriquecida com o CLA, um ingrediente funcional.

O estudo de manteigas funcionais, quando comparado aos estudos realizados com margarinas, ainda é pouco explorado, porém, a manteiga é alimento que pode ser modificado de maneira a tornar-se mais saudável. JIMENEZ *et al.* (2008) avaliaram sensorialmente diferentes produtos lácteos adicionados de ácido linoléico conjugado (CLA). Os pesquisadores concluíram que é possível a incorporação de concentrações superiores de CLA às aquelas encontradas normalmente na manteiga. Além disso, a manteiga suplementada apresentou aceitação sensorial significativamente superior (65%) quando comparada com leite e iogurtes, também suplementados com CLA.

Na Bélgica, uma manteiga com baixos níveis de colesterol é comercializada desde 1992. Durante a fabricação deste produto o colesterol presente no leite foi removido pela adição de beta-ciclodextrina. A adição desse composto forma um complexo estável com o colesterol, que é facilmente removido da manteiga. Mais de 90% do colesterol total pode ser removido através da utilização desta técnica (SZENTE & SZEJTLI, 2004).

É de grande interesse para a indústria o emprego de óleos vegetais ricos em ômega-3 na produção de margarinas, além da adição de outros ingredientes funcionais, uma vez que tais componentes resultam no aumento da qualidade funcional desses produtos (ALAMED *et al.*, 2006).

Desta maneira, a suplementação de margarinas com ingredientes funcionais, como fibras, a utilização de óleos vegetais ricos em ácidos graxos poli-insaturados em sua fabricação e a utilização de tecnologias para a modificação de lipídios são importantes ferramentas para a obtenção de margarinas funcionais. Além disso, a

suplementação de margarinas com microrganismos probióticos apresenta-se como um importante avanço na tecnologia de fabricação desses alimentos.

1.9. A margarina como produto alimentício em potencial para a administração de microrganismos probióticos

A margarina está incluída no grupo de alimentos chamados de *spreads* e possui grande variedade de aplicações, desde a utilização na culinária à aplicação em pães e similares, podendo apresentar-se nas formas de margarinas duras, cremosas, aeradas e líquidas (GIOIELLI, 1996a; DELAMARRE & BATT, 1999).

Desde sua invenção, em 1869, a tecnologia de fabricação da margarina passou por grande desenvolvimento e aprimoramento. Esse desenvolvimento progressivo pode ser constatado através da grande variedade de margarinas disponíveis no mercado mundial. Inicialmente, a fabricação desse produto restringia-se apenas à adição de ingredientes necessários à sua obtenção como água, sal e conservantes. A fase oleosa dos produtos consistia da adição de corantes, aromatizantes, lecitina de soja e emulsificantes monoacilgliceróis, solubilizados em mistura de óleos vegetais parcialmente hidrogenados ou, ocasionalmente, gordura animal. Em alguns casos, proteínas do leite e ingredientes espessantes também eram utilizados como emulsificantes (BONVANKAR *et al.*, 1992; AINI & MISKANDAR, 2007).

O processo de fabricação de margarinas envolve a formação de uma emulsão, a partir da mistura de uma fase aquosa (que contém todos os ingredientes hidrossolúveis – leite em pó desnatado, sal, conservante e acidulante) a uma fase oleosa (contendo todos os ingredientes lipossolúveis – emulsificante, estabilizante, aromatizante, conservante, antioxidante e corante) (WILLEY, 2001; MISKANDAR *et al.*, 2002; MUNÓZ *et al.*, 2007).

Em margarinas com teor reduzido de lipídios, eventualmente, pode-se utilizar ingredientes como gelatina, alginato de sódio, pectina, carragena ou amidos modificados na fase aquosa para obtenção de um produto com características reológicas desejáveis, uma vez que esses ingredientes dão estrutura à fase aquosa (GUNSTONE, 2002; UPRITCHARD *et al.*, 2005).

O processo de emulsificação promove a formação de um produto gorduroso estável, no qual a fase aquosa se distribui. Essa etapa é considerada muito importante, uma vez que a emulsificação assegura que o desenvolvimento dos cristais (durante o processo de cristalização) ocorrerá na forma desejada na margarina (MISKANDAR *et al.*, 2002).

Uma emulsão é definida pela mistura formada por dois líquidos imiscíveis, onde um é uniformemente distribuído no outro sem separação de fases. Óleo e água são os dois principais componentes das emulsões em alimentos, com ingredientes sólidos ou semi-sólidos na fase dispersa ou na fase contínua. Esses sistemas são chamados emulsão óleo em água ou água em óleo (Figura 6) (MUNÓZ *et al.*, 2007).

Para reduzir a tensão interfacial entre os dois líquidos em questão (água e óleo) são utilizados os emulsificantes. Os emulsificantes mais empregados são os monoacilgliceróis e os diacilgliceróis. Ambos possuem baixos valores de equilíbrio hidrofílico lipofílico (HLB - *hydrophilic-lipophilic-balance*), o que auxilia a estabilizar emulsões água em óleo, como a margarina (RANJITH, 2002).

A estrutura da emulsão (tamanho dos glóbulos de água e sua distribuição) é de grande importância em alimentos, não somente para a estabilidade física do sistema durante a produção e armazenamento dos mesmos, mas também para a estabilidade microbiológica e propriedades sensoriais (SKODVIN *et al.*, 1994).

Figura 6. Representação da estrutura de emulsões óleo em água **(a)** e água em óleo **(b)**. Adaptado de RANJITH (2002).

A etapa de cristalização da gordura, realizada após a emulsificação, contribui para a formação de uma rede sólida de cristais, que estabiliza a emulsão, uma vez que essa rede retém os glóbulos de água e o óleo líquido que constituem o produto. As substâncias sólidas ou semi-sólidas presentes podem estar na forma de cristais, como ocorre, por exemplo, em sorvetes, manteigas e margarinas (RANJITH, 2002). Além disso, a quantidade de cristais de gordura sólida influencia a estrutura, textura e consistência do produto (UPRITCHARD *et al.*, 2005) (Figura 7).

Figura 7. **(a)** Micrografia ilustrando a estrutura da gordura cristalizada em margarina. **(b)** Representação da estrutura física da margarina. Adaptado de UPRITCHARD *et al.* (2005).

Nas indústrias, habitualmente, o processo de cristalização é realizado rapidamente, sob refrigeração, em uma unidade denominada *tube cooler (A-unit)*, para que se obtenha uma rede estruturada de cristais de gordura, na qual os glóbulos de água estão separados entre si pelo cristal de gordura (AINI & MISKANDAR, 2007). A consistência apresenta-se como um aspecto funcional importante dessas gorduras: a relação entre as duas fases e o caráter cristalino da fase sólida determinam a consistência e a firmeza dos produtos (SIMÕES *et al.*, 1998; RANJITH, 2002).

É importante ressaltar que a cristalização influencia as características do produto, uma vez que o tamanho e a forma dos cristais podem variar, devido às condições de processo empregadas.

Atualmente, a indústria alimentícia oferece vários tipos de margarina ao consumidor. Tais produtos são bastante diversificados no que diz respeito a seus ingredientes: fibras, vitaminas, iogurte, fitosteróis e diferentes tipos de óleos (soja, girassol, canola e oliva, entre outros) e à tecnologia aplicada para sua obtenção (AINI & MISKANDAR, 2007).

Mundialmente, a composição das margarinas varia entre os países. Nos Estados Unidos, a margarina é um alimento formado por uma emulsão plástica ou líquida que chegou a ser produzida com pelo menos 80% de lipídios. Na Europa, esses alimentos eram obtidos a partir de gorduras animais e/ou vegetais, com teor de gordura variando entre 80 e 90% (DELAMARRE & BATT, 1999). Entende-se por gorduras plásticas as misturas de cristais de gordura sólida e óleo líquido (SIMÕES *et al.*, 1998; RANJITH, 2002).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento define margarina como o produto gorduroso em emulsão água em óleo estável com leite ou seus constituintes ou derivados e outros ingredientes, destinados à alimentação humana com cheiro e sabor característicos. Estabelece ainda que, quando presente, a

gordura láctea não deverá exceder a 3% m/m do teor de lipídios totais, que devem estar presentes na concentração máxima de 95%. Caso a margarina seja adicionada de vitamina, o produto deve conter vitamina A ou provitamina A equivalente a, no mínimo, 15.000 Unidades Internacionais (U.I.) e no máximo, 50.000 U.I. de vitamina A, por quilo; e poderá conter de 500 a 2.000 U.I. de vitamina D, por quilo (BRASIL, 1997).

A legislação brasileira, através da Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, estabelece que creme vegetal é o produto em forma de emulsão plástica ou fluida, constituído principalmente de água e óleo vegetal e/ou gordura vegetal, podendo ser adicionado de outro(s) ingrediente(s) (ANVISA, 2005).

Segundo DELAMARRE & BATT (1999) algumas modificações nas composições de margarinas são realizadas, em virtude da necessidade da criação de novos produtos, com propriedades desejáveis pelo consumidor, como, por exemplo, maior estabilidade e espalhabilidade em temperaturas de refrigeração.

Diante de tal fato, a incorporação de ingredientes à margarina, diferentes dos utilizados frequentemente, como inulina e concentrados protéicos, que podem atuar como substratos para o metabolismo de bactérias probióticas, apresenta-se como uma alternativa viável para a obtenção de margarina probiótica, uma vez que esses ingredientes, assim como os microrganismos probióticos, estarão concentrados dentro dos glóbulos de água, que constituem a fase aquosa do produto (Figura 8).

Figura 8. Inulina distribuída no interior dos glóbulos de água em emulsão água em óleo. Adaptado de FRANCK (2008).

Além disso, diversos autores defenderam em trabalhos científicos que altas concentrações de lipídios presentes em determinados produtos, como é o caso de alguns tipos de queijos, pode conferir proteção às bactérias probióticas durante a sua passagem pelo trato gastrointestinal humano. Essa proteção tornaria possível que o microrganismo chegue ao cólon viável e em concentrações adequadas para resultar em efeito benéfico sobre a saúde do mesmo (GARDINER *et al.*, 1998; STANTON *et al.*, 1998; DAIGLE *et al.*, 1999; CORBO *et al.*, 2001; HELLER *et al.*, 2003; BOYLSTON *et al.*, 2004; BERGAMINI *et al.*, 2005). Desta maneira, a margarina, por ser um produto que possui alto teor de lipídios, quando comparado a outros produtos como queijos e iogurtes, pode se revelar uma matriz alimentícia adequada para incorporação e sobrevivência de probióticos durante a passagem pelo trato gastrointestinal humano.

2. OBJETIVOS

- Desenvolver uma margarina probiótica, adicionada da cultura comprovadamente probiótica de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, suplementada ou não dos ingredientes inulina, concentrado protéico de soro (WPC) e concentrado de caseína (caseínomacropeptídeo – CMP);
- Verificar a viabilidade da cepa probiótica de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 em margarina elaborada com ou sem adição de inulina, WPC e CMP;
- Caracterizar o produto e avaliar a sua aceitabilidade sob o ponto de vista sensorial e suas características físico-químicas, microbiológicas e de textura instrumental, durante o armazenamento refrigerado;
- Realizar estudo *in vitro* para avaliar a resistência do microrganismo probiótico adicionado ao produto desenvolvido às condições simuladas do trato

gastrintestinal e para verificar a influência dos ingredientes adicionados (inulina, WPC e CMP) sobre essa resistência.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

No presente trabalho, o delineamento experimental para misturas de três fatores e um ponto central foi utilizado (BARROS NETO *et al.*, 2007). Os fatores avaliados foram os ingredientes inulina (x_1), concentrado protéico de soro (WPC) (x_2) e concentrado de caseína (CMP) (x_3). Esses ingredientes foram adicionados em diferentes proporções durante a fabricação da margarina produzida com 60% de lipídios, formulando uma mistura, porém sempre totalizando 3% da formulação final do produto (Tabela 1).

Sete (7) diferentes tipos de margarina foram estudadas, todas formuladas com 60% de lipídios, com as seguintes variáveis: adição de inulina (Beneo ST-Gel, Orafiti), concentrado protéico de soro (WPC, Lacprodan 80, Arla Food Ingredients) e concentrado de caseína (Lacprodan CGMP-10; Arla Foods Ingredients), nas proporções definidas na Tabela 2. A formulação controle (M8) não foi adicionada dos ingredientes inulina, WPC e CMP. Cada formulação foi produzida em triplicata.

Tabela 1. Delineamento experimental empregado na fabricação das margarinas*.

Experimento	<i>B. animalis</i> Bb - 12 ¹	Inulina ² (x_1)	WPC ³ (x_2)	CMP ⁴ (x_3)	Resultado experimental
M1	+	1	0	0	$\hat{y}_1$
M2	+	0	1	0	$\hat{y}_2$
M3	+	0	0	1	$\hat{y}_3$
M4	+	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0	$\hat{y}_{12}$
M5	+	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$	$\hat{y}_{13}$
M6	+	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\hat{y}_{23}$
M7	+	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\hat{y}_{123}$

+ Presente.

x_1 , x_2 e x_3 representam a proporção dos três ingredientes na mistura.

¹ Cultura probiótica de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Christian Hansen).

² Inulina Beneo ST-Gel (Orafti): 92% de inulina, 8% glicose+fructose+sacarose, GP ≥ 10 .

³ Concentrado protéico de soro (Arla Foods Ingredients).

⁴ Concentrado de caseína (Arla Foods Ingredients).

* Formulação M8 - controle: sem adição dos ingredientes inulina, WPC e CMP.

Tabela 2. Descrição das variáveis envolvidas na fabricação das margarinas*.

Experimento	Cultura probiótica ¹	Inulina ² (%)	WPC ³ (%)	CMP ⁴ (%)
M1	+	3,0	0	0
M2	+	0	3,0	0
M3	+	0	0	3,0
M4	+	1,5	1,5	0
M5	+	1,5	0	1,5
M6	+	0	1,5	1,5
M7	+	1,0	1,0	1,0

+ Presente.

¹ Cultura probiótica de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Christian Hansen).

² Inulina Beneo ST-Gel (Orafti): 92% de inulina, 8% glicose+fructose+sacarose, GP ≥ 10 .

³ Concentrado protéico de soro (Arla Foods Ingredients).

⁴ Concentrado de caseína (Arla Foods Ingredients).

* Formulação M8 - controle: sem adição dos ingredientes inulina, WPC e CMP.

3.2. Fabricação da margarina

3.2.1. Preparo do inóculo contendo a cultura probiótica

A cultura utilizada nos experimentos foi a cultura probiótica de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Christian Hansen, Valinhos, Brasil), do tipo DVS (*direct vat set*), fornecida pelo fabricante na forma liofilizada e armazenada congelada após a

abertura do pacote, conforme instruções do mesmo. Tal cultura é comprovadamente probiótica, uma vez que foram realizados ensaios em humanos que comprovaram a sua eficácia (HASCHKE *et al.*, 1998; OUWEHAND *et al.*, 2004; MOHAN *et al.*, 2006; SHAH, 2007). A adição de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 à margarina foi realizada após uma etapa de pré-incubação da cultura. Para isso, 4 gramas de leite em pó desnatado (marca comercial Molico, Nestlé, Araçatuba, Brasil) foram reconstituídos em 40 mL de água, conforme instrução do fabricante. Após a sua esterilização em autoclave, o leite foi adicionado, em condições de assepsia, de 15 gramas da cultura probiótica liofilizada. Após esse procedimento, o inóculo foi incubado a 37°C, pelo período de 2 horas. Embora a cultura utilizada no presente trabalho seja do tipo DVS (*direct vat set* – para a adição direta durante o processamento), ao invés de ser adicionado diretamente na fase aquosa durante a fabricação da margarina, o inóculo foi preparado conforme descrito.

Tal procedimento foi realizado, com a finalidade de promover a multiplicação do microrganismo probiótico antes da sua adição ao produto. Com isso, assegurou-se que o produto apresentasse uma concentração inicial de microrganismo probiótico de aproximadamente 9,00 log UFC/g. Essa concentração inicial relativamente alta é importante, devido à perda na viabilidade do microrganismo probiótico durante as etapas de processamento do alimento e ao longo do armazenamento refrigerado. Dessa maneira, a inclusão de uma etapa de pré-multiplicação da cultura probiótica auxiliou na manutenção de populações satisfatórias de probiótico durante o período de armazenamento estudado.

3.2.2. Tecnologia empregada na fabricação da margarina probiótica e simbiótica

As principais etapas da fabricação da margarina encontram-se esquematizadas na Figura 9. Para tal, foi utilizada a formulação base apresentada na Tabela 3.

Figura 9. Tecnologia utilizada na fabricação da margarina probiótica e simbiótica. As proporções dos ingredientes adicionados às fases oleosa e aquosa estão definidas nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 3. Proporções dos ingredientes utilizados na formulação da margarina*.

Fase Oleosa		Fase Aquosa	
Ingrediente	(%)	Ingrediente	(%)
Gordura ¹	60,00	Água	31,00
Emulsificante ²	3,40	Sal	0,76
Corante	0,001	Ácido láctico	0,01
Aromatizante	0,05	Leite em pó	0,40
Vitamina A	0,88	Cultura probiótica ³	0,50

* Formulação sem os ingredientes variáveis: inulina, WPC e CMP. As formulações M1 a M7 foram adicionadas desses ingredientes na forma de mistura, sempre totalizando 3% da formulação total (inulina + WPC + CMP = 3%). A formulação controle (M8) não foi adicionada dos ingredientes variáveis e possuía 34% de água.

¹ 60% óleo de palma + 40% óleo de canola.

² Monoacilglicerol destilado (3%) + Ésteres de poliglicerol de ácido ricinoléico (0,4%).

³ Cultura probiótica de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Christian Hansen).

Para a formulação da fase oleosa, foram utilizados os seguintes ingredientes: óleo de palma (Agropalma, Tailândia, Brasil), óleo de canola (marca comercial Liza, Cargill, Mairinque, Brasil), emulsificantes (monoacilglicerol destilado – Myvatex Smooth 5Z10729; ésteres de poliglicerol de ácido ricinoléico - Admul Wol 1408K e monoacilglicerol destilado - Myverol 18-92K - grau alimentício, Kerry Bio-Science, Campinas, Brasil), corante β -Caroteno 30% FS (grau alimentício, DSM Produtos Nutricionais Brasil, São Paulo, Brasil), aroma de manteiga (grau alimentício, Danisco do Brasil Ltda, Cotia, Brasil) e vitamina A (Fortitech South América Indústria e Comércio Ltda, Campinas, Brasil).

Para a formulação da fase aquosa, foram adicionados: água, cloreto de sódio (marca comercial Cisne, Cabo Frio, Brasil), ácido láctico a 85% (grau alimentício, Purac Sínteses, Rio de Janeiro, Brasil), leite em pó desnatado (marca comercial Molico, Nestlé, Araçatuba, Brasil). Além disso, de acordo com o planejamento experimental de misturas utilizado neste trabalho (Tabelas 1 e 2), na fase aquosa foram adicionados os seguintes ingredientes: inulina (Beneo ST-Gel, Orafti, Oreya, Bélgica), concentrado protéico de soro (Lacprodan – 80, Arla Foods Ingredients, Dinamarca) e concentrado

de caseína (Lacprodan CGMP – 10, Arla Foods Ingredients, Dinamarca), para as formulações M1 a M7.

Para a fabricação das margarinas, as fases aquosa e oleosa foram preparadas separadamente. O óleo de palma foi adicionado do óleo de canola. Essa mistura foi, então, adicionada dos demais ingredientes da fase oleosa. Para o preparo da fase aquosa, 200 mL de água foram aquecidos até aproximadamente 40°C para a completa dissolução dos ingredientes inulina, WPC e CMP, adicionados de acordo com o planejamento experimental (Tabela 1).

Após essa etapa inicial, os demais ingredientes da fase aquosa, bem como o inóculo (preparado conforme descrição anterior) foram lentamente misturados. A fase aquosa foi, então, lentamente adicionada à fase oleosa, sob agitação constante em batedeira planetária Brastemp Stand Mixer 300 (Brastemp, São Paulo, Brasil), para a formação da emulsão. O tempo de emulsificação foi de aproximadamente 3 minutos. Depois de formada, a emulsão (temperatura aproximada de 25°C) foi transferida para sorveteira (Skymssen, modelo BSK-16, Brusque, Brasil), para a cristalização da gordura. O processo de cristalização em sorveteira para a produção de margarinas experimentais já foi descrito na literatura (GOLI *et al.*, 2009). O produto foi retirado da sorveteira quando atingiu a temperatura de 17°C, transferido para dosador manual (Delgo, Cotia, Brasil) e acondicionado em potes de polipropileno próprios para alimentos - dimensões 75 mm x 42 mm (diâmetro x altura) (Tries Aditivos Plásticos Ltda, São Paulo, Brasil) com tampa do mesmo material, previamente sanitizados com hipoclorito de sódio. Após o processo de embalagem (aproximadamente 50 gramas de margarina em cada pote), os produtos foram armazenados por até 35 dias sob refrigeração em cabine refrigerada (Metalfrio, mod. VB43R, São Paulo, Brasil) a $5\pm1^{\circ}\text{C}$, para a posterior realização das análises.

3.3. Análise microbiológica

3.3.1. Populações de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12

A viabilidade da cultura probiótica de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 foi monitorada no dia da produção das margarinas (dia 0) e após 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de armazenamento dos produtos mantidos sob refrigeração a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Para a quantificação das populações de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 durante o armazenamento refrigerado dos produtos, porções de 25 gramas de margarina (retiradas em condições de assepsia) foram 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). Após a homogeneização da margarina, retirou-se uma alíquota da emulsão para o preparo das diluições decimais subsequentes, utilizando-se o mesmo diluente. Em seguida, a diluição inicial (10^{-1}) foi deixada em repouso por 2 minutos, para a total separação das fases do produto (água + óleo). Após a separação das fases, procedeu-se como descrito anteriormente, para a preparação das diluições decimais da fase aquosa do produto. O objetivo da realização da análise microbiológica de duas maneiras diferentes (emulsão e somente fase aquosa) foi verificar se haveria diferença nas contagens do microrganismo probiótico, considerando-se que ele poderia ficar retido à matriz lipídica, caso a emulsão não fosse totalmente “quebrada” para a análise microbiológica.

Para a contagem de *B. animalis* subsp. *lactis* 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), contendo propionato de sódio (0,3 g/100 mL) e cloreto de lítio (0,2 g/100mL) - ágar MRS-LP, de acordo com VINDEROLA & REINHEIMER

(1999). Após a homogeneização e endurecimento do ágar, as placas foram incubadas em incubadora B.O.D (Nova Ética, mod. 411D, Vargem Grande Paulista, Brasil) a 37°C, por 3 dias em anaerobiose (Sistema de Anaerobiose Anaerogen, Oxoid). As análises foram realizadas em quadruplicatas, semanalmente, durante 35 dias.

3.3.2. Bactérias indicadoras de contaminação - coliformes totais, *Escherichia coli*, bolores e leveduras

Alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras preparadas conforme descrito no item 3.3.1. (emulsão e fase aquosa) foram transferidas para placas Petrifilm™ Yeasts and Moulds Count Plates (Petrifilm™ YM, 3M Microbiology, St. Paul, EUA) para contagem de bolores e leveduras e para placas Petrifilm™ EC (Petrifilm™ EC, 3M Microbiology), para a contagem de coliformes totais e *E. coli*, de acordo com as instruções do fabricante. As placas Petrifilm™ YM foram incubadas a 25°C por 5 dias. As placas Petrifilm™ EC foram incubadas a 37°C por 24 horas (para detecção de coliformes) e por mais 24 horas a 37°C, para detecção de *E. coli*. As análises foram realizadas em duplicata, durante todo o período de armazenamento dos produtos.

3.4. Avaliação *in vitro* da resistência da cultura probiótica de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 às condições gástrica e entérica simuladas durante o armazenamento dos produtos sob refrigeração a 5±1°C

A análise foi conduzida, empregando-se um modelo *in vitro*, utilizando-se sucos gástricos e entéricos simulados, bem como enzimas do trato gastrointestinal (TGI), adaptado de SALLANS *et al.* (1988), LISERRE *et al.* (2007), MUN *et al.* (2007),

BONNAIRE *et al.* (2008) e BURITI *et al.* (2010), com alterações, conforme descrito a seguir.

Os valores de pH de cada etapa do teste foram ajustados: fase gástrica - pH 2,0, primeira fase entérica – pH 5,0 e segunda fase entérica – pH 7,0, de acordo com CHARTERIS *et al.* (1998a), LIAN *et al.* (2003), NORIEGA *et al.* (2004) e COLLADO & SANZ (2007).

Decorridos os tempos de 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado das amostras a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$, porções de 25 g de margarina contendo a cultura probiótica de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 foram homogeneizadas com 225 mL de solução salina (5 g/L). As amostras de margarina (M1 a M7) foram, então, submetidas à análise de resistência às condições gástrica e entérica simuladas. A formulação M8 (controle) não foi utilizada para a realização dessas análises, uma vez que, após a realização das análises microbiológicas para quantificação de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12, as populações observadas estavam abaixo do mínimo recomendado para um alimento probiótico.

Para a realização dos ensaios de resistência *in vitro*, em um frasco Schott de 100 mL, adicionou-se uma alíquota de 10 mL da diluição de margarina homogeneizada, soluções das enzimas pepsina (Pepsin from porcine stomach mucosa, Sigma-Aldrich CO. St. Louis, MO, EUA, 0,1 mL – 3,0 g/L) e lipase (Amano lipase from *Penicillium camemberti*, Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, EUA, 0,01 mL - 1,30 mg/L lipase), também dissolvidas em NaCl 0,5% e 0,2 mL de HCl 1N, totalizando um conteúdo de 10,31 mL. Os frascos foram incubados a 37°C por 2h, com agitação de aproximadamente 150 r.p.m em banho metabólico (Banho Metabólico Dubnoff MA-095, Marconi, Piracicaba, Brasil). Essa primeira etapa do ensaio *in vitro* correspondeu à fase gástrica.

Para a simulação da primeira etapa entérica (intestino delgado), decorridas 2h de análise, adicionou-se 1,20 mL de solução de fosfato de sódio pH 12 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 14 g; NaOH 1N, 150 mL; H_2O destilada q.s.p. 1 L) contendo bile (Bile bovine, Sigma-Aldrich, 5 g/L) e pancreatina (Pancreatin from porcine pancreas, Sigma-Aldrich, 1,6 g/L), totalizando um conteúdo de 11,51 mL. As amostras foram reincubadas a 37°C por 2h, com agitação de aproximadamente 150 r.p.m. Após 4h do início do ensaio, uma alíquota de 1,20 mL de solução de fosfato de sódio pH 12, contendo bile (7,95 g/L) e pancreatina (0,79 g/L) foi adicionada aos frascos, totalizando um volume final de 12,71 mL. Os frascos foram, então, incubados novamente a 37°C, por mais 2h, sob agitação de aproximadamente 150 r.p.m., totalizando 6 horas de ensaio.

A retirada das alíquotas de cada Schott, referente às etapas gástrica e entérica, contendo margarina e os sucos gástrico e entérico simulados, ocorreu após 2h, 4h e 6h do início do ensaio *in vitro*. Os valores de pH de cada amostra em cada etapa do ensaio foram monitorados, utilizando-se medidor de pH-Analyser Modelo 300M (Analyser Comércio e Indústria Ltda., São Paulo, Brasil), empregando-se um eletrodo tipo penetração modelo 2A04 – IF (Analyser).

Para a contagem de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 sobreviventes ao ensaio *in vitro*, alíquotas de 1 mL provenientes dos sucos gástrico e entérico simulados foram submetidas a diluições sucessivas em água peptonada estéril (0,1%) e semeadas em placas contendo ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS, Oxoid), acrescido de propionato de sódio (0,3 g/100mL) e cloreto de lítio (0,2 g/100mL) - ágar MRS-LP, de acordo com VINDEROLA & REINHEIMER (1999). Após a homogeneização e endurecimento do ágar, as placas foram incubadas a 37°C, por 3 dias, em anaerobiose (Sistema de Anaerobiose Anaerogen, Oxoid).

3.5. Análises para a caracterização do produto

3.5.1. Composição em ácidos graxos

As análises da composição em ácidos graxos da matéria-prima (óleo de palma e óleo de canola), bem como da mistura (60% de óleo de palma + 40% de óleo de canola) utilizada para produção das margarinas, foram realizadas por cromatografia em fase gasosa, segundo normas da American Oil Chemists' Society (AOCS, 1997), método Ce 1-62, em cromatógrafo a gás Varian GC 3400 CX (Varian, Minesota, EUA), equipado com detector de ionização de chama. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida CP WAX 52 CB (Chrompack, Lake Forest, Estados Unidos), com 30 metros de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno e contendo 0,25 µm de espessura de polietilenoglicol dentro da coluna. As condições utilizadas na análise foram: injeção split, razão de 50:1; temperatura da coluna: 150°C durante 5 minutos, programada até 215°C, em uma razão de 3°C/min; gás de arraste: hélio, em uma vazão de 1,5 mL/min; gás *make up*: hélio a 30 mL/min; temperatura do injetor 250°C; temperatura do detector 280°C. A composição qualitativa foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos com os respectivos padrões de ácidos graxos. A composição quantitativa foi realizada por normalização de área, sendo expressa como percentagem em massa (DÍAZ GAMBOA & GIOIELLI, 2003a).

3.5.1.1. Cálculo dos teores de ácidos graxos na porção da margarina

O cálculo dos teores de ácidos graxos na porção de margarina foi realizado utilizando-se o fator de conversão de Holland (HOLLAND *et al.*, 1994), fator este utilizado para converter a gordura em ácidos graxos. O fator utilizado foi 0,956, que é o fator para óleos e gorduras, matérias-primas utilizadas na fabricação das margarinas.

A quantificação em gramas por porção de 10 g foi feita através do seguinte cálculo, de acordo com PAVAN (2008):

$$\text{Teor AG} = (\% \text{ AG} \times 6 \times 0,956)/100$$

Onde:

% AG = Percentagem de ácido graxo obtido por normalização de área, conforme descrito no item 3.5.1.

6 = quantidade de lipídios em gramas (sem fator de correção), contidos em 10 gramas de margarina fabricada com 60% de lipídios.

0,956 = quantidade que os ácidos graxos representam nas moléculas dos triacilgliceróis (~95%).

3.5.2. Conteúdo de gordura sólida

O conteúdo de gordura sólida foi analisado por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), utilizando o aparelho Minispec NMR (Bruker Instruments, Inglaterra) de 20 MHz, segundo normas da American Oil Chemists' Society (AOCS, 1999a), método Cd 16b-93, em série. As análises foram realizadas em duplicata.

3.5.3. Consistência

A análise de consistência foi realizada através de teste de penetração com cone de acrílico com ponta não truncada e ângulo de 45°, em analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems, Haslemere, Inglaterra), controlado por computador (DÍAZ GAMBOA & GIOIELLI, 2003a). Os dados foram coletados através do programa *Texture Expert for Windows* – versão 1.20 (Stable Micro Systems). Após a produção, as margarinas foram mantidas em suas embalagens originais a 5±1°C, durante 1 semana

em cabine refrigerada (Metalfrio, modelo VB43R, São Paulo, Brasil), para garantia de total cristalização da gordura.

Após esse período, as margarinas foram transferidas para estufa com temperatura controlada (Fanen, modelo 347CD, São Paulo, Brasil) e mantidas durante 24 horas, antes de serem analisadas. Todas as amostras foram analisadas em temperaturas de 5 a 35°C, em intervalos de 5°C.

A análise de consistência também foi realizada com amostras de óleo de palma utilizada para a fabricação da margarina, bem como da mistura (óleo de palma + óleo de canola). Essas amostras foram preparadas da maneira descrita acima, nas mesmas embalagens utilizadas para acondicionamento da margarina e analisadas em temperaturas de 5 a 35°C, em intervalos de 5°C.

Todos os testes foram realizados em triplicata, obedecendo às seguintes condições: distância = 10 mm; velocidade = 2 mm/s e tempo = 5 s (RODRIGUES *et al.*, 2004). Para o cálculo da consistência (*yield value*) foi utilizada a seguinte equação, proposta por HAIGHTON (1959):

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

Sendo:

C = consistência (*yield value*) (gf/cm²).

K = fator que depende do ângulo do cone (para ângulo de 45°, K é igual a 4.700).

W = força em compressão (gf), para tempo de 5 segundos.

p = profundidade de penetração (mm/10).

3.5.4. Interesterificação química

Foram interesterificados 1500 g da mistura utilizada para a fabricação das margarinas (mistura de 60% óleo de palma com 40% óleo de canola), previamente

seca em balão de vidro, sob pressão reduzida, acoplado a um rotaevaporador em banho de água a aproximadamente 95°C. A essa porção foram misturados 0,5% (m/m) de catalisador metóxido de sódio (Merck, Alemanha). A reação de interesterificação química foi realizada sob agitação constante e pressão reduzida, a 65-70 °C, em balão de três bocas imerso em banho de água pelo período de 1 hora. Para interromper a reação, adicionou-se água destilada (5 mL), pois a presença de água inativa o catalisador, convertendo-o em metanol (SREENIVASAN, 1978). Para minimizar o escurecimento decorrente da reação e para reter a umidade, foram adicionados sílica em pó (Merck, Alemanha) e sulfato de sódio anidro (Labsynth, Brasil), respectivamente. Os produtos foram filtrados em estufa regulada a 60°C, utilizando-se papel de filtro (DÍAZ GAMBOA & GIOIELLI, 2003b; RODRIGUES *et al.*, 2003). A amostra interesterificada foi acondicionada nas mesmas embalagens utilizadas para acondicionamento da margarina e armazenada sob refrigeração a 5±1 °C, durante 7 dias. Após esse período de armazenamento, realizou-se a análise de consistência da mistura interesterificada, conforme descrito no tópico 3.5.3.

3.5.5. Composição em triacilgliceróis

A distribuição dos ácidos graxos na posição *sn*-2 para os óleos de canola e palma foi obtida na literatura (GUNSTONE & HARWOOD, 2007) e utilizada para o cálculo das composições em triacilgliceróis de cada óleo, pela teoria 1,3-random, 2-random. Para a mistura, o cálculo foi baseado na proporção dos componentes. Para a mistura interesterificada, foi aplicada a teoria 1,2,3-random (HUI, 1996). Foram calculadas as percentagens de triacilgliceróis triinsaturados, dissaturados-monoin saturados, diinsaturados-monossaturados e triinsaturados.

3.5.6. Determinação do pH

O pH dos produtos foi determinado após 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de armazenamento refrigerado a $5\pm1^{\circ}\text{C}$ em medidor de pH-Analyser Modelo 300M (Analyser Comércio e Indústria Ltda, São Paulo, Brasil), empregando-se um eletrodo tipo penetração modelo 2A04 – IF (Analyser). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.5.7. Calorimetria diferencial de varredura – DSC

As análises calorimétricas do comportamento de fusão e cristalização das amostras da matéria-prima utilizada para a fabricação das margarinas (óleo de palma e óleo de canola), da mistura antes e após a interesterificação química (60% de óleo de palma + 40% de óleo de canola), bem como das diferentes formulações de margarinas desenvolvidas (Tabela 2) foram realizadas em Analisador Térmico Perkin-Elmer, modelo DSC 4000, equipado com sistema de resfriamento Intracooler SP. As amostras (peso variando entre 10 e 12 mg) foram colocadas em recipientes de 50 μL de alumínio, próprios para análise no calorímetro (recipiente BO14-3017 e tampa BO14-3003, Perkin-Elmer). Tais recipientes foram hermeticamente fechados. Um recipiente vazio (idêntico ao utilizado para a amostra) foi usado como referência. O instrumento foi calibrado com índio.

Para a realização das análises, utilizou-se a seguinte programação de temperatura, segundo o método Cj 1-94 da AOCS (ROUSSEAU *et al.*, 1996; METIN & HARTEL, 1998; AOCS, 1999b; GRIMALDI *et al.*, 2001): para as curvas de cristalização, as amostras foram mantidas a 80°C por 10 min para garantir que todos os núcleos de cristais tenham sido eliminados, resfriadas a -40°C à velocidade de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e

mantidas a esta temperatura por 30 min. Para as curvas de fusão as amostras foram aquecidas de -40°C a 80°C, à velocidade de 5°C/min. O tratamento dos dados obtidos foi realizado pelo software Pyris™. Os termogramas foram analisados quanto ao início (*onset*) e final (*endset*) da fusão e da cristalização, temperatura máxima dos principais picos (°C) e entalpia de fusão e cristalização (Delta H, expresso em J/g).

3.6. Análise sensorial

A avaliação sensorial das formulações de margarina (M1 a M7) desenvolvidas no presente trabalho foi realizada após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, conforme consta no Ofício CEP nº 133/2006 (**ANEXO I**). A formulação M8, assim como para os ensaios de resistência *in vitro*, não foi utilizada para a realização da análise sensorial, por não se tratar de um produto probiótico nos períodos estipulados para essa análise.

As sessões de análise sensorial dos diferentes tipos de margarina foram realizadas no Laboratório de Análise Sensorial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. A análise sensorial foi conduzida após 7 e 14 dias de armazenamento refrigerado a 5±1°C. As amostras foram avaliadas através de teste de aceitabilidade, utilizando-se escala hedônica estruturada de 9 pontos, com variação de gostei muitíssimo (ou 9 pontos) a desgostei muitíssimo (ou 1 ponto) (LAWLESS & HEYMANN, 1999; DUTCOVSKY, 1996). O modelo da ficha utilizada nas análises encontra-se no **ANEXO II**.

Cada sessão de análise sensorial (12 no total) contou com a presença de 30 provadores não treinados, sobretudo alunos, professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e de outras unidades da USP, selecionados com base em hábitos de consumo regular de margarina. Antes de participarem da análise sensorial,

os provadores, após estarem devidamente acomodados nas cabines de análise sensorial do laboratório, foram convidados a ler atentamente o *Termo de consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO III)*, contendo a identificação da pesquisa e dos responsáveis pela mesma, além de apresentar os aspectos legais da pesquisa. Dessa forma, os provadores foram informados sobre o objetivo da pesquisa, bem como sobre os ingredientes que foram utilizados na formulação das margarinas. Em caso de concordância com o termo, os provadores devolveram o termo preenchido com seus dados e assinado. Uma cópia assinada pela responsável pela pesquisa foi entregue a cada participante. Após esse procedimento, as amostras foram apresentadas aos provadores. Cada provador analisou uma amostra por sessão, sendo que a maioria dos provadores esteve presente em três ou mais sessões. As amostras (25 gramas acondicionadas em potes de polipropileno próprios para alimentos - dimensões 75 mm diâmetro x 42 mm altura, previamente sanitizados com hipoclorito de sódio) codificadas com 3 dígitos aleatórios, foram servidas aos provadores em temperatura de refrigeração ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$). Juntamente com a amostra, os provadores receberam uma fatia de pão de forma sem casca para ser usado como base durante a degustação da margarina. Facas plásticas descartáveis foram fornecidas aos provadores para aplicação da margarina no pão.

3.7. Análise Estatística

A análise estatística dos resultados obtidos no presente trabalho foi realizada conforme o delineamento experimental proposto no item 3.1., utilizando o pacote estatístico *Statistica*, versão 8.0 para Windows (Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA). Os resultados de pH, viabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, resistência da cultura probiótica à ação das condições e enzimas, simulando o que

ocorre no trato gastrointestinal humano, consistência e avaliação sensorial foram comparados e as respostas foram expressas em tabelas ou gráficos como média $\pm$ desvio padrão.

Para que os resultados de uma análise de variância (ANOVA) sejam válidos, é necessário que as variâncias amostrais sejam semelhantes nas diferentes amostras. Além disso, a distribuição deve ser normal (CALLEGARI-JAQUES, 2003). Assim, antes da aplicação da análise de variância para os resultados obtidos ao longo do período de armazenamento para cada formulação e entre as várias formulações para cada período de armazenamento ou coleta estudado, avaliou-se a normalidade dos resultados, através do teste de Shapiro-Wilks, adotando-se um valor de α de 0,05. Da mesma forma, analisou-se a homogeneidade de variâncias entre os diferentes tratamentos, através do teste de Brown-Forsythe, com α de 0,05, exceto para a viabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, durante o armazenamento das margarinas e nos testes de sobrevivência no ensaio *in vitro*. Nesse caso específico, considerou-se α de 0,01, uma vez que variações microbiológicas podem não ser importantes quando adotado valores mais elevados de α . Após realização dos testes citados anteriormente (testes *a priori*), realizou-se a etapa seguinte da análise, para a comparação dos resultados – análise de variância, com posterior aplicação de testes (testes *post hoc*) para observação dos contrastes entre as médias (quando a análise de variância foi significativa). Os testes *post hoc* foram realizados com o mesmo nível de significância utilizado na análise de variância (BOWER, 1998a). Tal comparação foi realizada em duas etapas diferentes:

- Comparações entre as diferentes formulações para um mesmo período de armazenamento:

✓ Os casos onde a homogeneidade de variância não foi observada foram tratados através de análise de variância não-paramétrica, com aplicação do teste de Kruskal Wallis e o teste de Mann Whitney U para identificação dos contrastes ($p < 0,05$) (BOWER, 1997; BOWER, 1998b);

✓ Quando a homogeneidade de variâncias foi observada, procedeu-se à análise de variância paramétrica e consequente aplicação do teste de Tukey para a identificação das diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$) (BOWER, 1998a).

- Comparações entre os diferentes períodos de armazenamento para uma mesma formulação:

✓ Os casos onde a homogeneidade de variância não foi observada foram tratados pela análise de variância não-paramétrica, com aplicação do teste de Friedman e o “LSD rank” para identificação dos contrastes ($p < 0,05$) (BOWER, 1998b).

✓ Quando houve a homogeneidade de variâncias, procedeu-se a análise de variância para medidas repetidas e aplicação do teste de Tukey para detectar as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias das 7 formulações (M1 a M7) ao longo da vida de prateleira e entre os tempos (horas) de coleta do ensaio *in vitro* em um tempo (dia) específico (BOWER, 1998a).

O delineamento experimental utilizou a metodologia de superfície de resposta para misturas simples com um ponto central e três fatores para obtenção do modelo que representasse o comportamento dos três fatores analisados (inulina, WPC e CMP) (Tabelas 1 e 2).

As variáveis dependentes “população de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12”, “valores de pH” e “sobrevivência do probiótico às condições simuladas *in vitro* do trato gastrointestinal humano após 6 horas de teste” foram selecionadas dentre os

demais parâmetros analisados para a obtenção dos modelos estatísticos ajustados, capazes de explicar o comportamento dessas variáveis, em função das possíveis interações entre os fatores estudados, a saber: inulina (x_1), WPC (x_2) e CMP (x_3). Os resultados observados para essas respostas ao 21º dia de armazenamento das margarinas foram escolhidos para a obtenção do modelo estatístico, uma vez que se observou homogeneidade de variância ($p>0,01$ para *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e $p>0,05$ para pH) e diferenças significativas ($p<0,05$) entre as formulações entre os períodos de armazenamento estudados.

Para a obtenção dos modelos estatísticos ajustados, foram analisados diferentes modelos estatísticos, empregando-se modelo de regressão linear, quadrático e cúbico especial. Após a avaliação da capacidade preditiva dos três tipos de modelos testados, optou-se pelos modelos de regressão múltipla do tipo linear (para a variável resposta pH) e do tipo quadrático (para sobrevivência de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 nos produtos e após ser submetido ao ensaio de resistência *in vitro*), que melhor representaram os resultados obtidos, sendo representados com as seguintes equações polinomiais:

$$\hat{y} = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 \quad (\text{modelo linear})$$

$$\hat{y} = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (\text{modelo quadrático})$$

Onde:

$\hat{y}$ = estimativa da resposta da variável de interesse no produto.

$b_1, b_2, b_3, b_{12}, b_{13}$ e b_{23} = coeficientes da regressão estimados.

x_1, x_2 e x_3 = proporção dos fatores presentes nas formulações de margarinas: inulina,

WPC e CMP, respectivamente ($\sum_{i=1}^n x_i=1, 1 \geq x_i \geq 0$).

A qualidade dos modelos obtidos para cada variável resposta escolhida foi analisada, empregando-se análise de variância com aplicação do teste F com $p < 0,05$, após cálculo dos coeficientes dos modelos. Além disso, a falta de ajuste do modelo (*lack of fit*) e o coeficiente de determinação (R^2) também foram utilizados para avaliação do modelo escolhido. Esses dois parâmetros são de extrema importância para a avaliação de um modelo. A falta de ajuste determina se um modelo é apropriado, indicando se o modelo obtido é adequado ou não para descrever as respostas experimentais obtidas. Caso a falta de ajuste seja inferior a 0,05 (em um intervalo de 95% de confiança), pode-se considerar que há evidências estatísticas suficientes para afirmar que o modelo não está bem ajustado aos dados (COSCIONE *et al.*, 2005).

O R^2 tem seu valor máximo igual a 1, e fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas. Quanto mais próximo de 1 (ou 100%) estiver o valor de R^2 , melhor terá sido o ajuste às respostas observadas (BARROS NETO *et al.*, 2007; RODRIGUES & IEMMA, 2005).

Os resultados obtidos foram apresentados graficamente através de diagramas triangulares, representando os fatores estudados, conforme ilustrado na Figura 10.

Figura 10. Diagrama triangular representando um modelo de mistura de 3 componentes (ERIKSSON *et al.*, 1998).

4. RESULTADOS

4.1. Parâmetros microbiológicos

4.1.1. Viabilidade da bactéria probiótica

As Tabelas 4 e 5 apresentam as populações de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (média $\pm$ desvio padrão) observadas para as margarinas M1 a M7. Conforme descrito no item 3.3.1, os produtos foram analisados microbiologicamente de duas maneiras: produto final (aqui chamado de emulsão) e fase aquosa isolada.

Tabela 4. Populações de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (média $\pm$ desvio padrão) obtidas para as margarinas M1 a M7 (emulsão)* durante o processamento (dia 0)** e após 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de armazenamento refrigerado ($5\pm 1^\circ\text{C}$). Veja a Tabela 2 para descrição das formulações.

Tempo (Dias)	Populações de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 (log UFC/g)						
	Margarinas						
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
0	8,39 $\pm$ 0,33 ^{BCab}	8,24 $\pm$ 0,14 ^{Ca}	8,71 $\pm$ 0,10 ^{Aa}	8,49 $\pm$ 0,11 ^{Ba}	8,52 $\pm$ 0,07 ^{Ba}	8,77 $\pm$ 0,10 ^{Aa}	8,42 $\pm$ 0,14 ^{Ba}
1	8,77 $\pm$ 0,24 ^{Aa}	7,82 $\pm$ 0,19 ^{Bb}	8,60 $\pm$ 0,16 ^{Aa}	8,43 $\pm$ 0,05 ^{Aa}	8,42 $\pm$ 0,09 ^{Aab}	8,63 $\pm$ 0,22 ^{Aa}	8,44 $\pm$ 0,14 ^{Aa}
7	8,19 $\pm$ 0,23 ^{Bb}	7,55 $\pm$ 0,17 ^{Cb}	8,36 $\pm$ 0,15 ^{ABab}	8,18 $\pm$ 0,07 ^{Bb}	8,55 $\pm$ 0,18 ^{Aa}	8,26 $\pm$ 0,13 ^{ABb}	8,29 $\pm$ 0,12 ^{Ba}
14	8,54 $\pm$ 0,01 ^{Aa}	6,74 $\pm$ 0,17 ^{Cc}	8,19 $\pm$ 0,08 ^{ABb}	8,03 $\pm$ 0,06 ^{Bb}	8,16 $\pm$ 0,10 ^{ABbc}	8,27 $\pm$ 0,13 ^{ABb}	8,40 $\pm$ 0,16 ^{Aa}
21	8,23 $\pm$ 0,20 ^{Aab}	6,54 $\pm$ 0,14 ^{Dc}	8,07 $\pm$ 0,21 ^{ABbc}	7,62 $\pm$ 0,08 ^{Cc}	8,10 $\pm$ 0,04 ^{ABc}	8,03 $\pm$ 0,15 ^{ABc}	7,81 $\pm$ 0,29 ^{BCb}
28	8,05 $\pm$ 0,04 ^{Ab}	5,40 $\pm$ 0,16 ^{Dd}	7,64 $\pm$ 0,03 ^{Bc}	7,56 $\pm$ 0,15 ^{Bcd}	7,52 $\pm$ 0,09 ^{Bd}	7,62 $\pm$ 0,12 ^{Bd}	6,81 $\pm$ 0,01 ^{Cc}
35	8,01 $\pm$ 0,22 ^{Ab}	4,64 $\pm$ 0,26 ^{De}	6,87 $\pm$ 0,52 ^{Bd}	7,32 $\pm$ 0,04 ^{Bd}	7,29 $\pm$ 0,23 ^{Bd}	7,27 $\pm$ 0,09 ^{Be}	6,26 $\pm$ 0,16 ^{Cd}

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

** Análise microbiológica realizada no mesmo dia da produção do alimento.

^{A,B,C,D}: letras maiúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes formulações de margarinas estudadas para o mesmo período de armazenamento.

^{a,b,c,d,e}: letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes períodos de armazenamento para cada margarina estudada.

Tabela 5. Populações de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (média $\pm$ desvio padrão) obtidas para as margarinas M1 a M7 (fase aquosa)* durante o processamento (dia 0)** e após 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de armazenamento refrigerado ($5\pm 1^\circ\text{C}$). Veja a Tabela 2 para descrição das formulações.

Tempo (Dias)	Populações de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 (log UFC/g)						
	Margarinas						
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
0	8,36 $\pm$ 0,10 ^{ABa}	8,03 $\pm$ 0,04 ^{Ba}	8,33 $\pm$ 0,22 ^{ABa}	8,00 $\pm$ 0,14 ^{Bab}	8,06 $\pm$ 0,18 ^{Ba}	8,58 $\pm$ 0,08 ^{Aa}	8,28 $\pm$ 0,07 ^{ABa}
1	8,33 $\pm$ 0,23 ^{ABa}	7,71 $\pm$ 0,18 ^{Cab}	8,26 $\pm$ 0,08 ^{ABa}	8,14 $\pm$ 0,02 ^{Ba}	7,72 $\pm$ 0,15 ^{Cab}	8,56 $\pm$ 0,11 ^{Aa}	8,29 $\pm$ 0,15 ^{ABa}
7	8,31 $\pm$ 0,15 ^{Aab}	7,60 $\pm$ 0,17 ^{Bb}	8,16 $\pm$ 0,09 ^{Aa}	7,84 $\pm$ 0,05 ^{Babc}	7,27 $\pm$ 0,10 ^{Cbc}	8,17 $\pm$ 0,04 ^{Ab}	7,80 $\pm$ 0,26 ^{Bb}
14	8,44 $\pm$ 0,01 ^{Aab}	6,60 $\pm$ 0,11 ^{Ec}	7,83 $\pm$ 0,10 ^{Cb}	7,69 $\pm$ 0,03 ^{CDbcd}	7,53 $\pm$ 0,26 ^{Dbc}	8,18 $\pm$ 0,04 ^{Bb}	7,45 $\pm$ 0,14 ^{Db}
21	8,19 $\pm$ 0,09 ^{Aab}	6,50 $\pm$ 0,15 ^{Ec}	7,68 $\pm$ 0,09 ^{Bb}	7,39 $\pm$ 0,04 ^{Ccd}	7,82 $\pm$ 0,07 ^{Bab}	7,84 $\pm$ 0,07 ^{Bc}	7,48 $\pm$ 0,09 ^{Cb}
28	7,96 $\pm$ 0,11 ^{Abc}	4,81 $\pm$ 0,06 ^{Ed}	7,33 $\pm$ 0,04 ^{Bb}	6,91 $\pm$ 0,02 ^{BCde}	7,17 $\pm$ 0,06 ^{Bbc}	7,47 $\pm$ 0,03 ^{Bd}	6,56 $\pm$ 0,37 ^{Cc}
35	7,87 $\pm$ 0,21 ^{Ac}	4,86 $\pm$ 0,04 ^{Ed}	6,63 $\pm$ 0,39 ^{Cc}	6,54 $\pm$ 0,56 ^{CDe}	6,59 $\pm$ 0,13 ^{CDc}	7,21 $\pm$ 0,04 ^{Be}	6,12 $\pm$ 0,05 ^{Dc}

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

** Análise microbiológica realizada no dia da produção do alimento.

A,B,C,D,E: letras maiúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes formulações de margarinas estudadas para o mesmo período de armazenamento.

a,b,c,d,e: letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes períodos de armazenamento para cada margarina estudada.

As populações observadas para a formulação controle (M8) apresentaram-se muito abaixo das concentrações preconizadas para um alimento probiótico logo a partir do 1º dia de armazenamento. Tais resultados não permitiram que essa formulação fosse considerada probiótica. No dia 0 (dia da produção), as populações médias foram de $7,20 \pm 0,03$ log UFC/g, atingindo a diferença de 1,57 log UFC/g nas contagens de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12, quando comparadas à formulação M6, que apresentou as maiores contagens no dia 0. Após esse período, as populações observadas foram de $5,12 \pm 0,10$ e $3,10 \pm 0,15$ log UFC/g ao 1º e ao 7º dia de armazenamento, respectivamente, não sendo possível a detecção de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 nos demais períodos de armazenamento analisados. Por esse motivo, somente os resultados obtidos para as formulações M1 a M7 serão discutidos no presente trabalho.

Ao contrário do observado para a formulação M8, os resultados obtidos para as demais formulações testadas (exceto para M2 após o 21º dia de armazenamento), revelaram populações muito satisfatórias para um alimento probiótico. Essa constatação reforça a importância da suplementação da fase aquosa de margarinas probióticas com ingredientes que possam proteger o microrganismo durante os processos tecnológicos empregados na produção do alimento, bem como durante o seu armazenamento refrigerado.

Como exemplo dessa importância, podemos comparar as populações iniciais da formulação M8 ($7,20$ log UFC/g) com a população média observada para as demais formulações ($8,50$ log UFC/g). Tal diferença pode ser explicada devido aos danos (injúria) que o microrganismo sofreu em virtude dos processos aplicados na fabricação da margarina (emulsificação e cristalização). Durante esses processos, a presença de ingredientes que possam proteger o microrganismo pode atuar favoravelmente na manutenção da sua sobrevivência. Como exemplo desses ingredientes, pode-se citar a inulina, que quando em contato com a água forma uma rede cristalina (gel) que, por

estar dentro do glóbulo de água juntamente com o microrganismo, forma uma camada protetora para ele.

As populações de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 observadas para as formulações M1 a M7 na emulsão (produto sem separação de fases) foram superiores às populações observadas para a fase aquosa isolada (exceto para contagens observadas para fase aquosa: M1 ao 7º dia, M2 ao 7º dia e M2 ao 35º dia, que foram ligeiramente superiores, porém, não significativas estatisticamente – $p > 0,05$). Tal fato pode estar associado à quebra da emulsão, que certamente não ocorreu de maneira uniforme no momento da separação da fase aquosa da emulsão para a realização das diluições utilizadas para a análise microbiológica da fase aquosa isolada. Dessa forma, o microrganismo ficou retido na matriz lipídica do produto, dentro do glóbulo de água, motivo esse pelo qual a fase contendo a gordura e a água (emulsão) apresentou populações um pouco mais elevadas do que aquelas observadas na fase aquosa isolada. A Figura 11 ilustra a situação explicada anteriormente: o glóbulo de água (em azul) retido na matriz lipídica (em amarelo).

Figura 11. Microscopia de margarina apresentando a matriz lipídica cristalizada (em amarelo) sustentando o glóbulo de água (em azul). (Fonte: HEERTJE, 2008).

A sobrevivência de microrganismos em margarina, principalmente de bactérias, torna-se dificultada devido às características que o produto apresenta, como baixa atividade de água, pequeno diâmetro dos glóbulos de água ($< 5\mu\text{m}$) e a incapacidade dos microrganismos se moverem entre esses glóbulos. Além disso, a escassez de nutrientes dentro dos glóbulos de água também se apresenta como um fator limitante à sobrevivência e/ou multiplicação de microrganismos nesse produto (DELAMARRE & BATT, 1999; CHARTERIS *et al.*, 2002; VAN DALEN, 2002; HOLLIDAY *et al.*, 2003).

Contudo, margarinas, assim como chocolates, pães e maioneses estão entre os produtos disponíveis no mercado mundial que, para atender a crescente procura por produtos inovadores e saudáveis, passaram por alterações/ inovações em sua tecnologia de fabricação. Como exemplo, pode-se citar a adição de iogurte à margarina, que confere ao produto o apelo de “alimento mais saudável”, por conter em sua composição os microrganismos presentes no iogurte. Esse produto poderia possuir o apelo de “mais saudável”, por exemplo, por conter o microrganismo *Streptococcus thermophilus*, que pode auxiliar na melhoria da má digestão da lactose, através da produção da enzima β -galactosidase (GONZÁLEZ *et al.*, 1998; LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001; DROUAULT *et al.*, 2002). No Brasil, como exemplo de produto fabricado com a adição de iogurte, pode ser citada a margarina Yofresh, produzida e comercializada pela Unilever (DORIANA, 2009).

Entretanto, a simples adição de iogurte e/ou outros microrganismos à margarina pode não ser suficiente para manutenção de populações viáveis no produto, como discutido anteriormente. GONZÁLEZ *et al.* (1998) analisaram 30 amostras de margarinas produzidas com adição de iogurte por até 157 dias de armazenamento refrigerado e não detectaram a presença dos microrganismos utilizados na fabricação do iogurte (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) em nenhuma das amostras analisadas. Tal resultado reforça a necessidade da adição

de outros ingredientes, diferentes daqueles já usualmente empregados na fabricação de margarinas, que possam ser metabolizados pelos microrganismos benéficos adicionados, garantindo, dessa maneira, sua multiplicação e/ou sobrevivência no produto durante o prazo de vida de prateleira estipulado.

No presente trabalho, para a fase emulsão, dentre as diferentes margarinas analisadas, a formulação M1 apresentou populações de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 superiores a 8,00 log UFC/g durante todo o armazenamento refrigerado a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$. Ao 28^o e 35^o dia de armazento, as populações observadas para M1 foram significativamente superiores ($p<0,05$), quando comparadas às demais formulações. As formulações M3, M5 e M6 apresentaram populações de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 superiores a 8,00 log UFC/g até o 21^o dia de armazenamento, sob as mesmas condições de armazenamento. Após esse período, reduções significativas nessas populações foram observadas ($p<0,05$). Entretanto, ao término do armazenamento (35^o dia), essas formulações, juntamente com M4 e M7, permaneceram com populações de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 superiores a 6,00 log UFC/g, variando entre 6,26 log UFC/g (para M7) e 7,32 log UFC/g (para M4) diferindo estatisticamente ($p<0,05$) de M1 (8,01 log UFC/g – maiores populações observadas) e de M2 (4,64 log UFC/g – menores populações observadas).

A margarina M2 apresentou resultados insatisfatórios com relação à viabilidade de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12, após o 21^o dia de armazenamento, uma vez que as populações observadas estavam abaixo do mínimo recomendado para um alimento probiótico (6,00 log UFC/g). Tais populações diminuíram significativamente ao longo do armazenamento ($p<0,05$), atingindo populações de 4,64 log UFC/g ao 35^o dia de armazenamento. Tal resultado, possivelmente, está associado à presença isolada do ingrediente concentrado protéico de soro (WPC). A adição de WPC a alimentos que sejam adicionados de culturas probióticas pode auxiliar na manutenção da viabilidade

dessas culturas, devido à presença de fosfatos e proteínas, que aumentam a capacidade tamponante do meio (ANTUNES *et al.*, 2005). Entretanto, no presente trabalho, a adição isolada de WPC não favoreceu a viabilidade da cultura probiótica de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12, principalmente após o 21º dia de armazenamento refrigerado.

Semelhantemente, MATIJEVIC *et al.* (2008) estudaram o efeito da adição de WPC sobre a viabilidade de cepas probióticas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e *Lactobacillus acidophilus* La-5 adicionadas em soro de leite. Os pesquisadores observaram que, além de reduzir o tempo de fermentação em 1 hora, a adição de 3% de WPC resultou em maiores populações de *L. acidophilus* La-5. Por outro lado, a adição de WPC não influenciou significativamente a viabilidade de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12. Além disso, a adição desse ingrediente não resultou em influência positiva na sobrevivência dos microrganismos probióticos durante o período de armazenamento estudado (28 dias a 4°C).

ANTUNES *et al.* (2005) avaliaram o efeito da adição de WPC sobre a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum*, adicionados em iogurtes com teor reduzido de lipídios. Os pesquisadores concluíram que a adição de WPC contribuiu para o aumento nas populações de *L. acidophilus* em 1,8 log. Por outro lado, a adição de WPC ao iogurte resultou em pequenas alterações, embora positivas, com relação à viabilidade de *B. longum*.

No presente trabalho, a adição de WPC parece não ter auxiliado a multiplicação de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12, uma vez que as populações observadas para M2 (adicionada somente de 3% de WPC) foram inferiores a 5,00 log UFC/g ao 35º dia de armazenamento.

A adição isolada de WPC (formulação M2) e CMP (formulação M3), dois ingredientes de base essencialmente protéica, resultaram em resultados muito distintos

com relação à viabilidade de *B. animalis* subsp. *lactis* em margarina. Para essas formulações, diferenças estatisticamente significativas nas populações de Bb-12 foram detectadas em todos os períodos de armazenamento estudados ($p < 0,05$). Segundo JANER *et al.* (2004), o efeito de WPC sobre a multiplicação de bifidobactérias é maior do que o efeito observado para CMP. Além de possuir glicopeptídeos, o WPC inclui proteínas do soro, que são possivelmente disponibilizadas de maneira direta para a absorção das bactérias. Além disso, segundo os pesquisadores, essas proteínas também podem ser clivadas enzimaticamente, levando à formação de compostos que podem atuar como compostos bifidogênicos. No presente trabalho, parece ter ocorrido o contrário, uma vez que as populações detectadas para M3 (adicionada de CMP) foram sempre superiores às detectadas para M2, atingindo a diferença de 2,23 log UFC/g ao 35º dia de armazenamento.

Por outro lado, nas formulações nas quais o WPC foi adicionado à margarina juntamente com os ingredientes inulina e CMP (formulações M4, M6 e M7), as populações observadas para Bb-12 foram satisfatórias para um alimento probiótico, sendo que M4 e M6 apresentaram populações estatisticamente iguais ($p > 0,05$), e ambas diferiram de M7 ($p < 0,05$) ao 35º dia de armazenamento (Tabela 4). Por outro lado, a adição isolada da inulina e do CMP (formulações M1 e M3, respectivamente) à margarina favoreceu a viabilidade da cepa probiótica. Tal resultado pode ser explicado pela capacidade de cepas de *Bifidobacterium* em metabolizar a inulina e o CMP (JANER *et al.*, 2004; AKIN *et al.*, 2007; DONKOR *et al.*, 2007).

A viabilidade e estabilidade dos probióticos apresentam-se como um desafio tecnológico para a comercialização de produtos adicionados desses microrganismos. Portanto, a adição de ingredientes prebióticos é de grande importância para a manutenção das populações de probióticos no alimento (CHAMPAGNE & GARDNER, 2005).

Semelhantemente ao observado no presente trabalho, outros autores observaram aumento e/ou manutenção nas populações de cepas probióticas em diferentes alimentos, como leite desnatado, sorvete, iogurte, queijo *petit-suisse* e leite fermentado, todos adicionados de inulina (BRUNO *et al.*, 2002; AKIN *et al.*, 2007; DONKOR *et al.*, 2007; CARDARELLI *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Da mesma maneira, em estudos realizados com leite contendo *Bifidobacterium lactis* DSM10140, JANER *et al.* (2004) observaram que as populações desse microrganismo aumentaram 1,8 log em relação ao controle (leite não suplementado) após 24 horas de fermentação, quando o produto foi adicionado de CMP.

As formulações que foram adicionadas de inulina (M1, M4, M5 e M7) apresentaram populações estatisticamente superiores à formulação contendo apenas WPC (M2) durante todo o armazenamento (exceto durante a produção, quando M2 apresentou populações estatisticamente iguais a M1 – $p > 0,05$). A inulina, mesmo adicionada a essas formulações em diferentes concentrações (M1: 3%, M4: 1,5%, M5: 1,5% e M7: 1%), garantiu boa viabilidade do microrganismo probiótico *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 durante todo o período de armazenamento estudado, embora diminuição estatisticamente significativa tenha ocorrido entre o 1º e o 35º dia de armazenamento para essas formulações ($p < 0,05$). A inulina, possivelmente, foi metabolizada pelo microrganismo probiótico, o que garantiu populações acima de 6,00 log UFC/g durante todo o armazenamento das formulações contendo esse ingrediente.

É importante destacar que a inulina utilizada na formulação das margarinas foi a inulina Beneo ST-Gel, da Orafiti. Tal inulina pode ser metabolizada facilmente pelo microrganismo *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12, por se tratar de uma inulina com baixo grau de polimerização, uma vez que estudos *in vitro* demonstraram que cepas de *Bifidobacterium* são mais aptas a metabolizar inulina com baixo grau de polimerização do que a inulina com longas cadeias (alto grau de polimerização). No intestino humano,

o processo de metabolização da inulina com longas cadeias resulta de uma complexa atividade metabólica microbiana e são hidrolisadas através da ação de enzimas extracelulares (ROSSI *et al.*, 2005).

Adicionalmente, no presente trabalho, o ingrediente prebiótico pode ter conferido papel protetor ao probiótico, impedindo que compostos liberados pelo microrganismo dentro do glóbulo de água afetassem sua viabilidade. Cepas do gênero *Bifidobacterium* são capazes de produzir ácidos orgânicos, como ácido acético e ácido láctico, que possuem atividade contra bactérias patogênicas e que, uma vez concentrados dentro do glóbulo de água na margarina, poderiam afetar sua viabilidade (LÓPEZ-MOLINA *et al.*, 2005).

Em estudo realizado para avaliar o efeito da inulina sobre a viabilidade de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521, LÓPEZ-MOLINA *et al.* (2005) observaram que a presença da inulina promoveu efeito bifidogênico, aumentando as populações do microrganismo probiótico em ensaios realizados *in vitro*, enquanto os testes realizados sem a presença de inulina apresentaram decréscimo nessas populações. Segundo os pesquisadores, a utilização de inulina em produtos alimentícios apresenta-se como uma boa alternativa para a obtenção de populações satisfatórias de bifidobactérias.

Na tentativa de aumentar a gama de produtos probióticos fabricados sem base láctea, KHALF *et al.* (2010) avaliaram a viabilidade de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 em uma bebida a base de seiva, suplementada com inulina. Os pesquisadores concluíram que, devido à presença de inulina, o probiótico apresentou populações constantes durante 28 dias de armazenamento refrigerado, atingindo populações de 7,80 log UFC/g.

SHIN *et al.* (2000), em estudo realizado com leite fermentado adicionado de *Bifidobacterium* spp. e suplementado com inulina, observaram que a concentração de 5% desse prebiótico foi suficiente para a obtenção de aumentos significativos na

viabilidade das cepas, comparando-se os leites fermentados suplementados aos leites fermentados controle (sem suplementação).

Contudo, no presente trabalho, embora a formulação M2 não tenha apresentado populações satisfatórias para um alimento probiótico entre o 21º e o 35º dia de armazenamento refrigerado, os resultados obtidos com relação à viabilidade de Bb-12 em margarina permitem afirmar que esse produto pode ser considerado uma matriz alimentícia adequada para a incorporação e veiculação de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12. Isso ocorre, uma vez que para as demais formulações estudadas, as populações mantiveram-se satisfatórias por até 35 dias de armazenamento a $5\pm1^{\circ}\text{C}$, principalmente quando as formulações foram adicionadas de inulina em diferentes concentrações.

Algumas alterações na fase aquosa são recomendadas para que a viabilidade do probiótico seja adequada para alimentos, de acordo com o preconizado pela legislação brasileira vigente. Além dos resultados positivos observados no presente trabalho com relação à suplementação da fase aquosa, outros resultados da literatura também observaram a importância da suplementação dessa fase. CHARTERIS *et al.* (2002) em estudo com *table biospread* (alimento a base de emulsão adicionado de microrganismos probióticos), contendo *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium infantis*, observaram populações de $4,5\times10^8$ e $1,0\times10^6$ UFC/mL, respectivamente, quando diferentes composições da fase aquosa foram testadas, contendo ingredientes como L-cisteína, alginato de sódio e soro de leite em pó.

Em outro estudo, embora sem alterações na formulação da fase aquosa, DOMMELS *et al.* (2009) confirmaram que os *spreads* podem veicular probióticos em concentrações elevadas: os pesquisadores testaram a viabilidade de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 e *Lactobacillus rhamnosus* GG adicionados em um *spread* produzido com 28% de lipídios (*low fat spread*). Após 6 semanas de armazenamento

refrigerado dos produtos, os pesquisadores observaram populações de $2,85 \times 10^8$ e $1,65 \times 10^9$ UFC/g, para *L. reuteri* DSM 17938 e *L. rhamnosus* GG, respectivamente.

Além das populações satisfatórias observadas no presente trabalho, outros fatores apresentam-se como positivos para a suplementação de margarina com probióticos: a margarina, devido à alta concentração de lipídios (quando comparada a outros alimentos como iogurtes e queijos) também apresenta vantagens para a incorporação de probióticos por conferir proteção a esses microrganismos durante a passagem através do trato gastrointestinal humano, onde o probiótico é exposto à ação do suco gástrico e pancreático e à bile (GARDINER *et al.*, 1998; STANTON *et al.*, 1998; DAIGLE *et al.*, 1999; CORBO *et al.*, 2001; HELLER *et al.*, 2003; BOYLSTON *et al.*, 2004; BERGAMINI *et al.*, 2005; ROY, 2005; SHEEHAN *et al.*, 2007).

Aliado a esse fato, margarinas são consideradas alimentos favoráveis para a veiculação de ingredientes funcionais, como culturas probióticas, uma vez que são ingeridas diariamente (DECKERE & VERSCHUREN, 2000).

Conforme observado neste tópico, os resultados obtidos para as populações do microrganismo probiótico no presente trabalho foram distintos, quando os ingredientes utilizados como variáveis nas formulações (inulina, WPC e CMP) foram adicionados em diferentes concentrações e combinações. Dessa maneira, para uma explicação detalhada das possíveis interações entre esses ingredientes e consequente efeito sobre a viabilidade do probiótico, foram testados diferentes modelos estatísticos (empregando-se modelo de regressão linear, quadrático e cúbico especial), para que se obtivesse o melhor modelo ajustado, capaz de explicar o comportamento dessa variável resposta em função da presença isolada e/ou possíveis interações entre os fatores estudados, a saber: inulina (x_1), WPC (x_2) e CMP (x_3).

Inicialmente, optou-se por utilizar os resultados obtidos ao 21º dia de armazenamento refrigerado dos produtos para a obtenção do modelo estatístico. Esse

período de armazenamento foi escolhido, uma vez que os dados obtidos na análise microbiológica atenderam a exigência matemática da metodologia da superfície de resposta, pois se observou homogeneidade de variância e diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações ao longo de todo o período de armazenamento estudado. Além disso, as formulações de margarinas ainda apresentavam populações de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 acima das concentrações mínimas exigidas para um alimento probiótico.

O modelo linear foi estatisticamente significativo ($p < 0,01$), no entanto, apresentou falta de ajuste (*lack of fit*) significativa ($p < 0,01$), além de apresentar um baixo coeficiente de determinação ($R^2 = 63,43\%$). O modelo cúbico especial, mesmo com a exclusão das interações não significativas, não foi estatisticamente significativo ($p = 0,06$), apresentando falta de ajuste significativa ($p < 0,01$).

O modelo quadrático, com a exclusão das interações não significativas (x_1x_2 e x_1x_3) foi o modelo estatístico selecionado para representar a variável resposta em questão (população de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 ao 21º dia de armazenamento). Esse modelo foi significativo ($p < 0,01$), apresentou falta de ajuste não significativa ($p = 0,065230$) e coeficiente de determinação (R^2) elevado, capaz de explicar 87,85% da variação observada. Os coeficientes do modelo quadrático obtido, calculados por regressão múltipla, utilizando-se os resultados obtidos para as contagens do microrganismo probiótico *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 ao 21º dia de armazenamento refrigerado das margarinas, bem como a análise de variância detalhada para o modelo obtido são apresentados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Coeficientes* calculados por regressão múltipla, seus respectivos erros-padrão e intervalos de confiança (IC) de 95% obtidos para o modelo quadrático, a partir dos resultados experimentais de contagem do microrganismo probiótico *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 nas margarinas M1 a M7 (emulsão), ao 21º dia de armazenamento refrigerado ($5\pm 1^\circ\text{C}$).

	Fatores e interação significativa**			
	x_1	x_2	x_3	x_2x_3
Coeficientes	8,26	6,61	8,03	2,72
Erro padrão	0,08	0,09	0,09	0,34
IC 95%	[8,10; 8,41]	[6,43; 6,79]	[7,85; 8,21]	[2,01; 3,42]
p	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

* Coeficientes significativos estatisticamente.

** x_1 : inulina; x_2 : WPC; x_3 : CMP.

Tabela 7. Análise de variância obtida para o modelo quadrático, ajustado aos resultados experimentais de contagem do microrganismo probiótico *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 nas margarinas M1 a M7 (emulsão), ao 21º dia de armazenamento refrigerado ($5\pm 1^\circ\text{C}$).

Fontes de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado	p
Regressão	8,183379	3	2,727793	74,68341*	0,000000
Resíduo	1,132267	31	0,036525		
Falta de ajuste	0,253505	3	0,084502	2,69248	0,065230
Erro puro	0,878762	28	0,031384		
Total	9,315646	34	0,273990		
R²	87,85%				
R² ajustado	86,67%				

* Significativo ao nível de 95% de probabilidade ($p < 0,05$).

Assim, a equação que representa o modelo estatístico ajustado, obtido para a variável resposta população de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 ao 21º dia de armazenamento para as margarinas M1 a M7 na fase emulsão é representada da seguinte maneira, sendo o número apresentado abaixo dos coeficientes o erro-padrão de cada coeficiente estimado:

$$\hat{y}_{(1)} = 8,26x_1 + 6,61x_2 + 8,03x_3 + 2,72x_2x_3$$

$(\pm 0,08)$ $(\pm 0,09)$ $(\pm 0,09)$ $(\pm 0,34)$

onde $\hat{y}_{(1)}$ é a contagem estimada do microrganismo probiótico *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 aos 21 dias de armazenamento refrigerado a $5\pm 1^\circ\text{C}$.

O modelo indica que a resposta população de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 aos 21 dias de armazenamento refrigerado a $5\pm 1^\circ\text{C}$ foi dependente da presença isolada de inulina, WPC e CMP. A interação binária entre os ingredientes WPC e CMP também foi importante, uma vez que o coeficiente positivo indica que essa interação pode resultar em aumento nas populações do microrganismo probiótico Bb-12, quando adicionado em margarina.

Por outro lado, as interações binárias inulina + WPC e inulina + CMP, bem como a interação ternária inulina + WPC + CMP não foram estatisticamente significativas para essa resposta analisada. Isso pode ser um indicativo de que a utilização desses ingredientes conjuntamente (nas combinações estudadas no presente trabalho) pode ser alterada, possivelmente com exclusão de algumas combinações. Contudo, tais alterações, considerando-se o modelo obtido, poderiam ser vantajosas para a indústria, uma vez que a utilização dos ingredientes inulina, WPC e CMP isolados também resultaram em margarinas com concentrações desejáveis de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 ao 21º dia de armazenamento para um alimento probiótico, tendo em vista a legislação brasileira vigente (ANVISA, 2008).

O modelo ajustado para essa variável resposta está representado graficamente na Figura 12, em um diagrama triangular. Os três vértices correspondem às respostas dos fatores estudados (inulina, WPC e CMP). Os pontos sobre os lados do triângulo equilátero representam os resultados das misturas binárias. Na região interna do diagrama, são encontradas as respostas referentes às misturas ternárias.

Figura 12. Diagrama triangular para a viabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 nas margarinas M1 a M7, ao 21º dia de armazenamento refrigerado ($5 \pm 1^\circ\text{C}$), onde x_1 , x_2 e x_3 são os fatores inulina, WPC e CMP, respectivamente.

De acordo com o diagrama para essa resposta, pode-se observar que as maiores populações de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 ao 21º dia de armazenamento refrigerado são obtidas quando o ingrediente inulina está na proporção variando entre 3% e 0,75% (pontos 1 e 0,25 do diagrama). Da mesma maneira, o ingrediente CMP utilizado na proporção entre 2,25% e 3% (pontos 0,75 e 1 do diagrama) nas formulações também resulta em maiores populações do probiótico.

4.1.2. Bactérias indicadoras de contaminação - coliformes totais, *Escherichia coli*, bolores e leveduras

A margarina e os demais produtos alimentícios denominados *spreads* possuem, em geral, características intrínsecas que impedem a multiplicação de microrganismos patogênicos nesse tipo de alimento, como baixa atividade de água, pequeno diâmetro

(<5µm) dos glóbulos de água e a incapacidade dos microrganismos de se moverem entre esses glóbulos. Além disso, a disponibilidade de nutrientes dentro dos glóbulos é escassa (DELAMARRE & BATT, 1999; CHARTERIS *et al.*, 2002; VAN DALEN, 2002; HOLLIDAY *et al.*, 2003). Entretanto, a adição de conservantes às fases aquosa e gordurosa pode ser realizada para aumentar a vida de prateleira dos produtos.

Bolores e leveduras estão entre os microrganismos contaminantes mais comumente detectados em margarinas. Ao contrário das bactérias e leveduras, os bolores possuem a capacidade de se locomoverem entre os glóbulos de gordura. Tal contaminação pode ser detectada visualmente, devido à formação de micélio (DELAMARRE & BATT, 1999).

No presente trabalho, optou-se pela não adição de conservantes aos produtos, para que uma possível interferência desse ingrediente sobre a viabilidade de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 não ocorresse. Por outro lado, CHARTERIS *et al.* (2002), em estudo realizado com *table biospread* (alimento a base de emulsão adicionado de microrganismos probióticos) contendo *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium infantis*, verificaram que a presença de sorbato de potássio na fase aquosa não afetou a viabilidade das culturas probióticas adicionadas ao produto. Esses microrganismos permaneceram com populações acima de 8,00 e 6,00 log UFC/g, respectivamente, quando diferentes composições da fase aquosa foram testadas, contendo ingredientes como L-cisteína, alginato de sódio e soro de leite em pó.

No presente trabalho, a ausência dos conservantes não provocou comprometimento microbiológico dos produtos analisados. Para todas as formulações, não foram detectadas contagens positivas de bolores e leveduras, bem como de coliformes totais e *Escherichia coli*. Tal fato pode estar associado às barreiras físicas do próprio produto discutidas anteriormente e à possível síntese de compostos inibitórios pela cultura de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 como, por exemplo, ácidos

orgânicos. Esses fatores, associados à aplicação das boas práticas de fabricação durante todas as etapas de produção das margarinas, colaboraram para a inibição da multiplicação de microrganismos indesejáveis nos produtos.

4.2. Sobrevivência de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 nas diferentes margarinas, quando submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*

Quando ingerida, a emulsão é inicialmente misturada à saliva, ocorrendo alterações em seu pH e temperatura. Além disso, a emulsão sofre a primeira ação das enzimas digestivas e interage com a superfície da língua. Esses fatores podem resultar em modificações no tamanho dos glóbulos de gordura da emulsão. No estômago, a emulsão é exposta a condições ácidas drásticas (pH variando entre 1-3), em virtude da ação do ácido clorídrico, juntamente com as enzimas digestivas. Assim, as lipases gástricas iniciam o processo de digestão dos lipídios emulsificados. No intestino, ainda ocorrerão futuras modificações na composição e estrutura dos lipídios. No intestino delgado, os lipídios parcialmente hidrolisados e emulsificados são misturados a sucos digestivos contendo sais de bile, lipase pancreática, colipases e bicarbonato, dentre outros compostos (ARMAND, 2007; HUR *et al.*, 2009).

A bile é um composto aquoso esverdeado, cujos constituintes principais incluem sais de bile, colesterol, fosfolipídios e o pigmento biliverdina, e é definida como um detergente biológico, que é sintetizado no fígado a partir do colesterol, estocado e concentrado na vesícula biliar. Durante a digestão, a bile é secretada no intestino, onde desempenha seu papel principal na emulsificação e absorção de gorduras. Além disso, a bile possui uma importante ação antimicrobiana, causando danos à membrana de microrganismos e estresse oxidativo ao DNA (BEGLEY *et al.*, 2006; SÁNCHEZ *et al.*, 2007). Por esse motivo, a bile representa o principal desafio à sobrevivência e

consequente colonização do epitélio intestinal pelos probióticos, uma vez que tais efeitos antimicrobianos, que atuam sobre microrganismos patogênicos, atuam igualmente sobre os microrganismos probióticos ingeridos em alimentos (BEGLEY *et al.*, 2005). Da mesma forma, o ácido clorídrico e a pepsina, que atuam como uma barreira contra microrganismos possivelmente patogênicos, também podem resultar em diminuição da viabilidade de probióticos (EL-SHAFEI *et al.*, 2010).

Assim, a resistência de microrganismos probióticos à ação da bile, ácido clorídrico e demais enzimas envolvidas no processo digestivo é um importante pré-requisito para a sua inserção em uma matriz alimentar. No Brasil, a documentação referente à comprovação de eficácia de um microrganismo probiótico exige a inclusão de testes de resistência da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e aos sais biliares (ANVISA, 2008).

Dessa maneira, é de grande importância a avaliação dos efeitos dos processos digestivos sobre a margarina desenvolvida no presente trabalho - contendo o microrganismo probiótico – a fim de que o comportamento de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 inserido nessa matriz seja melhor compreendido, quando exposto às condições anteriormente descritas.

A sobrevivência da cepa probiótica *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 em margarina (M1 a M7) submetida às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro* após 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado dos produtos a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ está representada nas Figuras 13 a 16.

Figura 13. Sobrevivência de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 nas margarinas M1 a M7 submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, após 7 dias de armazenamento refrigerado ($5\pm 1^\circ\text{C}$) (Veja a Tabela 2 para a descrição das margarinas M1 a M7). * Tempo 0: populações (média) observadas para cada margarina ao 7º dia de armazenamento refrigerado. Resultados com variâncias homogêneas entre os tratamentos para cada tempo e ao longo do armazenamento para cada tratamento ($p>0,01$). ^{A,B,C,D}: letras maiúsculas distintas sobrescritas indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as diferentes formulações de margarina para o 7º dia de armazenamento para cada tempo de coleta. ^{a,b,c}: letras minúsculas distintas sobrescritas indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre cada tempo de coleta ao longo do ensaio *in vitro* para uma mesma formulação.

Figura 14. Sobrevivência de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 nas margarinas M1 a M7 submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, após 14 dias de armazenamento refrigerado ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$) (Veja a Tabela 2 para a descrição das margarinas M1 a M7). * Tempo 0: populações (média) observadas para cada margarina ao 14º dia de armazenamento refrigerado. Resultados com variâncias homogêneas entre os tratamentos para cada tempo e ao longo do armazenamento para cada tratamento ($p>0,01$). ^{A,B,C,D,E}: letras maiúsculas distintas sobrescritas indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as diferentes formulações de margarina para o 14º dia de armazenamento para cada tempo de coleta. ^{a,b,c}: letras minúsculas distintas sobrescritas indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre cada tempo de coleta ao longo do ensaio *in vitro* para uma mesma formulação.

Figura 15. Sobrevivência de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 nas margarinas M1 a M7 submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, após 21 dias de armazenamento refrigerado ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$) (Veja a Tabela 2 para a descrição das margarinas M1 a M7). * Tempo 0: populações (média) observadas para cada margarina ao 21º dia de armazenamento refrigerado. Resultados com variâncias homogêneas entre os tratamentos para cada tempo e ao longo do armazenamento para cada tratamento ($p>0,01$). ^{A,B,C,D}: letras maiúsculas distintas sobrescritas indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as diferentes formulações de margarina para o 21º dia de armazenamento para cada tempo de coleta. ^{a,b,c}: letras minúsculas distintas sobrescritas indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre cada tempo de coleta ao longo do ensaio *in vitro* para uma mesma formulação.

Figura 16. Sobrevivência de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 nas margarinas M1 a M7 submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, após 28 dias de armazenamento refrigerado ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$) (Veja a Tabela 2 para a descrição das margarinas M1 a M7). * Tempo 0: populações médias observadas para cada margarina ao 28º dia de armazenamento refrigerado. Resultados com variâncias homogêneas entre os tratamentos para cada tempo e ao longo do armazenamento para cada tratamento ($p > 0,01$). ^{A,B,C,D,E,F}: letras maiúsculas distintas sobrescritas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes formulações de margarina para o 28º dia de armazenamento para cada tempo de coleta. ^{a,b,c}: letras minúsculas distintas sobrescritas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre cada tempo de coleta ao longo do ensaio *in vitro* para uma mesma formulação.

Conforme discutido anteriormente, a resistência dos microrganismos probióticos à ação dos sais biliares e suco gástrico é importante para que eles atinjam o intestino humano (principalmente o cólon, no caso de *Bifidobacterium* spp.) viáveis e em concentrações suficientes. Por isso, alguns sistemas têm sido propostos para promover a chegada de microrganismos probióticos viáveis ao intestino humano (SHAH, 2000). Uma técnica bastante estudada, que pode auxiliar na manutenção da viabilidade desses microrganismos, tanto durante as etapas de produção do alimento como durante o seu armazenamento e digestão, é a microencapsulação (KRASAEKOOPT *et al.*, 2003; DING & SHAH, 2007; DING & SHAH, 2009; GBASSI *et al.*, 2009). Entretanto, o emprego da técnica de microencapsulação pode apresentar algumas restrições, uma vez que essa técnica pode resultar em certas consequências para a qualidade sensorial dos alimentos, pois pode afetar a textura dos alimentos, causando percepção de arenosidade durante seu consumo, além dos problemas na produção em larga escala das cápsulas (ROKKA & RANTAMÄKI, 2010).

Por outro lado, a matriz alimentícia apresenta-se como um fator de grande importância com relação à proteção dos microrganismos probióticos durante o processo de digestão dos alimentos.

Alimentos como queijo e iogurtes já foram testados, com o objetivo de se avaliar qual seria a melhor matriz para a veiculação de microrganismos probióticos. O queijo, por exemplo, tem sido amplamente estudado e alguns trabalhos afirmam que o pH, a atividade de água, a matriz sólida dos queijos e a concentração relativamente alta de gordura neles presente podem oferecer proteção às bactérias probióticas durante a sua passagem pelo trato gastrointestinal, sugerindo que o queijo é o produto mais adequado como veículo para os probióticos, quando comparados a leites fermentados e iogurtes (GARDINER *et al.*, 1998; STANTON *et al.*, 1998; DAIGLE *et al.*, 1999; CORBO *et al.*, 2001; HELLER *et al.*, 2003; BOYLSTON *et al.*, 2004; BERGAMINI *et al.*, 2005).

No presente trabalho, optou-se por trabalhar com um valor de pH na fase gástrica próximo de 2,0, para simular condições mais próximas do que ocorre quando o probiótico é ingerido em conjunto com alimentos sólidos e líquidos que incluem alimentos ricos em proteínas, como leite, queijos, soja e outros alimentos que acabam elevando o pH do estômago (KALANTZI *et al.*, 2006; KONG & SINGH, 2008). Ao 7º dia de armazenamento, a formulação M2 apresentou redução de aproximadamente 5 log na população de Bb-12 após as 2h iniciais do ensaio. As demais formulações de margarinas analisadas apresentaram redução de aproximadamente 2 log nas populações de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 após 2h do início do ensaio *in vitro*. Resultados semelhantes foram observados por HANSEN *et al.* (2002) que relataram diminuições de aproximadamente 1,3 log UFC/g nas populações de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 após exposição ao pH 2,0, durante 2 horas. As reduções observadas nas populações do probiótico após o término da fase gástrica foram estatisticamente significativas para todas as formulações ($p < 0,05$). A redução observada após 2h de iniciados os testes pode ser explicada pelo baixo pH da fase gástrica simulada (próximo de 2,0 – **ANEXO IV**).

Embora as reduções observadas, exceto para M2, nesta fase do ensaio apresentaram-se próximas para todas as formulações, as margarinas M1, M3 e M7 apresentaram reduções um pouco inferiores nessa etapa. Possivelmente, a inulina e o CMP auxiliaram na proteção do probiótico, efeito este não observado quando o WPC foi adicionado isoladamente à margarina (M2), uma vez que o probiótico não foi detectado nas três etapas do teste *in vitro* ao 28º dia de armazenamento (Figura 16). As contagens apresentadas na Figura 14 para M2 foram inferiores ao limite de detecção do método: $< 1,01$ log UFC/g para 2 horas de teste, $< 1,06$ log UFC/g para 4 horas de teste e $< 1,10$ log UFC/g para 6 horas de teste. Além disso, é necessário destacar que dentre todas as formulações estudadas, M2 apresentou diminuição progressiva nas

populações de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 durante o armazenamento refrigerado, o que resultou em menor resistência durante os ensaios *in vitro*.

Conforme citado anteriormente, a adição de WPC pode auxiliar a multiplicação de bactérias probióticas quando presente em um alimento. Além disso, em estudos realizados com a cepa de *Lactobacillus acidophilus* M92, a presença de WPC auxiliou na manutenção da viabilidade das células, quando as mesmas foram submetidas a ensaios de resistência *in vitro* ao trato gastrointestinal humano (KOS *et al.*, 2000). Entretanto, no presente trabalho, a adição de WPC não auxiliou a multiplicação e/ou manutenção da viabilidade da cultura probiótica durante o armazenamento e não protegeu o microrganismo quando submetido à simulação da passagem pelo trato gastrointestinal humano, principalmente durante a fase gástrica (Figuras 13 a 16).

Por outro lado, a adição de CMP à margarina contendo Bb-12 foi importante para a proteção do probiótico durante os ensaios de resistência *in vitro* da formulação M3. Segundo CHARTERIS *et al.* (1998b), a presença de proteínas do leite pode proteger o microrganismo probiótico durante o trânsito pelo trato gastrointestinal. No presente trabalho, as populações observadas após 6h de ensaio de resistência *in vitro* para M3 foram significativamente superiores ($p < 0,05$) às populações observadas para M4, ao 28º dia de armazenamento.

A fase gástrica é considerada uma potente barreira para os microrganismos que necessitam atingir o intestino humano para se multiplicarem e promoverem a colonização do epitélio intestinal, como é o caso dos probióticos (MORELLI, 2007). Diversos trabalhos científicos demonstraram o efeito do baixo pH da fase gástrica sobre a diminuição da viabilidade celular de cepas probióticas submetidas a ensaios de resistência *in vitro*, simulando o trato gastrointestinal humano. FÁVARO-TRINDADE & GROSSO (2002) reportaram que células de *Lactobacillus acidophilus* La-5

apresentaram redução de 1 ciclo log após 2h de exposição ao pH 2. Porém, as mesmas células foram completamente destruídas após 1h de exposição ao pH 1.

No presente trabalho, observou-se redução estatisticamente significativa nas populações do microrganismo probiótico após o período de 2h de ensaio (correspondente à fase gástrica) para todas as formulações analisadas durante todo o armazenamento estudado ($p < 0,05$). Após essa drástica redução nas populações do probiótico, salvo raras exceções, observou-se a manutenção da viabilidade entre as duas fases entéricas simuladas (4 e 6 horas de ensaio), uma vez que as populações observadas foram estatisticamente iguais ($p > 0,05$). Entretanto, na maioria dos períodos de armazenamento analisados (exceto para M5 ao 7º dia, M3 ao 21º dia, M4 ao 28º dia e M6 ao 28º dia, nos quais detectou-se redução significativa ($p < 0,05$) nas populações ao término do ensaio *in vitro* - após 6 horas de ensaio) foi observada a recuperação do microrganismo probiótico, quando submetido às etapas da fase entérica simulada, seguintes à fase gástrica (pH 5,0 e pH 7,0, respectivamente). Além disso, é importante destacar que algumas formulações apresentaram aumento estatisticamente significativo nas populações de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 observadas entre o término da fase gástrica (2h) e a segunda etapa entérica (6h), como, por exemplo, M1 e M6 ao 7º dia; M1, M2 e M7 ao 14º dia, M2 ao 21º e M5 ao 28º dia ($p < 0,05$) (Figuras 13 a 16).

Contudo, alguns resultados, mesmo com reduções significativas ao término do ensaio *in vitro*, mostraram-se mais satisfatórios do que o observado na literatura. Em estudos *in vitro* conduzidos com musse contendo *L. acidophilus* La-5 adicionada simultaneamente de inulina e WPC, BURITI *et al.* (2010b) concluíram que esses dois ingredientes, quando adicionados conjuntamente, não atuaram positivamente na proteção do probiótico durante os ensaios, quando tal formulação foi comparada com a formulação onde a inulina foi associada à gordura do leite. Quando esses dois

ingredientes foram adicionados à margarina (formulação M4), um aumento significativo nas populações de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 foi observado entre 4 e 6 horas de ensaio *in vitro*, após o 7º dia de armazenamento ($p < 0,05$).

No presente trabalho, os resultados observados revelaram que a fase gástrica apresentou-se como sendo a fase mais crítica do ensaio, embora a presença de pepsina tenha sido considerada positiva na manutenção da viabilidade de probióticos, quando submetidos a condições muito ácidas. SCHILLINGER *et al.* (2005) observaram que cepas de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus johnsonii* foram mais tolerantes ao suco gástrico simulado contendo pepsina, quando comparados às cepas de *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*.

Resultados obtidos por GUO *et al.* (2009) demonstraram que a presença de pepsina no suco gástrico simulado apresentou um impacto positivo sobre a sobrevivência dos microrganismos probióticos testados. A presença de pepsina melhorou a viabilidade das cepas *L. casei* Zhang, *L. acidophilus* NCFM, *L. rhamnosus* GG e *B. animalis* Bb-12, em três diferentes condições ácidas testadas, quando os resultados obtidos foram comparados àqueles observados em ensaios nos quais as cepas foram submetidas somente à ação do tampão fosfato.

Similarmente, MÄTTÖ *et al.* (2006a) observaram que a presença de pepsina aumentou a sobrevivência de *B. animalis* subsp. *lactis* durante sua exposição ao baixo pH, que variou entre 2,0 e 3,0. Entretanto, o efeito protetor da pepsina não foi observado para outras cepas de *Bifidobacterium* encontradas no trato gastrintestinal humano (*Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium breve*). Nesse mesmo estudo, os pesquisadores observaram que um efeito protetor sobre a viabilidade das células de *B. animalis* subsp. *lactis* E2010 submetidas a pH de 2,5 e 2,0 foi obtido, utilizando-se concentrações de 3 e 1,5 g/L de pepsina. Por outro lado, quando a concentração de 0,5 g/L foi testada, não foi possível

observar uma atuação positiva sobre a proteção das células. Os autores observaram que a hiperpolarização da membrana foi menor nas amostras tratadas com pepsina. O mecanismo de tolerância de *B. animalis* subsp. *lactis* parece ser dependente da atividade de H⁺-ATPase na membrana celular, induzida pelo baixo pH. Como explicação para esse efeito protetor, os autores sugeriram que a pepsina auxilia na manutenção da homeostase do pH nas células de *B. animalis* subsp. *lactis*, dando suporte ao papel da H⁺-ATPase na capacidade protetora da pepsina nesse microrganismo. Segundo os pesquisadores, a atividade da enzima pepsina auxiliou as células a regenerarem ATP para a bomba de prótons.

Entretanto, no presente trabalho, embora a mesma concentração de pepsina utilizada por MÄTTÖ *et al.* (2006a) tenha sido utilizada (3 g/L), a presença dessa enzima parece não ter auxiliado na manutenção da viabilidade do probiótico durante a fase gástrica, uma vez que a redução observada para M2 foi muito expressiva.

Provavelmente, no presente trabalho, a ação do baixo pH da fase gástrica provocou a injúria de parte das células viáveis, apresentando posterior recuperação quando submetidas ao pH mais elevado (5,0 e 7,0). Embora a presença de sais biliares e pancreatina no intestino apresente-se como um fator adverso à sobrevivência de bactérias probióticas, o pH do intestino é mais favorável à sua sobrevivência, quando comparado ao pH estomacal (THOMSON *et al.*, 2003; MASCO *et al.*, 2007).

TAKAHASHI *et al.* (2004), em estudos *in vitro* simulando o trato gastrointestinal humano, relataram que *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium adolescentis* apresentaram, em sua maioria, uma taxa de sobrevivência inferior a 1%, com exceção de *B. longum*, que apresentou sobrevivência de 25% após incubação em pH 3,0, durante o período de 2 horas.

VERNAZZA *et al.* (2006) avaliaram a resistência de *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083, *Bifidobacterium infantis* DSM20088, *Bifidobacterium longum* DSM 20219, *Bifidobacterium animalis* Bb-12 e *B. longum* 46 às condições encontradas no trato gastrointestinal humano. Os pesquisadores observaram que o pH 2 foi letal para todas as cepas testadas, com apenas 10 minutos de exposição, exceto para *B. animalis* Bb-12.

Sistemas *in vitro* têm sido utilizados para a avaliação de novos microrganismos potencialmente probióticos, utilizando condições próximas àquelas encontradas em humanos (fase gástrica com pH variando entre 2,0 e 4,0; tempo variando entre 70 e 180 min) (PARK *et al.*, 2002; MATSUMOTO *et al.*, 2004; TAKAHASHI *et al.*, 2004). Entretanto, é importante destacar que, até o presente, quase que a totalidade dos ensaios *in vitro* realizados para avaliar a resistência de microrganismos probióticos à ação do suco gástrico, suco pancreático e bile tem sido conduzidos utilizando-se sucos gástricos simulados ou artificiais, bile bovina ou suína e vários tipos de extratos pancreáticos de animais (DEL PIANO *et al.*, 2006a). Testes futuros, empregando-se bile humana, apresentam-se como importantes ensaios para melhor caracterização da resistência de cepas probióticas ao trato gastrointestinal humano, uma vez que DEL PIANO *et al.* (2006b) demonstraram que cepas probióticas são claramente menos sensíveis à ação da bile humana do que à ação da bile bovina.

Diversos estudos empregando cepas de bifidobactérias tem demonstrado que tais microrganismos apresentam alta sensibilidade a valores baixos de pH, embora a tolerância a condições ácidas dependa de cada microrganismo. Contudo, estudos realizados com a cepa de *B. animalis* Bb-12 revelaram boa resistência desse microrganismo às condições simuladas do trato gastrointestinal humano.

MATSUMOTO *et al.* (2004) observaram que *B. longum*, *B. adolescentis* e *B. pseudocatenulatum* apresentaram redução em suas populações, após 1 hora de

incubação em pH 3,0. A única exceção observada foi a cepa de *B. animalis* subsp. *lactis*, que sobreviveu à exposição às alterações no pH, que variou na faixa entre 3,0 e 5,0, durante 3 horas. Entretanto, a viabilidade do microrganismo começou a reduzir, quando exposto ao pH 2,0, após 1 hora de incubação.

Em contrapartida, HANSEN *et al.* (2002) avaliaram a resistência de nove espécies de bifidobactérias submetidas às condições simuladas do trato gastrointestinal humano. A resistência à ação do suco gástrico e bile variou entre as diferentes cepas testadas. Entretanto, *B. animalis* Bb-12 apresentou-se significativamente mais resistente à ação do baixo pH e enzimas digestivas, quando comparado às demais cepas. Após permanecer durante 2 horas em pH 2,0, as populações de *B. animalis* Bb-12 apresentaram redução de 9,5 log UFC/mL para 8,2 log UFC/mL, enquanto que *B. bifidum* Bb-11 e *B. infantis* Bb-02 apresentaram diminuições significativas em suas populações, chegando a 10 UFC/mL nessas mesmas condições.

MAINVILLE *et al.* (2005) observaram que a resistência de *B. animalis* foi notavelmente superior à resistência observada para *B. infantis* e *B. longum*.

Estudos realizados por COLLADO *et al.* (2006) avaliaram a resistência de cepas de *Bifidobacterium* isoladas de fezes de indivíduos adultos e de crianças demonstraram que somente 40 a 50% dos microrganismos foram resistentes às condições gástricas simuladas (adição de pepsina 3 g/L e HCl), permanecendo com populações de 10^6 UFC/mL após 90 min de incubação em pH 2,0.

De maneira geral, embora redução significativa ($p < 0,05$) nas populações de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 tenha sido observada no presente trabalho após 2h de teste para todas as formulações, as populações observadas ao término do ensaio *in vitro* (após 6 horas) para a maioria das formulações (principalmente para M1) sugerem que a adição dessa cepa à alimentos pode resultar em populações satisfatórias ao término do processo digestivo. Semelhantemente, RITTER *et al.* (2009), após

verificarem que a cepa *B. animalis* apresentou-se menos sensível à ação de enzimas digestivas, sugeriram sua aplicação em alimentos probióticos, devido à sua elevada resistência aos processos de digestão pelos quais a cepa passa ao longo do trato gastrointestinal humano. Tal evidência, associada à matriz alimentar, pode resultar em ótimos resultados com relação à viabilidade de *B. animalis* durante a sua passagem pelo trato gastrointestinal humano.

A matriz alimentar estudada (margarina), combinada com alguns dos ingredientes utilizados em sua formulação (inulina e WPC e/ou CMP), bem como as características íntimas da cultura de Bb-12, como a sua capacidade de sobreviver a condições ácidas (JAYAMANNE & ADAMS, 2006; MÄTTÖ *et al.* 2006a) resultou em uma sobrevivência satisfatória, uma vez que foi possível recuperar populações do probiótico após 6h de ensaio até o último dia de armazenamento estudado (exceto para M2 ao 28º dia).

A resistência de microrganismos probióticos aplicados a emulsões em estudos conduzidos *in vitro* tem demonstrado a importância da matriz lipídica na proteção desses microrganismos, quando submetidos às condições do trato gastrointestinal humano.

SHEU & MARSHALL (1993) desenvolveram um método para proteger microrganismos probióticos, utilizando uma emulsão água em óleo e observaram sobrevivência de 40% das células. SHIMA *et al.* (2007) avaliaram a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* adicionado a uma emulsão múltipla - água em óleo em água (W/O/W) - que foi submetida às condições gástricas simuladas. Os autores observaram que o microrganismo probiótico adicionado à emulsão resistiu à ação do baixo pH: 49% das células permaneceram viáveis após 2 horas de ensaio. Por outro lado, testes realizados com adição direta do probiótico ao suco gástrico simulado resultaram em apenas 1,3% das células viáveis após 0,67 horas de ensaio.

Semelhantemente, HOU *et al.* (2003) testaram a utilização de emulsão produzida com óleo de gergelim na proteção de células de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* submetidas a testes de resistência *in vitro*, simulando a passagem pelas condições simuladas do trato gastrointestinal humano. Nesse estudo, as células de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* foram retidas pela emulsão e submetidas ao teste de resistência. Os pesquisadores concluíram que a presença da emulsão atuou como uma biocápsula, que desempenhou papel fundamental na proteção do microrganismo, quando comparado a testes realizados sem a presença da emulsão.

A formulação M1 (contendo 3% de inulina) apresentou populações acima de 6,00 log UFC/g, quando submetida ao ensaio de resistência *in vitro* após cada etapa simulada (2, 4 e 6h), durante todo o prazo de vida de prateleira estudado (Figuras 13 a 16). Semelhantemente, KHALF *et al.* (2010) em estudo *in vitro* realizado para avaliar a resistência de *B. animalis* Bb-12 às condições gastrintestinais simuladas, concluíram que a presença de inulina atuou positivamente na proteção do probiótico, resultando em altas populações de Bb-12 em cada fase do ensaio.

No presente trabalho, além da proteção conferida pela matriz lipídica da margarina, a presença da inulina, certamente, foi um fator adicional à sobrevivência de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12, uma vez que as populações do probiótico em M1 foram superiores às observadas nas demais formulações durante o ensaio *in vitro*. A inulina na matriz alimentícia liga-se à água ali disponível, formando, assim, um gel constituído de uma rede de partículas cristalinas que se assemelham a cristais de gordura em óleo (FRANCK, 2008). Possivelmente, para a formulação M1, tal rede pode ter colaborado com a proteção do microrganismo nos ensaios de resistência *in vitro*, uma vez que essa rede de partículas pode ter atuado como uma camada de proteção adicional àquela conferida pela presença dos lipídios da margarina, também importantes durante os ensaios de resistência *in vitro*.

Ao contrário do observado neste trabalho, KHALF *et al.* (2010) em ensaio de resistência *in vitro* com uma bebida a base de seiva com *B. animalis* Bb-12, observaram que as principais reduções nas populações do microrganismo probiótico ocorreram quando submetidas às fases entéricas, indicando que a bile parece ser muito mais prejudicial para o microrganismo, se comparado com o ácido gástrico.

Segundo PACHECO *et al.* (2010), as condições encontradas no trato gastrointestinal humano são muito agressivas para um microrganismo probiótico. No entanto, o presente trabalho demonstrou que quando o probiótico é consumido inserido na margarina, tal matriz desempenha um importante papel na proteção desses microrganismos, aumentando a probabilidade de que o microrganismo probiótico atinja o intestino humano viável e em altas concentrações, podendo, dessa forma, desempenhar suas funções benéficas ao indivíduo.

Para avaliar mais detalhadamente a influência dos ingredientes utilizados como variáveis nas formulações das margarinas M1 a M7 sobre a sobrevivência do microrganismo probiótico *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 às condições simuladas *in vitro* do trato gastrointestinal humano, foram testados diferentes modelos estatísticos (empregando-se modelo de regressão linear, quadrático e cúbico especial), para que se obtivesse o melhor modelo ajustado, capaz de explicar o comportamento dessa variável resposta, em função da presença isolada e/ou possíveis interações entre os fatores estudados, a saber: inulina (x_1), WPC (x_2) e CMP (x_3).

Assim como as demais variáveis selecionadas para a confecção do modelo estatístico, utilizou-se os dados de sobrevivência do probiótico ao término do ensaio de resistência *in vitro* (tempo de coleta 6 horas) ao 21º dia de armazenamento refrigerado dos produtos, que apresentaram homogeneidade de variância e diferenças significativas entre as formulações ao longo de todo o período de armazenamento estudado.

O modelo linear foi estatisticamente significativo ($p < 0,01$). No entanto, apresentou falta de ajuste (*lack of fit*) significativa ($p < 0,01$). O modelo cúbico especial não foi significativo estatisticamente, quando essa variável resposta foi analisada ($p < 0,01$).

O modelo quadrático que foi estatisticamente significativo ($p < 0,01$) e apresentou coeficiente de determinação elevado, sendo capaz de explicar 98,28% da variação observada. Além disso, apresentou falta de ajuste não significativa ($p = 0,665674$), sendo, portanto, selecionado para representar a variável resposta em questão (sobrevivência de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 às condições simuladas *in vitro* do trato gastrointestinal humano, após 6 horas de ensaio ao 21º dia de armazenamento refrigerado).

Os coeficientes do modelo quadrático obtido, calculados por regressão múltipla, bem como a análise de variância detalhada para o modelo obtido são apresentados nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8. Coeficientes* calculados por regressão múltipla, seus respectivos erros-padrão e intervalos de confiança (IC) de 95% obtidos para o modelo quadrático, a partir dos resultados experimentais para sobrevivência de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 às condições simuladas *in vitro* do trato gastrointestinal humano, após 6 horas de ensaio ao 21º dia de armazenamento refrigerado ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) das margarinas M1 a M7.

	Fatores e interações significativas**					
	x_1	x_2	x_3	x_1x_2	x_1x_3	x_2x_3
Coeficientes	7,14	1,14	5,48	6,16	-3,31	8,28
Erro padrão	0,12	0,07	0,08	0,48	0,39	0,34
IC 95%	[6,89; 7,39]	[1,00; 1,29]	[5,32; 5,63]	[5,20; 7,12]	[-4,10; -2,52]	[7,60; 8,97]
p	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

* Coeficientes significativos estatisticamente.

** x_1 : inulina; x_2 : WPC; x_3 : CMP.

Tabela 9. Análise de variância obtida para o modelo linear, ajustado aos resultados experimentais obtidos para sobrevivência de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 às condições simuladas *in vitro* do trato gastrointestinal humano, após 6 horas de ensaio ao 21º dia de armazenamento refrigerado (5±1°C) das margarinas M1 a M7.

Fontes de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado	p
Regressão	209,2520	5	41,85039	662,6715*	0,000000
Resíduo	3,6629	58	0,06315		
Falta de ajuste	0,0121	1	0,01208	0,1887	0,665674
Erro puro	3,6509	57	0,06405		
Total	212,9149	63	3,37960		
R²	98,28%				
R² ajustado	98,13%				

* Significativo ao nível de 95% de probabilidade (p<0,05).

A equação que representa o modelo estatístico ajustado, obtido para a variável resposta sobrevivência de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 às condições simuladas *in vitro* do trato gastrointestinal humano, após 6 horas de ensaio no 21º dia de armazenamento refrigerado das margarinas M1 a M7 é representada da seguinte maneira, sendo o número apresentado abaixo dos coeficientes o erro-padrão de cada coeficiente estimado:

$$\hat{y}_{(2)} = 7,14x_1 + 1,14x_2 + 5,48x_3 + 6,16x_1x_2 - 3,31x_1x_3 + 8,28x_2x_3$$

$(\pm 0,12)$ $(\pm 0,07)$ $(\pm 0,08)$ $(\pm 0,48)$ $(\pm 0,39)$ $(\pm 0,34)$

onde $\hat{y}_{(2)}$ é a contagem estimada da população de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 recuperada após o microrganismo ter sido submetido ao ensaio de resistência às condições simuladas *in vitro* do trato gastrointestinal humano, após 6 horas ao 21º dia de armazenamento refrigerado das margarinas.

O modelo indica que a resposta sobrevivência de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 em margarina armazenada por 21 dias, após 6 horas de ensaio de resistência *in vitro* foi dependente tanto da presença dos ingredientes isolados, embora em menor

proporção do ingrediente WPC, como também das interações binárias entre inulina e WPC (x_1x_2), inulina e CMP (x_1x_3), bem como da interação entre WPC e CMP (x_2x_3), interação essa que também foi importante para a manutenção da população do probiótico no produto ao 21º dia de armazenamento (Tabela 6).

O modelo ajustado para essa variável resposta está representado graficamente na forma de diagrama triangular (Figura 17). Os três vértices correspondem às respostas dos fatores estudados (inulina, WPC e CMP). Os pontos sobre os lados do triângulo equilátero representam os resultados das misturas binárias. Na região interna do diagrama, são encontradas as respostas referentes às misturas ternárias.

Figura 17. Diagrama triangular para sobrevivência de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 nas margarinas M1 a M7, submetidas a ensaios de resistência *in vitro* às condições simuladas do trato gastrintestinal humano após 6 horas de ensaio ao 21º dia de armazenamento refrigerado ($5\pm 1^\circ\text{C}$), onde x_1 , x_2 e x_3 são os fatores inulina, WPC e CMP, respectivamente.

De acordo com o diagrama para essa resposta, pode-se observar que as maiores populações de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 ($>7,00$ log UFC/g) ao 21º dia de armazenamento refrigerado após o término do ensaio de resistência *in vitro* são obtidas quando o ingrediente inulina está na proporção variando entre 3% e 2,25% (pontos 1 e 0,75 do diagrama). Da mesma maneira, quando ingrediente CMP varia nessas mesmas proporções (pontos 1 e 0,75 do diagrama), pode-se observar uma sobrevivência, satisfatória do probiótico após 6 horas de ensaio de resistência *in vitro*. Tais populações, embora estejam abaixo de 7,00 log UFC/g, encontram-se na faixa onde as contagens estão entre 5,25 e 6,25 log UFC/g.

Em se tratando de sobrevivência de um microrganismo probiótico submetido às condições simuladas do trato gastrointestinal humano, pode-se considerar que esse ingrediente, assim como a inulina, pode auxiliar o microrganismo, provavelmente protegendo-o contra a ação de sucos gástricos e entéricos durante o processo de digestão simulada, efeito este não observado quando o WPC (x_2) é utilizado nas maiores concentrações (3% e 2,25%; pontos 1 e 0,75 do diagrama, respectivamente).

4.3. Valores de pH

A Tabela 10 apresenta os valores de pH obtidos para as margarinas M1 a M7, após 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de armazenamento refrigerado a $5\pm 1^\circ\text{C}$.

Normalmente, produtos como margarinas e *spreads* possuem pH acima de 4,6 (GUENTERT & LINTON, 2003). A formulação M8 apresentou valores de pH sem alteração (5,50) durante o armazenamento refrigerado até o 21º dia de armazenamento. Apenas ao 28º e 35º dia, observou-se pequena variação nesses valores (5,48 e 5,41, respectivamente), porém, sem diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$). Quando comparada às demais formulações, foram observadas

diferenças significativas para todas as comparações, em todos os períodos de armazenamento ($p < 0,05$), uma vez que M8 apresentou valores superiores de pH. Tal fato está associado à ausência da bactéria probiótica, e consequente ausência de produção de ácidos, que colaborou para a diminuição do pH nas demais formulações.

Entre as demais formulações, as margarinas M1 e M5 (adicionadas de inulina) apresentaram os valores mais baixos ao término do armazenamento (4,50 e 4,74 respectivamente), ao contrário das demais formulações, que apresentaram valores superiores.

As formulações M1, M4 e M5 apresentaram decréscimo mais acentuado no pH, quando comparadas às demais, atingindo valores abaixo de 5,0 ao término do armazenamento. Esse resultado certamente está associado à presença de inulina nessas formulações. Cepas do gênero *Bifidobacterium* realizam um importante papel na fermentação de carboidratos no cólon humano. A maioria dos oligo e polissacarídeos são degradados a monossacarídeos, que, por sua vez, serão convertidos a hexoses para a via metabólica da fermentação. Subsequentemente, esses produtos serão convertidos a ácidos graxos de cadeia curta e outros compostos orgânicos (BROEK, 2008).

A análise estatística mostrou que o valor de pH observado para M1 ao término do armazenamento foi significativamente menor, quando comparado às demais formulações ($p < 0,05$), sendo igual estatisticamente apenas ao pH observado para a formulação M5 ($p > 0,05$). Todas as margarinas analisadas apresentaram, mesmo com variações ao longo do armazenamento, diminuição significativa nos valores de pH entre o 1º e o 35º dia de armazenamento ($p < 0,05$).

Tabela 10. Valores de pH (média $\pm$ desvio padrão) obtidos para as margarinas M1 a M7, após 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de armazenamento refrigerado a $5\pm 1^\circ\text{C}$. Veja a Tabela 2 para descrição das formulações.

Armazenamento (Dias)	pH						
	Margarina						
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
1	4,89 $\pm$ 0,05 ^{Eab}	5,42 $\pm$ 0,05 ^{Aa}	5,28 $\pm$ 0,05 ^{BCa}	5,19 $\pm$ 0,04 ^{BCDa}	5,12 $\pm$ 0,09 ^{Da}	5,36 $\pm$ 0,04 ^{ABa}	5,19 $\pm$ 0,08 ^{CDa}
7	4,96 $\pm$ 0,02 ^{Da}	5,29 $\pm$ 0,02 ^{Aa}	5,31 $\pm$ 0,01 ^{Aab}	5,13 $\pm$ 0,03 ^{Ba}	5,05 $\pm$ 0,03 ^{Cab}	5,21 $\pm$ 0,07 ^{ABab}	5,12 $\pm$ 0,15 ^{BCab}
14	4,97 $\pm$ 0,13 ^{Ca}	5,30 $\pm$ 0,16 ^{Aa}	5,23 $\pm$ 0,02 ^{Aab}	5,08 $\pm$ 0,10 ^{Bab}	5,07 $\pm$ 0,02 ^{Bab}	5,19 $\pm$ 0,07 ^{ABab}	5,05 $\pm$ 0,10 ^{Bab}
21	4,87 $\pm$ 0,11 ^{Cab}	5,28 $\pm$ 0,13 ^{Aa}	5,14 $\pm$ 0,01 ^{ACb}	5,00 $\pm$ 0,02 ^{BCab}	4,93 $\pm$ 0,15 ^{BCbc}	5,18 $\pm$ 0,12 ^{ABb}	5,08 $\pm$ 0,10 ^{ACab}
28	4,75 $\pm$ 0,03 ^{Bab}	5,23 $\pm$ 0,03 ^{Aab}	5,09 $\pm$ 0,01 ^{ACb}	5,03 $\pm$ 0,12 ^{ACab}	4,90 $\pm$ 0,13 ^{BCabc}	5,15 $\pm$ 0,07 ^{Ab}	4,99 $\pm$ 0,14 ^{ABb}
35	4,50 $\pm$ 0,10 ^{Bc}	5,10 $\pm$ 0,06 ^{Ab}	5,12 $\pm$ 0,06 ^{Ab}	4,98 $\pm$ 0,03 ^{Ab}	4,74 $\pm$ 0,02 ^{ABc}	5,10 $\pm$ 0,01 ^{Ab}	5,01 $\pm$ 0,12 ^{Ab}

^{A,B,C,D,E}: letras maiúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes formulações de margarinas estudadas para o mesmo período de armazenamento.

^{a,b,c}: letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes períodos de armazenamento para cada margarina estudada.

Embora diversos autores aleguem que as bifidobactérias sejam capazes de metabolizar os ingredientes WPC e CMP, quando adicionados conjuntamente em alimentos (GUSTAFSONA *et al.*, 2001; MARTÍN-DIANA *et al.*, 2003; JANER *et al.*, 2004; ANTUNES *et al.*, 2005; CHRISTOPHER *et al.*, 2006), certamente o ingrediente prebiótico foi o primeiro a ser metabolizado pelo probiótico, independentemente da concentração adicionada, resultando no baixo pH desses produtos. Tal afirmação está baseada nos resultados obtidos na análise microbiológica dos produtos, onde se pode observar que as formulações não adicionadas de inulina apresentaram constante diminuição nas populações de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12. Além disso, a formulação M1, que foi suplementada com 3% de inulina, apresentou pH próximo de 4,90, logo no primeiro dia de armazenamento refrigerado dos produtos. Esse resultado pode ser explicado, tendo em vista a capacidade da cepa de *Bifidobacterium* em fermentar a inulina (LÓPEZ-MOLINA *et al.*, 2005). Concomitantemente, foi possível observar que as populações detectadas para essa formulação foram superiores às demais, durante todo o armazenamento refrigerado, o que corrobora com a informação de que a cepa probiótica teria metabolizado a inulina presente no produto.

É importante ressaltar, também, que a fermentação do ingrediente prebiótico gera subprodutos, como, por exemplo, o ácido lático (BOSSCHER *et al.*, 2006). Uma vez sintetizados, os ácidos orgânicos podem ter colaborado para os baixos valores de pH observados nessa formulação. No entanto, a presença desses subprodutos dentro do glóbulo de água não afetou a viabilidade da cepa, visto que as populações observadas foram de 8,00 log UFC/g ao término do armazenamento a 5±1°C.

As formulações M2, M3, M6 e M7 apresentaram perfis próximos de pH ao término do armazenamento, não diferindo estatisticamente entre si ($p>0,05$). Embora a formulação M7 tenha sido adicionada de inulina, a concentração de 1% não provocou alterações significativas no pH dos produtos.

Segundo ANTUNES *et al.* (2005) a adição de WPC a alimentos resulta em um aumento da capacidade tamponante do meio no qual é adicionado, devido às proteínas e fosfatos presentes. Esse fato pode explicar o perfil de pH constante para a formulação M2, que não apresentou alterações significativas estatisticamente entre o 1º e o 28º dia de armazenamento. Da mesma maneira, as formulações M6 e M7, não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) nos valores de pH entre o 1º e 14º dia e entre o 1º e 21º dia, respectivamente.

Para uma explicação detalhada das possíveis interações entre os ingredientes inulina, WPC e CMP sobre a variação de pH dos produtos estudados, foram testados diferentes modelos estatísticos, para que se obtivesse o melhor modelo ajustado, capaz de explicar comportamento dessa variável resposta em função da presença isolada e/ou possíveis interações entre os fatores estudados, a saber: inulina (x_1), WPC (x_2) e CMP (x_3). Da mesma forma como realizado para a modelagem matemática das demais variáveis selecionadas, utilizou-se os resultados obtidos ao 21º dia de armazenamento refrigerado dos produtos para a obtenção do modelo estatístico, período este escolhido por apresentar resultados com homogeneidade de variância e diferenças significativas ($p<0,05$) entre as formulações. Além disso, ao 21º dia de armazenamento, todas as formulações estudadas apresentaram populações de Bb-12 apropriadas para um alimento probiótico.

O modelo linear foi estatisticamente significativo ($p<0,01$), apresentou falta de ajuste (*lack of fit*) não significativa ($p=0,863008$) e apresentou um coeficiente de determinação capaz de explicar 61,12% das variação observada. Os modelos quadráticos e cúbico especiais não foram estatisticamente significativos para essa variável resposta ($p=0,780798$ e $p=0,643671$, respectivamente), motivo pelo qual não foram selecionados.

Os coeficientes do modelo linear obtido, calculados por regressão múltipla, utilizando-se os resultados obtidos para os valores de pH das margarinas M1 a M7 ao 21º dia de armazenamento refrigerado, bem como a análise de variância detalhada para o modelo obtido são apresentados nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11. Coeficientes* calculados por regressão múltipla, seus respectivos erros-padrão e intervalos de confiança (IC) de 95% obtidos para o modelo linear, a partir dos resultados experimentais de pH observados para as margarinas M1 a M7, ao 21º dia de armazenamento refrigerado ($5\pm 1^\circ\text{C}$).

	Fatores**		
	x_1	x_2	x_3
Coeficientes	4,84	5,28	5,09
Erro padrão	0,05	0,04	0,05
IC 95%	[4,74; 4,94]	[5,20; 5,36]	[4,98; 5,19]
p	< 0,01	< 0,01	< 0,01

* Coeficientes significativos estatisticamente.

** x_1 : inulina; x_2 : WPC; x_3 : CMP.

Tabela 12. Análise de variância obtida para o modelo linear, ajustado aos resultados experimentais de pH observados para as margarinas M1 a M7, ao 21º dia de armazenamento refrigerado ($5\pm 1^\circ\text{C}$).

Fontes de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado	p
Regressão	0,569410	2	0,284705	22,79963*	0,000001
Resíduo	0,362130	29	0,012487		
Falta de ajuste	0,017549	4	0,004387	0,31830	0,863008
Erro puro	0,344581	25	0,013783		
Total	0,931540	31	0,030050		
R²	61,13%				
R² ajustado	58,44%				

* Significativo ao nível de 95% de probabilidade ($p < 0,05$).

Portanto, a equação que representa o modelo estatístico ajustado, obtido para a variável resposta valores experimentais de pH observados para as margarinas M1 a M7, ao 21º dia de armazenamento refrigerado é representada da seguinte maneira,

sendo o número apresentado abaixo dos coeficientes o erro-padrão de cada coeficiente estimado:

$$\hat{y}_{(3)} = 4,84 x_1 + 5,28 x_2 + 5,09 x_3$$

$(\pm 0,05)$ $(\pm 0,04)$ $(\pm 0,05)$

onde $\hat{y}_{(3)}$ representa o valor de pH estimado para as formulações de margarina M1 a M7 aos 21 dias de armazenamento refrigerado a $5 \pm 1^\circ\text{C}$.

O modelo indica que a resposta pH foi dependente apenas dos ingredientes isolados, uma vez que nenhuma interação entre eles foi significativa ($p > 0,05$).

O modelo ajustado para essa variável resposta está representado graficamente, em um diagrama triangular (Figura 18). Os três vértices correspondem às respostas dos fatores estudados (inulina, WPC e CMP). Os pontos sobre os lados do triângulo equilátero representam os resultados das misturas binárias. Na região interna do diagrama, são encontradas as respostas referentes às misturas ternárias.

Figura 18. Diagrama triangular para valores de pH para as formulações de margarina M1 a M7 aos 21 dias de armazenamento refrigerado ($5 \pm 1^\circ\text{C}$), onde x_1 , x_2 e x_3 são os fatores inulina, WPC e CMP, respectivamente.

Analizando o diagrama para a variável resposta pH, pode-se fazer um paralelo com as populações de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 observadas nas margarinas durante o armazenamento refrigerado e o pH observado para esses produtos ao longo do armazenamento (Tabelas 4 e 10).

As formulações que foram adicionadas de inulina (x_I) nas maiores concentrações estudadas (3% e 1,5%) apresentaram valores mais baixos de pH e populações superiores de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12, especialmente ao 21º dia de armazenamento. Observando o diagrama apresentado na Figura 18, pode-se notar que a presença isolada da inulina na proporção de 3% (ponto 1 do diagrama), bem como nas misturas em maior proporção quando comparada aos demais ingredientes (1,5% e 2,25%; pontos 0,5 e 0,75) resulta em menores valores de pH, o que pode estar associado a uma maior multiplicação ou atividade do microrganismo probiótico presente, uma vez que *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 é capaz de utilizar a inulina como fonte de energia, gerando ácidos como um dos subprodutos dessa fermentação (LÓPEZ-MOLINA *et al.*, 2005), que colabora para a diminuição do pH dos produtos.

Observando-se os valores de pH no diagrama para formulações onde o ingrediente WPC (x_2) está presente em maiores concentrações (ponto 1, concentração 3,0%), nota-se valores superiores de pH (>5,2), demonstrando a capacidade tamponante desse ingrediente, devido a presença de fosfatos e proteínas (ANTUNES, *et al.*, 2005), mantendo o pH dos produtos mais elevado, quando comparado à formulação M1.

4.4. Análises para caracterização do produto

4.4.1. Composição em ácidos graxos da matéria-prima e cálculo dos teores de ácidos graxos na porção da margarina desenvolvida

A Tabela 13 apresenta os valores obtidos para a análise do perfil em ácidos graxos, realizada com o óleo de palma e o óleo de canola, bem como da mistura (óleo de palma - 60% + óleo de canola - 40%). Os resultados obtidos estão coerentes com o Codex Alimentarius, bem como com a legislação brasileira vigente (ANVISA, 1999; CODEX ALIMENTARIUS, 2005) para esses óleos.

Para o óleo de palma, o Codex Alimentarius apresenta uma faixa de variação entre 39,3 e 47,5% para o ácido palmítico (16:0) e entre 36,0 e 44,0% para o ácido oléico (18:1) (CODEX ALIMENTARIUS, 2005).

Tabela 13. Composição em ácidos graxos (% em massa) do óleo de palma, óleo de canola e mistura, utilizados na fabricação da margarina.

Ácido Graxo	Amostra*		
	Canola ¹	Palma ²	Mistura ³
12:0	0,00	0,59	0,38
14:0	0,00	1,25	0,78
16:0	5,41	43,68	30,53
16:1	0,30	0,00	0,00
18:0	2,42	4,79	3,76
18:1	61,29	40,33	46,55
18:1 <i>trans</i>	2,60	0,43	1,42
18:2	19,25	8,47	12,89
18:3	6,47	0,27	2,79
20:0	0,63	0,42	0,44
20:1	1,00	0,00	0,45
22:0	0,31	0,00	0,00
22:1	0,27	0,00	0,00

* Análise realizada em triplicata.

¹ Óleo de canola (marca comercial Liza, Cargill, Mairinque, Brasil).

² Óleo de palma (Agropalma, Tailândia, Brasil).

³ Mistura: Óleo de Palma (60%) + Óleo de Canola (40%).

É importante destacar que o óleo de palma utilizado no presente trabalho apresentou baixa concentração de ácidos graxos *trans*, o que reforça a afirmação de que esse óleo não foi submetido a processos tecnológicos que pudessem resultar na formação expressiva de isômeros *trans*. Com relação aos ácidos graxos essenciais do óleo de canola, a legislação brasileira define faixas entre 15,0 e 30,0% para o ácido linoléico e entre 5,0 e 13,0% para o ácido linolênico (ANVISA, 1999), coerentes com os valores observados no presente trabalho. Ainda com relação a esse óleo, a concentração de ácidos graxos *trans* observada estava acima dos valores sugeridos por MARTIN *et al.* (2004) para óleos refinados: faixa entre 1,0 e 1,5%. Os ácidos graxos *trans* de maior ocorrência são os monoinsaturados, mas vários isômeros di-insaturados, ou mesmo, tri-insaturados podem ser formados a partir dos ácidos linoléico e linolênico (SANIBAL & MANCINI, 2004).

No presente trabalho, o teor relativamente alto de *trans* observado no óleo de canola, possivelmente, está ligado ao processo de desodorização ao qual o óleo foi submetido. A formação de ácidos graxos *trans* no óleo refinado ocorre praticamente na desodorização, sendo temperatura elevada e tempo de retenção prolongado os principais fatores. A formação de isômeros *trans* durante a desodorização começa a ser significativa quando realizada entre 220 e 240°C e aumenta quase exponencialmente a partir de 240°C (RIBEIRO *et al.*, 2007; MASUCHI *et al.*, 2008).

A mistura apresentou 35,9% de ácidos graxos saturados. Esse resultado está coerente com o observado por PAVAN (2008) que analisou a composição de margarinas e cremes vegetais comerciais brasileiros (faixa entre 18,0 e 35,8%), cujas bases gordurosas foram obtidas por interesterificação. Além disso, a mistura apresentou 15,68% de ácidos graxos essenciais (12,89% de ácido linoléico e 2,79% de ácido linolênico), o que é interessante sob o ponto de vista nutricional, visto que esses ácidos graxos precisam ser obtidos através da alimentação. Tais ácidos graxos são

elementos estruturais necessários à síntese de lipídios de tecidos e têm papel importante na regulação de vários processos metabólicos, de transporte, excreção e estrutura de membranas celulares. Esses ácidos graxos são necessários para manter sob condições normais as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos (MARTIN *et al.*, 2006). A carência de ácidos graxos essenciais na alimentação dos mamíferos (especialmente do homem) conduz a alterações imunológicas e neurológicas, além de alterações no crescimento, na pele e sérios transtornos comportamentais (TINOCO *et al.*, 2007).

As informações contidas nos rótulos dos alimentos tornam-se cada vez mais importantes e as indústrias de alimentos têm melhorado constantemente a informação da composição dos produtos em seus respectivos rótulos, para satisfazerem e/ou informarem os consumidores, atenderem às exigências de órgãos regulamentadores ou, ainda, para diferenciarem seus produtos de outros que possam apresentar concorrência no mercado. A declaração nos rótulos do total de lipídios, que varia entre os diferentes alimentos, torna-se importante, tanto para fins nutricionais como para fins de adequação às legislações vigentes (EVERS *et al.*, 2000).

O cálculo dos teores de ácidos graxos presentes na porção (10 gramas) da margarina desenvolvida encontra-se na Tabela 14. Conforme citado anteriormente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu que os teores de isômeros *trans* nos alimentos devem ser declarados em seus respectivos rótulos. Segundo a legislação, considera-se como “zero” ou “alimento sem gordura *trans*”, aqueles que contenham uma quantidade $\leq 0,2$ gramas de *trans* por porção (ANVISA, 2003). As margarinas desenvolvidas no presente trabalho se adequaram a essa exigência, uma vez que em uma porção de 10 gramas de produto, observou-se que a quantidade de ácidos graxos *trans* é de 0,08 gramas.

Tabela 14. Teores de ácidos graxos na porção de margarina.

Informação nutricional	
Por unidade de peso médio porção de 10g (1 colher de sopa)	
Gorduras totais	5,73 g
Gorduras saturadas	2,06 g
Gorduras insaturadas	3,60 g
Gorduras <i>trans</i>	0,08 g
Gorduras monoinsaturadas	2,70 g
Gorduras poli-insaturadas	0,90 g
Ácido linoléico	0,74 g
Ácido linolênico	0,16 g

4.4.2. Conteúdo de gordura sólida

O conteúdo de gordura sólida influencia as propriedades físicas, tais como a dureza e espalhabilidade de alimentos com base lipídica, como, por exemplo, margarinas (ADHIKARI *et al.*, 2010).

A Figura 19 apresenta os valores obtidos na análise de conteúdo de gordura sólida, para as amostras de óleo de palma e para a mistura. Além, disso, para fins de comparação, os valores médios fornecidos pela Agropalma, empresa fabricante do óleo de palma, também são exibidos na figura. Considerando-se a faixa de variação da especificação, os valores do conteúdo de gordura sólida estão dentro do esperado.

O óleo de palma apresentou conteúdo de gordura sólida de aproximadamente 54 e 41%, nas temperaturas de 10 e 15°C, respectivamente. Tais resultados foram alterados, quando o óleo de canola foi adicionado para formar a mistura utilizada na fabricação das margarinas: o conteúdo de gordura sólida da mistura foi, aproximadamente, de 25 e 19%, nas respectivas temperaturas citadas anteriormente. Análises com o óleo de canola isolado não foram realizadas, uma vez que este é líquido. Com o aumento da temperatura, os valores do conteúdo de gordura sólida

diminuíram, devido à fusão gradativa das amostras. É importante destacar que a diferença entre o conteúdo de gordura sólida observada para as amostras de óleo de palma e para a mistura, já na temperatura inicial de análise (10°C), representa uma alteração desejável para a produção de margarinas, uma vez que apenas a adição de óleo de palma resultaria em margarinas muito duras.

Figura 19. Valores do conteúdo de gordura sólida obtidos para as amostras de óleo de palma e mistura (60% de óleo de palma + 40% de óleo de canola), em função da temperatura.

4.4.3. Consistência

A consistência é um importante atributo para os produtos alimentícios, principalmente para alimentos que são constituídos por gorduras plásticas. Tais gorduras são compostas por mistura de cristais de gordura sólida e óleo líquido, que formam uma rede tridimensional, conferindo plasticidade aos produtos (deMAN, 1983).

Os valores de consistência do óleo de palma e da mistura (óleo de palma e óleo de canola), calculados como *yield value* em gf/cm^2 , são apresentados na Figura 20. Os

resultados obtidos para a matéria-prima utilizada na fabricação das margarinas mostraram que a mistura apresentou expressiva redução na consistência, quando comparada com o óleo de palma isolado. Isto se deve ao fato que a adição de um óleo líquido provocou a diluição da rede cristalina do óleo de palma. Observou-se, ainda, que a consistência de ambas as amostras diminuiu com o aumento da temperatura, que provoca fusão gradual dos cristais e consequente destruição da rede cristalina, conferindo plasticidade à gordura (deMAN, 1983). O óleo de palma e a mistura não apresentaram consistência detectável pelo texturômetro utilizado, após a análise nas temperaturas de 25 e 15°C, respectivamente.

Figura 20. Consistência do óleo de palma e da mistura (60% de óleo de palma + 40% de óleo de canola) em função da temperatura, após 7 dias de armazenamento refrigerado ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$).

O óleo de palma contém uma mistura de triacilgliceróis com alto e baixo ponto de fusão. Em temperatura ambiente, os de alto ponto de fusão se cristalizam, sendo essa fração sólida denominada estearina. Em contrapartida, triacilgliceróis de baixo ponto de fusão permanecem na forma líquida. Tal fração líquida recebe o nome de oleína (ADHIKARI *et al.*, 2010; ZALIHA *et al.*, 2004).

O estado semi-sólido do óleo de palma à temperatura ambiente, ou em alguns casos com separação de fases, resulta da sua composição peculiar em ácidos graxos: cerca de 50% de ácidos graxos saturados, 40% de monoinsaturados e 10% de poli-insaturados. Tal composição é interessante do ponto de vista tecnológico, uma vez que, proporcionando uma estrutura sólida ao óleo de palma, quando presente na formulação de margarinas e *shortenings*, o mesmo é capaz de manter retidos os glóbulos de água e o óleo líquido, o que possibilita a manutenção da estrutura desses produtos (AINI & MISKANDAR, 2007).

As gorduras e produtos como margarinas podem ser classificadas quanto à espalhabilidade, em função de seu *yield value*, segundo HAIGHTON (1959), conforme apresentado na Tabela 15. De acordo com essa tabela, a margarina pode ser considerada espalhável na faixa compreendida entre 100 e 1000 gf/cm². Entretanto, valores entre 125 e 800 gf/cm² são considerados ideais para esse tipo de produto (GIOIELLI, 1996b; D'AGOSTINI *et al.*, 2001).

Tabela 15. Classificação* da consistência de gorduras, margarinas e *shortenings*, segundo o *yield value*.

<i>Yield value</i> (gf/cm²)	Consistência
<50	muito macia, quase fluida
50-100	muito macia, não espalhável
100-200	macia, já espalhável
200-800	plástica e espalhável
800-1000	dura, satisfatoriamente espalhável
1000-1500	muito dura, limite de espalhabilidade
>1500	muito dura

* Segundo HAIGHTON (1959).

O óleo de palma tornou-se uma escolha apropriada, dentre as matérias-primas existentes, para ser o principal constituinte das formulações de margarinas e

shortenings, sem a necessidade da aplicação do processo de hidrogenação. Quando presente nesses produtos, o óleo de palma pode proporcionar melhora na consistência, textura e estrutura dos produtos (AINI & MISKANDAR, 2007). Entretanto, comparando-se os valores obtidos nas análises de consistência para as margarinas M1 a M7 (Figura 21), aos valores apresentados na tabela acima, todos os produtos mostraram-se muito consistentes em temperaturas mais baixas (5°C–15°C). O mesmo comportamento foi observado para a formulação M8. A inulina, quando inserida em um alimento, pode resultar em alterações em sua textura, pois esse ingrediente, em altas concentrações, mimetiza a gordura. Entretanto, esse ingrediente não influenciou a consistência das margarinas, pois tal efeito não é observado para concentrações baixas. Concentrações de 2 a 7% de inulina podem resultar em textura próxima à de iogurtes (RONKART *et al.*, 2010). No presente trabalho, a maior concentração estudada foi de 3% para M1. Semelhantemente, os demais ingredientes (WPC e CMP) adicionados não interferiram na consistência das margarinas, pois quando analisadas estatisticamente, as formulações não apresentaram diferença significativa entre si ($p>0,05$).

Figura 21. Consistência das margarinas M1 a M7 em função da temperatura, após 7 dias de armazenamento refrigerado (5±1°C). Veja a Tabela 2 para descrição das formulações.

Esta consistência excessiva para esse tipo de produto pode estar associada ao fato da gordura empregada como matéria-prima na fabricação das margarinas ser apenas uma mistura de óleo de canola (40%) e óleo de palma (60%). A mistura apresenta-se como o método mais simples de modificação de óleos e gorduras (DIAN *et al.*, 2006). Outros métodos, como interesterificação, hidrogenação ou a combinação de mais de um processo podem ser empregados para modificar as características naturais dessas matérias-primas (ALLEN, 1998). Entretanto, a hidrogenação parcial não é recomendável atualmente, embora resulte em gorduras desejáveis do ponto de vista tecnológico, porque provoca a formação de ácidos graxos *trans*, que podem chegar a níveis de 50%, dependendo do grau de hidrogenação (PETRAUSKAITE *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 2008). Entretanto, outros processos podem ser utilizados para a obtenção de gorduras plásticas com características adequadas para a fabricação de margarinas. Como exemplo, pode-se citar a interesterificação, um método de modificação de óleos e gorduras que é empregado em escala industrial e promove o rearranjo dos ácidos graxos nos triacilgliceróis (D'AGOSTINI *et al.*, 2001). É importante destacar, no entanto, que tal processo não forma ácidos graxos *trans*. A interesterificação de misturas entre gorduras sólidas e óleos vegetais pode resultar em produtos com ótimas características para uso comercial. O rearranjo ou a randomização dos ácidos graxos nos triacilgliceróis resulta em óleos ou gorduras com diferentes propriedades físicas que permitem a aplicação em margarinas e *shortenings* (GRIMALDI *et al.*, 2001; KARABULUT *et al.*, 2004, RIBEIRO *et al.*, 2007).

Uma vez que as margarinas desenvolvidas no presente trabalho apresentaram-se mais consistentes do que o esperado para esse tipo de produto, foi realizada a reação de interesterificação química da mistura (óleo de palma + óleo de canola), para análise da consistência da mistura interesterificada nas mesmas condições testadas anteriormente. Tal experimento foi realizado, em virtude da necessidade da

apresentação de uma proposta tecnológica para solucionar o problema observado – margarinas muito consistentes em temperaturas de refrigeração. Entretanto, a consistência da mistura interesterificada (MI) apresentou-se menor que a consistência da mistura (M) apenas na temperatura inicial de análise (5°C) (Figura 22).

Figura 22. Consistência da mistura (60% de óleo de palma + 40% de óleo de canola) (M) comparada à consistência da mistura submetida ao processo de interesterificação química (MI) em função da temperatura, após 7 dias de armazenamento refrigerado ($5 \pm 1^\circ\text{C}$).

Contudo, comparando-se os valores obtidos para a mistura interesterificada (MI) a 5°C aos valores apresentados na Tabela 15, MI também se apresentou muito consistente, para ser utilizada como matéria-prima na fabricação de margarinas. As propriedades funcionais das gorduras podem ser relacionadas aos triacilgliceróis que estão presentes na fase gordurosa. Os triessaturados (S_3) e alguns dissaturados (S_2I) são os triacilgliceróis responsáveis pela estrutura do produto. Por outro lado, os triinsaturados (I_3) são importantes para a maciez do produto (HOFFMANN, 1989).

Os resultados apresentados na Tabela 16 revelam que a somatória da concentração de triacilgliceróis triessaturados (S_3) e dissaturados-monossaturados (S_2I)

aumentou de 16,93% para 29,39%, após a reação de interesterificação química da mistura de óleo de palma e óleo de canola.

Tabela 16. Composição em triacilgliceróis da mistura (60% de óleo de palma + 40% de óleo de canola) antes e após a reação de interesterificação química.

	Triacilgliceróis (%)			
	I ₃	I ₂ S	S ₂ I	S ₃
M*	45,37	37,83	11,21	5,72
MI**	26,33	44,23	24,77	4,62

I₃ – triinsaturados (III); I₂S – monossaturados-diinsaturados (SII/IIS + ISI); S₂I – dissaturados-monoinsaturados (SSI/ISS + SIS); S₃ – trissaturados (SSS).

* Mistura (60% de óleo de palma + 40% de óleo de canola).

** Mistura (60% de óleo de palma + 40% de óleo de canola) interesterificada quimicamente.

Tal resultado explica o aumento na consistência da mistura. Associado a esse fato, a diminuição de I₃ também contribuiu para o aumento na consistência da mistura interesterificada, uma vez que esses triacilgliceróis são líquidos e conferem maciez à mistura. Por outro lado, o aumento das proporções de S₃ e S₂I permitiu que a mistura apresentasse consistência “plástica e espalhável” (*yield value* entre 200 e 800 gf/cm²) na temperatura de 20°C, resultado interessante, quando se considera o produto final em questão (margarina), uma vez que a mistura não submetida ao processo de interesterificação química não apresentou consistência mensurável em temperaturas acima de 15°C.

Gorduras láuricas, como o óleo de palmiste, conferem consistência macia a produtos lipídicos em temperaturas mais altas (CARR & HOGG, 2005). Uma vez que a reação de interesterificação química não resultou em mistura com boa consistência para aplicação na fabricação de margarinas, a adição de óleo de palmiste (extraído da semente do fruto da palmeira e contém grande quantidade de ácido láurico) apresenta-

se como uma possível solução para o ajuste da consistência da mistura interesterificada, devido à ocorrência do efeito eutético, que provavelmente resultará no amolecimento da mistura.

4.4.4. Calorimetria diferencial de varredura – DSC

Nas últimas duas décadas, a calorimetria diferencial de varredura (DSC) tem sido muito utilizada para a caracterização termodinâmica e identificação de óleos e gorduras empregados na indústria alimentícia (DYSZEL & SARAH, 1992; DOLLIMORE, 1996). O aspecto mais importante das propriedades físicas de óleos e gorduras está relacionado às mudanças que ocorrem entre as fases sólido-líquido e líquido-sólido, definidas como fusão e cristalização, respectivamente. A cristalização resulta em contração no volume de óleo líquido (reação exotérmica), enquanto que a fusão resulta em expansão desse volume (reação endotérmica) (TAN & CHE MAN, 2002).

A investigação sobre o comportamento térmico de um sistema emulsionado é essencial para entender as mudanças que ocorrem, quando esse sistema é submetido a um ciclo de alterações em sua temperatura durante seu manuseio e armazenamento. Basicamente, o DSC pode ser usado para estudar as alterações de energia e o calor liberado (ou absorvido) durante a cristalização e/ou fusão, fenômenos que estão associados às mudanças ocorridas em produtos à base de emulsões (HAYATI *et al.*, 2009).

As Tabelas 17 a 20 apresentam os resultados das análises de calorimetria diferencial de varredura (cristalização e fusão) para as seguintes amostras: óleo de palma, óleo de canola, mistura (60% palma + 40% canola), mistura interesterificada, água e margarinas (M1 a M7). Os resultados apresentados são relacionados quanto ao início (*onset*) e ao final (*endset*) da cristalização e fusão dessas amostras, sendo

também apresentados os valores observados para a temperatura máxima dos principais picos observados, entalpia de fusão (ΔH , expresso em J/g, energia total necessária para a fusão do pico) e entalpia de cristalização (ΔH , expresso em J/g, energia total liberada na cristalização do pico). Os termogramas com as curvas de cristalização e fusão para as mesmas amostras citadas anteriormente estão apresentados nas Figuras 23 a 26.

A cristalização é um evento físico exotérmico, comumente utilizado para caracterizar o comportamento térmico de óleos e gorduras (JAFARI *et al.*, 2009). Além disso, o processo de cristalização é um fenômeno importante, que influencia o processamento de alimentos de base lipídica (FANG *et al.*, 2010).

Para a interpretação dos termogramas de cristalização obtidos para as amostras analisadas no presente trabalho foram considerados os principais picos observados (Figuras 23 e 24). As Tabelas 17 e 18 apresentam os resultados das análises de calorimetria diferencial de varredura para cristalização das amostras analisadas.

Figura 23. Termograma com as curvas de cristalização (10°C/min) do óleo de canola, óleo de palma, mistura (60% óleo de palma + 40% óleo de canola), mistura interesterificada e margarina (formulação M1).

Figura 24. Termograma com as curvas de cristalização (10°C/min) da margarina (formulação M1) e da água analisada isoladamente.

Tabela 17. Comparação dos dados de cristalização (média $\pm$ desvio padrão) para o óleo de palma, óleo de canola, mistura (60% palma + 40% canola), mistura interesterificada e água, obtidos por calorimetria diferencial de varredura.

Amostra		Cristalização*			
		Picos**			
		1	2	3	4
Óleo de palma	Onset (°C)	20,98 $\pm$ 0,31	5,62 $\pm$ 0,11	-36,99 $\pm$ 1,05	-
	Endset (°C)	17,00 $\pm$ 0,38	-10,80 $\pm$ 1,37	-46,00 $\pm$ 0,42	-
	Pico (°C)	19,35 $\pm$ 0,34	2,47 $\pm$ 0,54	-39,88 $\pm$ 0,29	-
	Delta H (J/g)	-7,61 $\pm$ 2,59	-26,36 $\pm$ 11,14	-1,67 $\pm$ 1,12	-
Óleo de canola	Onset (°C)	-18,90 $\pm$ 0,03	-46,25 $\pm$ 0,15	-	-
	Endset (°C)	-25,13 $\pm$ 1,24	-50,41 $\pm$ 0,03	-	-
	Pico (°C)	-21,24 $\pm$ 0,12	-48,31 $\pm$ 0,10	-	-
	Delta H (J/g)	-0,70 $\pm$ 0,04	-25,48 $\pm$ 0,05	-	-
Mistura	Onset (°C)	16,87 $\pm$ 0,29	0,44 $\pm$ 0,01	-39,18 $\pm$ 0,49	-
	Endset (°C)	13,78 $\pm$ 0,28	-17,80 $\pm$ 0,83	-47,70 $\pm$ 0,94	-
	Pico (°C)	15,77 $\pm$ 0,18	-2,40 $\pm$ 0,19	-44,70 $\pm$ 0,98	-
	Delta H (J/g)	-4,14 $\pm$ 0,15	-13,21 $\pm$ 1,45	-12,09 $\pm$ 0,51	-
Mistura I.***	Onset (°C)	17,52 $\pm$ 1,72	3,10 $\pm$ 0,41	-34,59 $\pm$ 0,87	-
	Endset (°C)	10,63 $\pm$ 1,42	-17,42 $\pm$ 0,54	-46,07 $\pm$ 0,94	-
	Pico (°C)	14,08 $\pm$ 0,46	0,24 $\pm$ 0,16	-41,27 $\pm$ 0,65	-
	Delta H (J/g)	-5,30 $\pm$ 2,10	-15,01 $\pm$ 8,12	-17,50 $\pm$ 12,93	-
Água****	Onset (°C)	-17,49	-	-	-
	Endset (°C)	-17,80	-	-	-
	Pico (°C)	-15,36	-	-	-
	Delta H (J/g)	-210,18	-	-	-

- Pico não detectado.

* Amostras resfriadas a velocidade de 10°C/min.

** Picos principais observados nos termogramas.

*** Mistura Interesterificada quimicamente.

**** Amostra sem repetição.

Tabela 18. Comparação dos dados de cristalização (média $\pm$ desvio padrão) das margarinas M1 a M7, obtidos por calorimetria diferencial de varredura. Veja a Tabela 2 para descrição das formulações.

		Cristalização*			
		Picos**			
Amostra		1	2	3	4
M1	Onset (°C)	26,83 $\pm$ 0,17	0,84 $\pm$ 0,16	-25,14 $\pm$ 0,67	-40,83 $\pm$ 1,14
	Endset (°C)	21,26 $\pm$ 0,43	-24,16 $\pm$ 1,46	-26,84 $\pm$ 0,66	-51,28 $\pm$ 1,73
	Pico (°C)	24,86 $\pm$ 0,17	-3,95 $\pm$ 0,06	-24,63 $\pm$ 0,96	-47,08 $\pm$ 1,51
	Delta H (J/g)	-6,38 $\pm$ 0,54	-25,97 $\pm$ 3,51	-65,52 $\pm$ 21,98	-38,07 $\pm$ 19,93
M2	Onset (°C)	29,11 $\pm$ 0,09	0,97 $\pm$ 0,08	-21,54 $\pm$ 1,77	-39,24 $\pm$ 0,62
	Endset (°C)	26,23 $\pm$ 0,25	-15,98 $\pm$ 0,40	-22,91 $\pm$ 1,99	-46,04 $\pm$ 1,11
	Pico (°C)	28,04 $\pm$ 0,08	-2,15 $\pm$ 0,33	-19,77 $\pm$ 2,25	-43,76 $\pm$ 0,55
	Delta H (J/g)	-1,72 $\pm$ 1,27	-10,85 $\pm$ 0,57	-69,90 $\pm$ 15,05	-23,93 $\pm$ 11,99
M3	Onset (°C)	28,34 $\pm$ 0,21	0,95 $\pm$ 0,08	-19,71 $\pm$ 3,47	-35,08 $\pm$ 1,00
	Endset (°C)	24,09 $\pm$ 0,13	-17,65 $\pm$ 5,93	-20,45 $\pm$ 3,41	-48,10 $\pm$ 0,66
	Pico (°C)	26,47 $\pm$ 0,00	-2,06 $\pm$ 0,65	-18,77 $\pm$ 3,46	-41,05 $\pm$ 4,57
	Delta H (J/g)	-2,09 $\pm$ 0,07	-12,63 $\pm$ 4,81	-68,17 $\pm$ 5,55	-35,54 $\pm$ 6,95
M4	Onset (°C)	27,43 $\pm$ 0,08	1,12 $\pm$ 0,08	-23,33 $\pm$ 0,09	-33,94 $\pm$ 2,96
	Endset (°C)	23,60 $\pm$ 0,03	-13 $\pm$ 10,87	-25,16 $\pm$ 1,34	-46,71 $\pm$ 1,12
	Pico (°C)	25,83 $\pm$ 0,11	-2,48 $\pm$ 0,89	-22,19 $\pm$ 0,12	-44,40 $\pm$ 0,98
	Delta H (J/g)	-1,80 $\pm$ 0,27	-20,81 $\pm$ 5,88	-59,06 $\pm$ 12,41	-31,53 $\pm$ 6,16
M5	Onset (°C)	29,04 $\pm$ 0,39	1,12 $\pm$ 0,23	-22,59 $\pm$ 2,56	-35,42 $\pm$ 1,34
	Endset (°C)	25,59 $\pm$ 1,48	-17,03 $\pm$ 3,17	-22,97 $\pm$ 2,26	-48,19 $\pm$ 1,61
	Pico (°C)	27,75 $\pm$ 0,83	-2,28 $\pm$ 0,73	-21,66 $\pm$ 2,29	-43,27 $\pm$ 0,86
	Delta H (J/g)	-1,04 $\pm$ 1,08	-15,46 $\pm$ 6,69	-52,55 $\pm$ 6,09	-36,69 $\pm$ 9,66
M6	Onset (°C)	27,19 $\pm$ 0,85	0,75 $\pm$ 0,04	-20,37 $\pm$ 3,21	-37,52 $\pm$ 2,60
	Endset (°C)	23,35 $\pm$ 1,64	-13,88 $\pm$ 0,37	-20,88 $\pm$ 3,07	-48,57 $\pm$ 2,47
	Pico (°C)	25,55 $\pm$ 1,31	-2,05 $\pm$ 0,06	-19,07 $\pm$ 3,53	-44,47 $\pm$ 1,17
	Delta H (J/g)	-0,60 $\pm$ 0,77	-7,92 $\pm$ 0,24	-60,59 $\pm$ 23,75	-30,47 $\pm$ 16,87
M7	Onset (°C)	28,09 $\pm$ 2,60	0,73 $\pm$ 0,16	-22 $\pm$ 0,66	-36,68 $\pm$ 1,30
	Endset (°C)	24,47 $\pm$ 0,09	-13,69 $\pm$ 1,52	-22,73 $\pm$ 0,33	-48,41 $\pm$ 1,18
	Pico (°C)	26,56 $\pm$ 0,16	-2,15 $\pm$ 0,49	-20,51 $\pm$ 1,14	-44,14 $\pm$ 0,30
	Delta H (J/g)	-1,16 $\pm$ 0,36	-9,34 $\pm$ 1,91	-62,78 $\pm$ 1,72	-30,75 $\pm$ 12,02

* Amostras resfriadas a velocidade de 10°C/min.

** Picos principais observados nos termogramas.

Para a amostra de óleo de palma, foram observados três picos, porém, dois deles foram considerados como principais, uma vez que foram mais intensos e caracterizados por maiores valores de Delta H. Um deles ocorreu em faixa de temperatura de 21 a 17°C e o outro em faixa de temperatura de 6 a -11°C. Tais picos exotérmicos referem-se à cristalização das frações estearina (mais saturada) e oleína (mais insaturada), respectivamente, presentes no óleo de palma. Resultados semelhantes foram observados por TAN & CHE MAN (2002), que utilizaram DSC para analisar o perfil de cristalização de óleo de palma.

O óleo de canola, por ser líquido à temperatura ambiente e altamente insaturado, apresentou o principal pico de cristalização a -48°C.

O perfil de cristalização da mistura apresentou alterações, quando comparado ao do óleo de palma. Tal efeito ocorreu devido à adição do óleo de canola, que provoca diluição da rede cristalina do óleo de palma. Assim, os principais picos de cristalização da mistura foram deslocados para temperaturas mais baixas e com menores valores de Delta H do que os observados para a palma (Tabelas 17 e 18).

As curvas de cristalização da mistura utilizada para formulação das margarinas apresentaram três picos principais, que ocorreram às temperaturas médias de 16, -2 e -45°C (1º, 2º e 3º picos, respectivamente). Para as margarinas foram observados quatro picos principais. Tais picos exotérmicos ocorreram às temperaturas médias de 26°C (1º pico), -2°C (2º pico), -21°C (3º pico) e -44°C (4º pico). O pico de cristalização observado à temperatura média de -21°C não foi detectado nas amostras de óleo de palma, óleo de canola e mistura, indicando que tal pico refere-se à presença da água nas margarinas, constituinte da fase aquosa dos produtos. Tal afirmação pode ser confirmada com a análise da Figura 24, na qual a curva de cristalização da margarina, quando comparada à curva de cristalização da água pura, revela um pico semelhante, referente à cristalização da água do produto. O deslocamento do pico para temperatura

mais baixa na margarina é decorrente da presença de sólidos dissolvidos na fase aquosa da margarina.

É interessante observar que o pico de cristalização da água esteve fora da faixa definida pelas temperaturas *onset* e *endset*. Contudo, esta aparente anomalia pode ser explicada pelo alto valor de Delta H de cristalização da água, que seria responsável pela elevação da temperatura do sistema (panela de alumínio + água), mesmo estando o sistema sujeito ao resfriamento à velocidade de 10°C/min. Este mesmo fenômeno de aumento de temperatura durante o resfriamento ocorre na fabricação de margarinas, quando o calor de cristalização da gordura provoca o aumento da temperatura da margarina no trocador de calor de superfície raspada (GIOIELLI, 1996a).

A análise de DSC é uma das poucas técnicas que pode distinguir a “água livre” (glóbulos de água) presente em uma emulsão. Quando uma emulsão é resfriada durante a análise de DSC para o estudo de sua cristalização, a fase aquosa é revelada por um pronunciado pico exotérmico no termograma, ocorrendo em temperatura próxima de 0°C. No presente trabalho, o pico exotérmico que indica a cristalização da água nas margarinas ocorreu na temperatura média de -20,7°C. Quando a água foi analisada isoladamente, a temperatura de cristalização observada foi de -15,36°C. Quando presente em emulsões, a água pode sofrer um sub-resfriamento, o que leva à cristalização em temperaturas mais baixas, dependendo do tamanho dos glóbulos de água na emulsão (PAL, 1994).

Semelhantemente ao observado por ADHIKARI *et al.* (2010), as temperaturas de cristalização observadas nos termogramas da mistura interesterificada foram diferentes daquelas observadas para a mistura não interesterificada, evidenciando a ocorrência de modificações decorrentes do rearranjo ao acaso.

Para a interpretação dos termogramas de fusão obtidos para as amostras analisadas no presente trabalho, foram considerados os principais picos observados (Figuras 25 e 26).

Figura 25. Termograma com as curvas de fusão (5°C/min) do óleo de canola, óleo de palma, mistura (60% óleo de palma + 40% óleo de canola), mistura interesterificada e margarina (formulação M1).

Figura 26. Termograma com as curvas de fusão (5°C/min) da margarina e da água analisada isoladamente.

O principal pico observado para o óleo de canola durante a fusão ocorreu à temperatura aproximada de -18°C (Tabela 19). Provavelmente, esse pico representa a fusão dos triacilgliceróis triinsaturados. Resultados semelhantes foram observados por JAFARI *et al.* (2009), que observaram a fusão total do óleo de canola à temperatura de -16°C .

Dentre os dois picos principais observados na análise de fusão das margarinas M1 a M7, o pico mais pronunciado ocorreu próximo a temperatura de 0°C , que caracteriza a presença de água na emulsão (Tabela 20). Segundo KAISERSBERGER (1989), o comportamento de fusão de gorduras emulsionadas é caracterizado pela fusão do conteúdo de água presente, bem como por menores picos de fusão para base gordurosa, normalmente constituída por mistura de óleos e gorduras.

Tabela 19. Comparação dos dados de fusão (média $\pm$ desvio padrão) para óleo de palma, óleo de canola, mistura (60% palma + 40% canola), mistura interesterificada e água, obtidos por calorimetria diferencial de varredura.

Amostra		Fusão*			
		Picos**			
		1	2	3	4
Óleo de palma	Onset (°C)	-9,82 $\pm$ 0,05	3,04 $\pm$ 0,16	4,63 $\pm$ 0,04	14,51 $\pm$ 0,11
	Endset (°C)	2,62 $\pm$ 0,11	4,54 $\pm$ 0,14	7,84 $\pm$ 0,13	41,11 $\pm$ 0,46
	Pico (°C)	0,35 $\pm$ 0,01	3,69 $\pm$ 0,11	6,39 $\pm$ 0,26	21,48 $\pm$ 0,16
	Delta H (J/g)	5,58 $\pm$ 0,74	0,32 $\pm$ 0,03	0,70 $\pm$ 0,37	24,96 $\pm$ 4,38
Óleo de canola	Onset (°C)	-26,76 $\pm$ 0,08	-	-	-
	Endset (°C)	-9,02 $\pm$ 0,02	-	-	-
	Pico (°C)	-17,85 $\pm$ 0,22	-	-	-
	Delta H (J/g)	26,20 $\pm$ 14,65	-	-	-
Mistura	Onset (°C)	-28,72 $\pm$ 0,16	-6,64 $\pm$ 0,09	9,49 $\pm$ 0,08	-
	Endset (°C)	-24,81 $\pm$ 0,13	3,90 $\pm$ 0,08	39,78 $\pm$ 0,12	-
	Pico (°C)	-26,37 $\pm$ 0,13	-0,22 $\pm$ 0,09	14,17 $\pm$ 0,13	-
	Delta H (J/g)	0,19 $\pm$ 0,18	67,95 $\pm$ 0,34	51,54 $\pm$ 1,34	-
Mistura I.***	Onset (°C)	-20,51 $\pm$ 1,24	-4,20 $\pm$ 0,67	8,11 $\pm$ 0,47	-
	Endset (°C)	-10,90 $\pm$ 0,88	3,89 $\pm$ 0,68	37,17 $\pm$ 0,78	-
	Pico (°C)	-16,38 $\pm$ 2,29	-0,46 $\pm$ 0,69	13,06 $\pm$ 0,32	-
	Delta H (J/g)	3,47 $\pm$ 2,70	8,91 $\pm$ 4,79	19,31 $\pm$ 8,24	-
Água****	Onset (°C)	-0,15	-	-	-
	Endset (°C)	3,76	-	-	-
	Pico (°C)	2,19	-	-	-
	Delta H (J/g)	240,33	-	-	-

- Pico não detectado.

* Amostras aquecidas a velocidade de 5°C/min.

** Picos principais observados nos termogramas.

*** Mistura Interesterificada quimicamente.

**** Amostra sem repetição.

Tabela 20. Comparação dos dados de fusão (média $\pm$ desvio padrão) das margarinas M1 a M7, obtidos por calorimetria diferencial de varredura. Veja a Tabela 2 para descrição das formulações.

Amostra		Fusão*	
		Picos**	
		1	2
M1	Onset (°C)	-6,92 $\pm$ 1,28	10,25 $\pm$ 0,16
	Endset (°C)	1,06 $\pm$ 1,34	44,85 $\pm$ 0,18
	Pico (°C)	-1,17 $\pm$ 1,05	24,20 $\pm$ 0,04
	Delta H (J/g)	162,29 $\pm$ 53,63	43,83 $\pm$ 4,27
M2	Onset (°C)	-5,86 $\pm$ 0,29	8,42 $\pm$ 0,11
	Endset (°C)	-0,97 $\pm$ 0,58	40,06 $\pm$ 4,42
	Pico (°C)	-1,98 $\pm$ 0,46	12,93 $\pm$ 0,18
	Delta H (J/g)	113,75 $\pm$ 10,22	24,22 $\pm$ 0,76
M3	Onset (°C)	-6,10 $\pm$ 0,06	8,62 $\pm$ 0,08
	Endset (°C)	-0,26 $\pm$ 0,52	40,23 $\pm$ 4,56
	Pico (°C)	-2,18 $\pm$ 0,17	13,07 $\pm$ 0,46
	Delta H (J/g)	128,56 $\pm$ 7,05	24,96 $\pm$ 5,93
M4	Onset (°C)	-7,18 $\pm$ 0,73	8,49 $\pm$ 0,08
	Endset (°C)	-1,72 $\pm$ 0,74	42,68 $\pm$ 0,32
	Pico (°C)	-3,09 $\pm$ 0,46	18,86 $\pm$ 5,68
	Delta H (J/g)	127,35 $\pm$ 25,25	24,76 $\pm$ 1,87
M5	Onset (°C)	-7,32 $\pm$ 0,51	8,51 $\pm$ 0,07
	Endset (°C)	-1,59 $\pm$ 0,07	33,94 $\pm$ 7,56
	Pico (°C)	-3,10 $\pm$ 0,25	16,27 $\pm$ 7,08
	Delta H (J/g)	114,09 $\pm$ 10,75	16,98 $\pm$ 7,25
M6	Onset (°C)	-5,79 $\pm$ 0,12	9,28 $\pm$ 0,08
	Endset (°C)	-0,89 $\pm$ 0,06	42,97 $\pm$ 0,82
	Pico (°C)	-2,05 $\pm$ 0,07	12,34 $\pm$ 0,16
	Delta H (J/g)	126,34 $\pm$ 0,49	14,09 $\pm$ 0,02
M7	Onset (°C)	-6,73 $\pm$ 0,70	8,42 $\pm$ 0,07
	Endset (°C)	-1,30 $\pm$ 0,20	42,70 $\pm$ 0,15
	Pico (°C)	-2,49 $\pm$ 0,21	22,48 $\pm$ 0,51
	Delta H (J/g)	100,31 $\pm$ 32,57	25,29 $\pm$ 2,47

* Amostras aquecidas a velocidade de 5°C/min.

** Picos principais observados nos termogramas.

4.5. Análise sensorial

A análise sensorial das margarinas M1 a M7 foi realizada em dois períodos de armazenamento, conforme descrito no item 3.6. Os períodos 0 (dia da produção das margarinas) e de 1 dia após a produção foram excluídos da análise sensorial, uma vez que, para que ocorresse uma total cristalização da fase lipídica dos produtos, os mesmos permaneceram armazenados sob refrigeração a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 7 dias. Dessa forma, estabeleceu-se os períodos de 7 e 14 dias de armazenamento para avaliação sensorial das margarinas. Cada formulação (M1 a M7) foi avaliada nesses dois períodos de armazenamento por 30 participantes não treinados, após serem instruídos sobre a análise sensorial, conforme descrito no item 3.6.

Dentre os participantes, 59,1% eram mulheres, com idade média de 27 anos e 40,9% eram homens, com idade média de 28 anos. As médias das notas apresentadas pelos provadores são apresentadas na Tabela 21.

Tabela 21. Média das notas (média $\pm$ desvio padrão)* obtidas na análise sensorial realizada após 7 e 14 dias de armazenamento refrigerado ($5\pm 1^\circ\text{C}$) das margarinas M1 a M7. Veja a Tabela 2 para descrição das formulações.

Formulação	Período de armazenamento (Dias)	
	7	14
M1	7,40 $\pm$ 1,90 ^{Aa}	7,73 $\pm$ 1,31 ^{Aa}
M2	7,60 $\pm$ 1,45 ^{Aa}	7,07 $\pm$ 1,64 ^{Aa}
M3	6,93 $\pm$ 2,07 ^{Aa}	7,43 $\pm$ 1,89 ^{Aa}
M4	7,60 $\pm$ 0,81 ^{Aa}	7,29 $\pm$ 1,72 ^{Aa}
M5	7,47 $\pm$ 1,31 ^{Aa}	7,37 $\pm$ 1,13 ^{Aa}
M6	7,53 $\pm$ 1,87 ^{Aa}	6,93 $\pm$ 2,08 ^{Aa}
M7	7,83 $\pm$ 1,53 ^{Aa}	7,73 $\pm$ 1,70 ^{Aa}

* Média das notas apresentadas por 30 provadores para cada margarina em cada período de armazenamento.

^A: letras maiúsculas iguais sobrescritas na mesma coluna indicam que não houve diferenças significativas ($p>0,05$) entre as diferentes formulações de margarina em cada período de armazenamento (7 e 14 dias).

^a: letras minúsculas iguais sobrescritas na mesma linha indicam que não houve diferenças significativas ($p>0,05$) para uma mesma formulação após 7 e 14 dias de armazenamento refrigerado, quando avaliadas sensorialmente.

As formulações não apresentaram comportamento estatisticamente distinto, quando analisadas sensorialmente nos dois períodos, e uma mesma formulação não apresentou diferenças significativas entre o 7º e o 14º dia de armazenamento ($p>0,05$). Apesar disso, as médias gerais das notas atribuídas pelos provadores às formulações foram satisfórias para os dois períodos de armazenamento analisados, uma vez que as médias das notas variaram entre 6,93 a 7,83. Na escala utilizada para avaliação das amostras corresponde a opiniões variando entre “gostei ligeiramente” – nota 6 e “gostei regularmente” – nota 7 (**ANEXO II**). É importante destacar, que notas acima dessas também foram atribuídas pelos provadores; mais de 83% das notas atribuídas estavam entre 6 e 9. Esse resultado corresponde, na escala hedônica, às opiniões variando entre “gostei regularmente” e “gostei muitíssimo”. Para a formulação M5,

100% das notas atribuídas ao 7º dia de armazenamento estavam nessa faixa (Figuras 27 e 28).

Figura 27. Frequência das notas obtidas na análise sensorial realizada após 7 dias de armazenamento refrigerado ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$) das margarinas M1 a M7. Veja a Tabela 2 para descrição das formulações.

Figura 28. Frequência das notas obtidas na análise sensorial realizada após 14 dias de armazenamento refrigerado ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$) das margarinas M1 a M7. Veja a Tabela 2 para descrição das formulações.

de armazenamento refrigerado ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$) das margarinas M1 a M7. Veja a Tabela 2 para descrição das formulações.

As formulações adicionadas de WPC e CMP, combinados ou não com inulina, receberam a maior percentagem de notas acima de 5. A presença desses ingredientes colaborou com o aroma e sabor dos produtos, uma vez que alguns provadores declararam perceber aroma e/ou sabor de leite, principalmente para a formulação M2 (adicionada somente de WPC). Contudo, uma pequena percentagem dos provadores fez comentários negativos sobre o sabor das formulações contendo esses ingredientes. Tais provadores registraram na ficha de avaliação sensorial opiniões sobre o produto como “*sabor residual amargo no fim*” (formulações M3, M4, M5 e M6), “*sabor amargo*” (M2), ou ainda “*sabor residual diferente*” (M7). Uma razão que pode estar associada a esses comentários é a possível ocorrência da metabolização dos ingredientes WPC e CMP pelo microrganismo *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12. A quebra de proteínas pode contribuir para o sabor ou alterá-lo em alimentos, uma vez que resulta no aumento nos peptídeos e aminoácidos livres, formados durante o processo de degradação. Alguns desses peptídeos podem ser responsáveis pelo amargor em alimentos (SOUSA *et al.*, 2001; HELLER *et al.*, 2003; PRIETO *et al.*, 2004). A formulação contendo somente inulina (M1), embora tenha apresentado notas similares às demais, não apresentou sabor residual detectável pelos provadores.

Apesar dos comentários, as formulações acima citadas, juntamente com a M1, apresentaram boa aceitação por parte dos provadores, ao contrário do observado por CHRISTOPHER *et al.* (2006), em estudo com iogurte probiótico adicionado de WPC. Os pesquisadores avaliaram sensorialmente um iogurte adicionado de *Bifidobacterium bifidum* suplementado com WPC em duas concentrações: 0,5 e 1% e concluíram que a aceitabilidade global do iogurte foi prejudicada devido à adição de WPC, quando a concentração de 1% foi empregada.

5. CONCLUSÕES

✓ O desenvolvimento de uma margarina de mesa probiótica e simbiótica (adicionada do ingrediente prebiótico inulina e do microrganismo probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12) com 60% de lipídios foi possível, empregando-se uma formulação adequada para esse tipo de produto.

✓ As formulações M1 a M7, exceto a formulação M2 após o 21º dia de armazenamento, apresentaram populações muito satisfatórias de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 para um alimento probiótico, de acordo com a legislação brasileira vigente. Por outro lado, a formulação controle não pôde ser caracterizada como probiótica, uma vez que as populações de Bb-12 observadas estavam abaixo de 6,00 log UFC/g ao 1º dia de armazenamento refrigerado.

✓ A suplementação da fase aquosa das margarinas probióticas com ingredientes que possam proteger o microrganismo durante os processos tecnológicos empregados na produção do alimento, bem como durante o seu armazenamento refrigerado mostrou-se fundamental para a sobrevivência do microrganismo probiótico nessa matriz alimentícia.

✓ O microrganismo probiótico *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 apresentou boa viabilidade nos ensaios de resistência ao trato gastrointestinal humano simulados *in vitro*. A simulação da passagem do microrganismo probiótico pela fase gástrica resultou nas maiores reduções na viabilidade de Bb-12. Porém, observou-se recuperação das células viáveis, quando o microrganismo foi submetido à ação da fase entérica simulada.

✓ A adição de inulina auxiliou a manutenção da viabilidade do microrganismo no produto e durante os ensaios de resistência ao trato gastrointestinal simulados *in vitro*. Tal resultado não foi observado quando o ingrediente WPC foi adicionado isoladamente à formulação da margarina (formulação M2).

✓ Algumas formulações apresentaram aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) nas populações de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 observadas entre o término da fase gástrica (2h) e a segunda etapa entérica (6h), demonstrando a importância da matriz das margarinas na proteção do probiótico durante o processo digestivo simulado *in vitro*.

✓ As formulações M1 a M7 apresentaram boa aceitação sensorial, sem diferenças estatísticas significativas entre o 7º e 14º dia de armazenamento ($p > 0,05$), com notas médias variando entre 6,93 a 7,83, que na escala hedônica corresponde a opiniões variando entre “gostei ligeiramente” (nota 6) e “gostei regularmente” (nota 7).

✓ A utilização da mistura do óleo de palma com óleo de canola favoreceu nutricionalmente a formulação, fornecendo produtos contendo ácidos graxos essenciais em sua composição e ausência de ácidos graxos *trans*.

✓ As margarinas probióticas e simbióticas desenvolvidas apresentaram-se muito consistentes em temperaturas de refrigeração. A realização da reação de interesterificação química da mistura de óleo de palma e óleo de canola não favoreceu a diminuição da consistência da mistura no presente trabalho, uma vez que houve aumento na proporção da somatória de triacilgliceróis triessaturados e dissaturados-monossaturados, após o rearranjo ao acaso. A utilização dessa reação, juntamente com outras misturas lipídicas, pode resultar em matéria-prima ideal para ser utilizada na produção de margarinas.

✓ As curvas de cristalização da mistura utilizada para formulação das margarinas apresentaram três picos principais. Entretanto, para as margarinas foram observados quatro picos principais, sendo o pico de cristalização observado à temperatura média de -21°C referente à presença da água. O pico de cristalização relativo à água presente nas margarinas foi deslocado para uma temperatura mais baixa, quando comparado à água pura, em decorrência da presença de sólidos dissolvidos na fase aquosa da margarina.

✓ Os resultados obtidos revelaram que a margarina apresenta-se como uma matriz alimentar adequada para a administração do microrganismo probiótico *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12, particularmente na presença de inulina. Para a obtenção de boa viabilidade do probiótico no produto e melhores perspectivas de sobrevivência no trato gastrointestinal, recomenda-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. Caso a melhoria da consistência do produto desenvolvido não seja conseguida com ajustes no processo de cristalização nos trocadores de calor em escala industrial, a realização de estudos para esse fim seria conveniente, no sentido de melhorar a sua aceitabilidade sensorial e, assim, aprimorar o seu potencial para uma futura produção industrial e comercialização.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ADHIKARI, P.; ZHU, X.M.; GAUTAM, A.; SHIN, J.A.; HUA, J.N.; LEE, J.H.; AKOH, C.C.; LEE, K.T. Scaled-up production of zero-*trans* margarine fat using pine nut oil and palm stearin. **Food Chemistry**, v.119, p.1332-1338, 2010.

AGROPALMA. Disponível em: www.agropalma.com.br. Acesso em: 11 de jul. 2008.

¹ As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Comissões de assessoramento tecnocientífico em alimentos funcionais e novos alimentos. Aprova alimentos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Lista das alegações aprovadas de 11 de janeiro de 2005. Atualizada em julho de 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 13 nov. 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Aprova o Regulamento Técnico para Óleos vegetais, Gorduras vegetais e Creme vegetal. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/>. Acesso em: 23 ago. 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais. Resolução RDC nº 482, de 23 de setembro de 1999. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/482_99.htm. Acesso em: 11 ago. 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/>. Acesso em: 01 ago. 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos. Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144>. Acesso em: 30 maio 2006.

AHMAD, C.; NATASCHA, C.; HAIQIN, C.; JIANXIN, Z.; JIAN, T.; HAO, Z.; WEI, C. Bifidin I – A new bacteriocin produced by *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602: Purification and partial amino acid sequence. **Food Control**, v.21, p.746-753, 2010.

AINI, I.N.; MISKANDAR, M.S. Utilization of palm oil and palm products in shortenings and margarines. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.109, p.422-432, 2007.

AKALIN, A.S.; GÖNÇ, S.; ÜNAL, G.; FENDERYA, S. Effects of fructooligosaccharide and whey protein concentrate on the viability of starter culture in reduced-fat probiotic yogurt during storage. **Journal of Food Science**, v.72, n.7, p.M222-M227, 2007.

AKIN, M.B.; AKIN, M.S.; KIRMAC, Z. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. **Food Chemistry**, v.104, p.93-99, 2007.

ALAMED, J.; McCLEMENTS, J.; DECKER, E.A. Influence of heat processing and calcium ions on the ability of EDTA to inhibit lipid oxidation in oil-in-water emulsions containing omega-3 fatty acids. **Food Chemistry**, v.95, p.585-590, 2006.

ALANDER, M.; MÄTTÖ, J.; KNEIFEL, W.; JOHANSSON, M.; KÖGLER, B.; CRITTENDEN, R.; MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. Effect of galacto-oligosaccharide supplementation on human faecal microflora and on survival and persistence of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 in the gastrointestinal tract. **International Dairy Journal**, v.11, p.817-825, 2001.

ALLEN, D.A. Fat modification as a tool for product development Part 2. Interesterification and biomodification. **Lipid Technology**, v.10, p.53-57, 1998.

ALZAMORA, S.M.; SALVATORI, D.; TAPIA, M.S.; LÓPEZ-MALO, A.; WELTI-CHANES, J.; FITO, P. Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds. **Journal of Food Engineering**, v.67, p.205-214, 2005.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official method Ce 1-62: fatty acid composition by gas chromatography. *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society*. Champaign, 1997.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official method Cd 16b-93: solid fat content. *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society*. Champaign, 1999a.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official method Cj 1-94: DSC melting properties of fats and oils. *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society*. Champaign, 1999b.

ANAL, A.K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p.240-251, 2007.

ANTTOLAINEN, M.; LUOTO, R.; UUTELA, A.; BOICE, J.D.; BLOT, W.J.; MCLAUGHLIN, J.K.; PUSKA, P. Characteristics of users and nonusers of plant stanol ester margarine in Finland: an approach to study functional foods. **Journal of the American Dietetic Association**, v.101, n.11, p.365-368, 2001.

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

ANTUNES, A.E.C.; GRAEL, E.T.; MORENO, I.; RODRIGUES, L.G.; DOURADO, F.M.; SACCARO, D.M.; LERAYER, A.L.S. Selective Enumeration and viability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in a new fermented milk product. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.173-177, 2007.

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

ARIHARA, K.; OTA, H.; ITOH, M.; KONDO, Y.; SAMESHIMA, T.; YAMANAKA, H.; AKIMOTO, M.; KANAI, S.; MIKI, T. *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. **Journal of Food Science**, v.63, n.3, p.544-547, 1998.

ARMAND, M. Lipases and lipolysis in the human digestive tract: where do we stand? **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.10, p.156-164, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS PARA FINS ESPECIAIS E CONGÊNERES. Mercado de alimentos funcionais cresce no mundo. Disponível em <http://www.agrosoft.org.br/agropag/103100.htm>. Acesso em: 13 jan. 2010.

AUED-PIMENTEL, S.; CARUSO, M.S.F.; CRUZ, J.M.M.; KUMAGAI, E.E.; CORRÊA, D.U.O. Ácidos graxos saturados *versus* ácidos graxos *trans* em biscoitos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.62, n.2, p.131-137, 2003.

AZORÍN-ORTUÑO, M.; URBÁN, C.; CERÓN, J.J.; TECLES, F.; ALLENDE, A.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; ESPÍN, J.C. Effect of low inulin doses with different polymerisation degree on lipid metabolism, mineral absorption, and intestinal microbiota in rats with fat-supplemented diet. **Food Chemistry**, v.113, p.1058-1065, 2009.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 3ed., Campinas: Editora da UNICAMP, 2007. 480p.

BECEL. Disponível em <http://www.becel.com.br>. Acesso em: 20 jul. 2007.

BECEL. História completa da Becel. Disponível em <http://www.gessylever.com.br>. Acesso em: 25 jul. 2008. 7p. [Material em pdf].

BEGLEY, M.; GAHAN, C.G.M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.625-651, 2005.

BEGLEY, M.; HILL, C.; GAHAN, C.G.M. Bile salt hydrolase activity in probiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.3, p.1729-1738, 2006.

BEHRENS, J.H.; ROIG, S.M.; DA SILVA, M.A.A.P. Fermentation of soymilk by commercial lactic cultures: development of a product with market potential. **Acta Alimentaria**, v.33, n.2, p.101-109, 2004.

BERGAMINI, C.V.; HYNES, E.R.; QUIBERONI, A.; SUÁREZ, V.B.; ZALAZAR, C.A. Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. **Food Research International**, v.38, p.597-604, 2005.

BIEDRZYCKA, E.; BIELECKA, M. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p.170-175, 2004.

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

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.

BONVANKAR, R.P.; FRYE, L.A.; BLAUROCK, A.E.; SASEVICH, F.J. Rheological characterization of melting of margarines and tablespreads. **Journal of Food Engineering**, v.16, p. 55-74, 1992.

BORRIELLO, S.P.; HAMMES, W.P.; HOLZAPFEL, W.; MARTEAU, P.; SCHREZENMEIR, J.; VAARA, M.; VALTONEN, V. Safety of probiotics that contain Lactobacilli or Bifidobacteria. **Clinical Infectious Diseases**, v.36, p.775-80, 2003.

BOSSCHER, D.; LOO, J.V.; FRANCK, A. Inulin and oligofructose as prebiotics in the prevention of intestinal infections and diseases. **Nutrition Research Reviews**, v.19, p.216-226, 2006.

BOYLSTON, T.D.; VINDEROLA, C.G.; GHODDUSI, H.B.; REINHEIMER, J.A. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. **International Dairy Journal**, v.14, p.375-387, 2004.

BOWER, J.A. Statistics for food science – V: ANOVA and multiple comparisons (part B). **Nutrition and Food Science**, v.28, n.1, p.41-48, 1998a.

BOWER, J.A. Statistics for food science – V part C: non-parametric ANOVA. **Nutrition and Food Science**, v.28, n.2, p.102-108, 1998b.

BOWER, J.A. Statistics for food science IV: two sample tests. **Nutrition and Food Science**, v.27, n.1, p.39-43, 1997.

BRASIL. Portaria nº 372 de 04 de setembro de 1997. Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal, da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Margarina. Disponível em www.agricultura.gov.br. Acesso em: 02 maio 2006.

BREARTY, S.Mc.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; COLLINS, J.K.; WALLACE, J.M., STANTON, C. Influence of two commercially available bifidobacteria cultures on Cheddar cheese quality. **International Dairy Journal**, v.11, p.599-610, 2001.

BROEK, L.A.M.; HINZ, S.W.A.; BELDMAN, G.; VINCKEN, J.P.; VORAGEN, A.G.J. *Bifidobacterium* carbohydrases-their role in breakdown and synthesis of (potential) prebiotics. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.52, p.146-163, 2008.

BRUNO, F.A.; LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, N.P. Growth, viability and activity of *Bifidobacterium* spp. in skim milk containing prebiotics. **Journal of Food Science**, v.67, n.7, p.2740-2744, 2002.

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

BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Effects of refrigeration, freezing and replacement of milk fat by inulin and whey protein concentrate on texture profile and sensory acceptance of synbiotic guava mousses. **Food Chemistry**, v.123, n.4, p.1190-1197, 2010a.

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

BURITI, F.C.A.; KOMATSU, T.R.; SAAD, S.M.I. Activity os passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*) pulps on *Lactobacillus acidophilus* in refrigerated mousses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.315-317, 2007b.

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

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

BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.; SAAD, S.M.I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, v.15, n.12, p.1279-1288, 2005b.

BURY, D.; JELEN, P.; KIMURA, K. Whey protein concentrate as a nutrient supplement for lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, p.149-151, 1998.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. São Paulo: Artmed, 2003, 255p.

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

CARDARELLI, H.R.; BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic *petit-suisse* cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v.41, p.1037-1046, 2008.

CARR, N.O.; HOGG, F. A manufacturer's perspective on selected palm-based products. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.14, n.4, p.381-386, 2005.

CARUNCHIA WHETSTINE, M.E.; CROISSANT, A.E.; DRAKE, M.A. Characterization of dried whey protein concentrate. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.3826-3839, 2005.

CHAMPAGNE, C.P.; GARDNER, N.J. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, p.61-84, 2005.

CHAMPAGNE, C.P.; RAYMOND, Y.; GAGNON, R. Viability of *Lactobacillus rhamnosus* R0011 in an apple-based fruit juice under simulated storage conditions at the consumer level. **Journal of Food Science**, v.73, n.5, p.M221-M226, 2008.

CHAMPAGNE, C.P.; RAYMOND, Y.; GONTHIER, J.; AUDET, P. Enumeration of the contaminating bacterial microbiota in unfermented pasteurized milks enriched with probiotic bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.55, p.410-418, 2009.

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, p.759-768, 1998a.

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.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **International Journal of Dairy Technology**, v.51, n.4, p.123-136, 1998b.

CHENG, L.H.; LIM, B.L.; CHOW, K.H.; CHONG, S.M.; CHANG, Y.C. Using fish gelatin and pectin to make a low-fat spread. **Food Hydrocolloids**, v.22, n.8, p.1637-1640, 2008.

CHIARA, V.L.; SILVA, R.; JORGE, R.; BRASIL, A.P. *Trans* fatty acids: cardiovascular diseases and mother-child health. **Revista de Nutrição**, v.15, n.3, p.341-349, 2002.

CHRISTOPHER, M.D.; PADMANABHA, R.V.; VENKATESWARLU, K. Effect of whey protein concentrate supplementation on the viability of *Bifidobacterium bifidum* in probiotic yoghurt. **Journal of Food Science and Technology-Mysore**, v.43, n.5, p.552-554, 2006. [ABSTRACT].

CICHOSKI, A.J.; CUNICO, C.; DI LUCCIO, M.; ZITKOSKI, J.L.; CARVALHO, R.T. Efeito da adição de probióticos sobre as características de queijo prato com reduzido teor de gordura fabricado com fibras e lactato de potássio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.1, p.214-219, 2008.

CODEx STANDARD FOR NAMED VEGETABLE OILS (CODEX-STAN 210 - Amended 2003, 2005), 13p. Disponível em http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=en. Acesso em: 30 jul. 2008.

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, p.1147-1157, 2007.

CORBO, M.R.; ALBENZIO, M.; DE ANGELIS, M.; SEVI, A.; GOBBETTI, M. Microbiological and biochemical properties of Canestrato Pugliese hard cheese supplemented with *Bifidobacteria*. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.551-561, 2001.

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*, during shelf life of the product. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, p.1560-1568, 2008.

COSCIONE, A.R.; ANDRADE, J.C.; MAY, G.M. O modelamento estatístico de misturas: experimento tutorial usando voltametria de redissolução anódica. **Química Nova**, v.28, n.6, p.1116-1122, 2005.

CRITTENDEN, R.G.; MORRIS, L.F.; HARVEY, M.L.; TRAN, L.T.; MITCHELL, H.L.; PLAYNE, M.J. Selection of a *Bifidobacterium* strain to complement resistant starch in a synbiotic yoghurt. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.268-278, 2001.

CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.26, p.767-778, 2007.

D'AGOSTINI, D.; FERRAZ, R.C.; GIOIELLI, L.A.; SOLIS, V.E.S. Lípidos estructurados obtenidos por interesterificación de las mezclas binarias y ternarias de las grasas de palma, semilla de palma y triglicéridos de cadena media. **Grasas y Aceites**, v.52, n.3-4, p.214-221, 2001.

DAIGLE, A.; ROY, D.; BÉLANGER, G.; VUILLEMARD, J.C. Production of probiotic cheese (Cheddar-like cheese) using enriched cream fermented by *Bifidobacterium infantis*. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.6, p.1081-1091, 1999.

DAS, U.N. Essential fatty acids - A review. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.7, n.6, p.467-482, 2006.

DAVIDSON, R.H.; DUNCAN, S.E.; HACKNEY, C.R.; EIGEL, W.N.; BOLING, J.W. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.4, p.666-673, 2000.

DECKERE, E.A.M.; VERSCHUREN, P.M. Functional fat and spreads. In: **Functional Foods. Concept to product**. GIBSON, G.; WILLIAMS, C.M., eds. Boca Raton: CRC Press, 2000. p.233-250.

DELAMARRE, S.; BATT, C.A. The microbiology and historical safety of margarine. **Food Microbiology**, v.16, p.327-333, 1999.

DEL PIANO, M.; MORELLIC, L.; STROZZI, G.P.; ALLESINA, S.; BARBA, M.; DEIDDA, F.; LORENZINI, P.; BALLARÉ, M.; MONTINO, F.; ORSELLO, M.; SARTORI, M.; GARELLO, E.; CARMAGNOLA, S.; PAGLIARULO, M.; CAPURSO, L. Probiotics: from research to consumer. **Digestive and Liver Disease**, v.38, suppl.2, p.S248-S255, 2006a.

DEL PIANO, M.; BALLARÉ, M.; ANDERLONI, A.; CANNAGNOLA, S.; MONTINO, F.; GARELLO, E.; ORSELLO, M.; PAGLIARULO, M.; MORELLI, L.; CAPURSO, L. *In vitro* sensitivity of probiotics to human gastric juice. **Digestive and Liver Disease**, v.28, p.134, 2006b (abstract).

deMAN, J.M. Consistency of fats: a review. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.60, n.1, p.82-87, 1983.

DIAN, N.L.H.M.; SUNDRAM, K.; IDRIS, N.A. DSC Study on the melting properties of palm oil, sunflower oil, and palm kernel olein blends before and after chemical interesterification. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v.83, n.8, p.739-745, 2006.

DÍAZ GAMBOA, O.W.; GIOIELLI, L.A. Consistencia de lípidos estructurados a partir de aceite de pescado y grasa de palmiste. **Grasas Aceites**, v.54, n.2, p.122-129, 2003a.

DÍAZ GAMBOA, O.W.; GIOIELLI, L.A. Lípidos estructurados obtenidos por interesterificación química y enzimática a partir de aceite de pescado y grasa de palmiste. **Grasas y Aceites**, v.54, n.2, p.161-168, 2003b.

DING, W.K.; SHAH, N.P. Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. **Journal of Food Science**, v.72, n.9, M446-M450, 2007.

DING, W.K.; SHAH, N.P. An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.2, p.M53-M61, 2009.

DIPLOCK, A.T.; AGGETT, P.J.; ASHWELL, M.; BORNET, F.; FERN, F.B.; ROBERFROID, M.B. Scientific concepts of functional food in Europe: Consensus document. **British Journal of Nutrition**, v.81, suppl.1, p.S1–S27, 1999.

DOLLIMORE, D. Thermal analysis. **Analytical Chemistry**, v.68, n.10, p.63R–71R, 1996.

DOMMELS, Y.E.M.; KEMPERMAN, R.A.; ZEBREGS, Y.E.M.P.; DRAAISMA, R.B.; JOL, A.; WOLVERS, D.A.W.; VAUGHAN, E.E.; ALBERS, R. Survival of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in the human gastrointestinal tract with daily consumption of a low-fat probiotic spread. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.19, p.6198-6204, 2009.

DONKOR, O.N.; NILMINI, S.L.I.; STOLIC, P.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v.17, p.657-665, 2007.

DORIANA. Disponível em <http://www.doriana.com.br/>. Acesso em: 27 abr. 2009.

DROUAULT, S.; ANBA, J.; CORTHIER, G. *Streptococcus thermophilus* is able to produce a β -galactosidase active during its transit in the digestive tract of germ-free mice. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.2, p.938-941, 2002.

DUTCOVSKY, S.D. **Análise sensorial dos alimentos**. Curitiba: Champagnat, 1996.123p.

DYSZEL, S.M.; BAISH, S.K. Characterization of tropical oils by DSC. **Thermochimica Acta**, v.212, p.39-49, 1992.

EDEM, D.O. Palm oil: biochemical, physiological, nutritional, hematological, and toxicological aspects: A review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.57, p.319-341, 2002.

ELLI, M.; ZINK, R.; RYTZ, A.; RENIERO, R.; MORELLI, L. Iron requirement of *Lactobacillus* spp. in completely chemically defined growth media. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.695-703, 2000.

EL-SHAFEI, K.; TAWFIK, N.F.; DABIZA, N.M.A.; SHARAF, O.M.; EFFAT, B.A. *In vitro* assessment of gastrointestinal viability of potentially probiotic Lactobacilli. **Journal of American Science**, v.6, n.11, 357-367, 2010.

EMBRAPA. Definição e histórico de canola. Disponível em <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/canola/definicao.htm>. Acesso em: 11 ago. 2008.

ERIKSSON, L.; JOHANSSON, E.; WIKSTRÖM, C. Mixture design-design generation, PLS analysis, and model usage. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.43, p.1-24, 1998.

EVERS, J.M.; WIGHTMAN, L.M.; CRAWFORD, R.A.; CONTARINI, G.; COORS, U.; FARRINGTON, D.S.; MOKKENTIN, J.; NICOLAS, M. A precise method to measure the total fat content of spreadable fats. **International Dairy Journal**, v.10, p.815-827, 2000.

FAHY, D.M.; O'CALLAGHAN, Y.C.; O'BRIEN, N.M. Phytosterols: lack of cytotoxicity but interference with *b*-carotene uptake in Caco-2 cells in culture. **Food Additives and Contaminants**, v.21, n.1, p.42-51, 2004.

FANG, B.; JIANG, L.; REN, F.Z. Effects of initial heating temperature on the crystallization rate of *trans*-free palm oil. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.100, n.3, p.1085-1090, 2010.

FARNWORTH, E.R.; MAINVILLE, I.; DESJARDINS, M.P.; GARDNER, N.; FLISS, I.; CHAMPAGNE, C. Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. **International Journal of Food Microbiology**, v.116, p.174-181, 2007.

FAVARO-TRINDADE, C.S.; BERNARDI, S.; BODINI, R.B.; BALIEIRO, J.C.C.; ALMEIDA, E. Sensory acceptability and stability of probiotic microorganisms and vitamin C in fermented acerola (*Malpighia emarginata* DC.) ice cream. **Journal of Dairy Science**, v.71, n.6, p.S492-S495, 2006.

FÁVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. **Journal of Microencapsulation**, v.19, p.485-494, 2002.

FERGUSON, L.R. Nutrigenomics approaches to functional foods. **Journal of the American Dietetic Association**, v.109, p.452-458, 2009.

FIORAMONTI, J.; THEODOROU, V.; BUENO, L. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v.17, p.711-724, 2003.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf. Acesso em: 03 fev. 2005. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation].

FRANCK, A. Food applications of prebiotics. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B., ed. **Handbook of prebiotics**. Boca Raton: CRC, 2008. p.437-466.

FRITZEN-FREIRE, C.B.; MÜLLER, C.M.O.; LAURINDO, J.B.; PRUDÊNCIO, E.S. The influence of *Bifidobacterium* Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. **Journal of Food Engineering**, v.96, n.4, p.621-627, 2010.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, p.365-378, 1989.

FUSTER, G.O.; GONZÁLES-MOLERO, I. Probióticos y prebióticos em la práctica clínica. **Nutrición Hospitalaria**, v.22, suppl.2, p.26-34, 2007.

GARBOLINO, C.; BARTOCCINI, M.; FLÖTER, E. The influence of emulsifiers on the crystallization behaviour of a palm oil-based blend. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.107, p.616-626, 2005.

GARDINER, G.; ROSS, R.P.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; STANTON, C. Development of a probiotic cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2192-2199, 1998.

GARDINER, G.; STANTON, C.; LYNCH, P.B.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Evaluation of Cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.7, p.1379-1387, 1999.

GARG, M.L.; WOOD, L.G.; SINGH, H.; MOUGHAN, P.J. Means of delivering recommended levels of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in human diets. **Journal of Food Science**, v.71, n.5, p.R66-R71, 2006.

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.9, p.2467-2468, 2010.

GARRO, M.S.; VALDEZA, G.F.; GIORIA, G.S. Temperature effect on the biological activity of *Bifidobacterium longum* CRL 849 and *Lactobacillus fermentum* CRL 251 in pure and mixed cultures grown in soymilk. **Food Microbiology**, v.21, p.511-518, 2004.

GBASSI, G.K.; VANDAMME, T.; ENNAHAR, S.; MARCHIONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp. in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, v.129, p.103-110, 2009.

GIBSON, G.R. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). **Clinical Nutrition Supplements**, v.1, p.25-31, 2004.

GILLILAND, S.E. Probiotics and prebiotics. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L. **Applied Dairy Microbiology**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2001. p.327-343.

GIOIELLI, L.A. Margarinas e cremes vegetais: composição e tecnologia. **Óleos Grãos**, v.7, n.33, p.21-27, 1996a.

GIOIELLI, L.A. **Misturas binárias e ternárias de gorduras hidrogenadas na formulação de margarinas**. Tese de Livre-Docência. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Brasil, 1996b, 253p.

GNADIG, S.; XUÉ, Y.; BERDEAUX, O.; CHEARDIGNI, J.M.; SEBEDIO, J.L. Conjugated linoleic acid (CLA) as a functional ingredient. In: SAADHOLM, T.M.; SAARELA, M., eds. **Functional Dairy Products**. Cambridge: CRC Press, 2003, p.263-297.

GOLDIN, B.R. Health benefits of probiotics. **British Journal of Nutrition**, v.80, p.S203-S207, 1998.

GOLI, S.A.H.; SAHRI, M.M.; KADIVA, M. Enzymatic interesterification of structured lipids containing conjugated linoleic acid with palm stearin for possible margarine production. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.110, p.1102-1108, 2008.

GOLI, S.A.H.; SAHRI, M.M.; KADIVAR, M.; KERAMAT, J. The production of an experimental table margarine enriched with conjugated linoleic acid (CLA): physical properties. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v.86, p.453-458, 2009.

GONZÁLEZ, E.; JORDANO, R.; LÓPEZ, M.C.; CÓRDOBA, M.G.; MEDINA, L.M. Presencia de *Lactobacillus* spp. y *Bacillus licheniformis* en margarina con yogur. **Grasas y Aceites**, v.49, n.1, p.38-41, 1998.

GORBACH, S.L. Probiotics and gastrointestinal health. **American Journal of Gastroenterology**, v.95, n.1, suppl., p.S2-S4, 2000.

GRIFFIN, I.J., DAVILA, P.M., ABRAMS, S.A. Non-digestible oligosaccharides and calcium absorption in girls with adequate calcium intakes. **British Journal of Nutrition**, v.87, suppl.2, p.S187-S191, 2002.

GRIFFIN, I.J.; HICKS, P.M.D.; HEANEY, R.P.; ABRAMS, S.A. Enriched chicory inulin increases calcium absorption mainly in girls with lower calcium absorption. **Nutrition Research**, v.23, n.7, p.901-909, 2003.

GRIMALDI, R.; GONÇALVES, L.A.G.; GIOIELLI, L.A.; SIMÕES, I.S. Interactions in interesterified palm and palm kernel oils mixtures. II – Microscopy and differential scanning calorimetry. **Grasas y Aceites**, v.52, n.6, p.363-368, 2001.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, v.360, p.512-519, 2003.

GUARNER, F.; PERDIGON, G.; CORTIER, G.; SALMINEN, S.; KOLETZKO, B.; MORELLI, L. Should yogurt cultures be considered probiotic? **British Journal of Nutrition**, v.93, p.783-786, 2005.

GUEIMONDE, M.; DELGADO, S.; MAYO, B.; RUAS-MADIEDO, P.; MARGOLLES, A.; REYES-GAVILÁN, C.G. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. **Food Research International**, v.37, p.839-850, 2004.

GUEIMONDE, M.; FLÓREZ, A.B.; VAN HOEK, A.H.A.M.; STUER-LAURIDSEN, B.; STRØMAN, P.; REYES-GAVILÁN, C.G.; MARGOLLES, A. Genetic basis of tetracycline resistance in *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.10, p.3364-3369, 2010.

GUENTERT, A.M.; LINTON, R.H. Growth and survival of selected pathogens in margarine-style table spreads. **Journal of Environmental Health**, v.65, n.9, p.9-13, 2003.

GUINARD, J.X.; MAZZUCCHELLI, R. The sensory perception of texture and mouthfeel. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p.213-219, 1996.

GUNSTONE, F.D. Foods applications of lipids. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B., eds. **Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, p.729-749, 2002.

GUNSTONE, F.D.; HARWOOD, J.L. Occurrence and characterisation of oils and fats. In: **The Lipid Handbook**. GUNSTONE, F.D.; HARWOOD, J.L.; DIJKSTRA, A.J., eds. Boca Raton: CRC Press, 2007. p.37-144.

GUSTAFSONA, D.R.; MCMAHONA, D.J.; MORREYB, J.; NANA, R. Appetite is not influenced by a unique milk peptide: caseinomacropeptide (CMP). **Appetite**, v.36, p.157-163, 2001.

GUO, Z.; WANG, J.; YAN, L.; CHEN, W.; LIU, X.M.; ZHANG, H. *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. The measurement of the hardness of margarine and fats with cone penetrometers. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v.36, p.345-348, 1959.

HANSEN, L.T.; ALLAN-WOJTAS, P.M.; JIN, Y.L.; PAULSON, A.T. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v.19, p.35-45, 2002.

HAMILTON-MILLER, J.M.T. Probiotics and prebiotics in the elderly. **Postgraduate Medical Journal**, v.80, p.447-451, 2004.

HASCHKE, F.; WANG, W.; PING, G.; VARAVITHYA, W.; PODHIPAK, A.; ROCHAT, F.; LINK-AMSTER, H.; PFEIFER, A.; DIALLO-GINSTL, E.; STEENHOUT, P. Clinical trials prove the safety and efficacy of the probiotic strain *Bifidobacterium* Bb12 in follow-up formula and growing-up milks. **Monatsschr Kinderheilkd**, v.146, suppl.1, p.26-30, 1998.

HASLER, C.M. Functional foods: Their role in disease prevention and health promotion. **Food Technology**, v.52, n.11, p.63-70, 1998.

HAYATI, I.N.; CHE MAN, Y.N.; TAN, C.P.; AINI, I.N. Thermal behavior of concentrated oil-in-water emulsions based on soybean oil and palm kernel olein blends. **Food Research International**, v.42, p.1223-1232, 2009.

HEERTJE, I. Foods under the microscope. Disponível em <http://www.isaac-heertje.nl/structure/>. Acesso em: 10 maio 2008.

HELLAND, M.H.; WICKLUND, T.; NARVHUS, J.A. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria, in maize porridge with added malted barley. **International Journal of Food Microbiology**, v.91, p.305-313, 2004a.

HELLAND, M.H.; WICKLUND, T.; NARVHUS, J.A. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk - and water-based cereal puddings. **International Dairy Journal**, v.14, n.11, p.957-965, 2004b.

HELLER, K.J.; BOCKELMANN, W.; SCHREZENMEIR, J.; deVRESE, M. Cheese and its potencial as a probiotic food. In: FARNWORTH, E.R., ed. **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.203-225.

HENNELLY, P.J.; DUNNE, P.G.; O'SULLIVAN, M.; O'RIORDAN, E.D. Textural, rheological and microstructural properties of imitation cheese containing inulin. **Journal of Food Engineering**, v.75, p.388-395, 2006.

HERCEG, Z.; ANET REŽEK, A.; LELAS, V.; KREŠIĆ, G.; FRANETOVIĆ, M. Effect of carbohydrates on the emulsifying, foaming and freezing properties of whey protein suspensions. **Journal of Food Engineering**, v.79, p.279-286, 2007.

HOFFMANN, G. **The chemistry and technology of edible oils and fats products**. London: Academic Press, 1989, p.201-338.

HOLLAND, B.; WELCH, A.A.; BUSS, D.H., eds. **McCance and Widdowson's the compositions of foods**. Cambridge: Royal Society of Chemistry and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1994, p.8-9.

HOLLIDAY, S.L.; ADLER, B.B.; BEUCHAT, L.R. Viability of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in butter, yellow fat spreads, and margarine as affected by temperature and physical abuse. **Food Microbiology**, v.20, p.159-168, 2003.

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

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

HOU, R.C.W.; LIN, M.Y.; WANG, M.M.C.; TZEN, J.T.C. Increase of viability of entrapped cells of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in artificial sesame oil emulsions. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.424-428, 2003.

HUDSON, H.M.; DAUBERT, C.R.; FOEGEDING, E.A. Rheological and physical properties of derivitized whey protein isolate powders. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v.48, p.3112-3119, 2000.

HUI, Y.H., ed. **Bailey's industrial oil and fat products**. 5ed., New York: Wiley, 1996, p.497-601, p.603-654.

HUR, S.J.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during *in vitro* digestion. **Food Chemistry**, v.114, p.253-262, 2009.

HUYS, G.; VANCANNEYT, M.; HAENE, K.; VANKERCKHOVEN, V.; GOOSSENS, H.; SWINGS, J. Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. **Research in Microbiology**, v.157, n.9, p.803-810, 2006.

IDRIS, N.A.; DIAN, N.L.H.M. Interesterified palm products as alternatives to hydrogenation. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.14, n.4, p.396-401, 2005.

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

JAFARI, M.; KADIVAR, M.; KERAMAT, J. Detection of adulteration in Iranian olive oils using instrumental (GC, NMR, DSC) methods. **Journal American Oil Chemists' Society**, v.86, p.103-110, 2009.

JAIN, P.K.; MCNAUGHT, C.E.; ANDERSON, A.D.; MACFIE, J.; MITCHELL, C.J. Influence of synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium lactis* Bb 12, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and oligofructose on gut barrier function and sepsis in critically ill patients: a randomised controlled trial. **Clinical Nutrition**, v.23, n.4, p.467-75, 2004.

JALILI, H.; RAZAVI, S.H.; SAFÁRI, M.; MALCATA, F.X. Enhancement of growth rate and β -galactosidase activity, and variation in organic acid profile of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb 12. **Enzyme and Microbial Technology**, v.45, p.469-476, 2009.

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

JAYAMANNE, V.S.; ADAMS, M.R. Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts. **Letters in Applied Microbiology**, v.42, p.189-194, 2006.

JIMENEZ, M.; GARCIA, H.S.; BERISTAIN, C.S. A sensory evaluation of dairy products supplemented with microencapsulated conjugated linoleic acid (CLA). **LWT - Food Science and Technology**, v.41, p.1047-1052, 2008.

JONES, P.J. Clinical nutrition: 7. Functional foods - more than just nutrition. **Canadian Medical Association Journal**, v.166, n.12, p.1555-1563, 2002.

JONG, N.; ZUUR, A.; WOLFS, M.C.J.; WENDEL-VOS, G.C.W.; RAAIJ, J.M.A.; SCHUIT, A.J. Exposure and effectiveness of phytosterol/-stanol enriched margarines. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.61, p.1407-1415, 2007.

JUNTUNEN, M.; KIRJAVAINEN, P.V.; OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.J.; ISOLAURI, E. Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, n.2, p.293-296, 2001.

JUST-FOOD, 2008. Global market review of functional foods – forecasts to 2013. Disponível em <http://www.researchandmarkets.com>. Acesso em: 09 ago. 2010.

KAILASAPATHY, K.; SUPRIADI, D. Effect of whey protein concentrate on the survival of *Lactobacillus acidophilus* in lactose hydrolyzed yoghurt during refrigerated storage. **Milchwissenschaft**, v.51, p.565-568, 1996. [Abstract].

KAISERSBERGER, E. DSC investigations of the thermal characterization of edible fats and oils. **Thermochimica Acta**, v.151, p.83-90, 1989.

KALANTZI, L.; GOUMAS, K.; KALIORAS, V.; ABRAHAMSSON, B.; DRESSMAN, J.B.; REPPAS, C. Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. **Pharmaceutical Research**, v.23, n.1, p.165-176, 2006.

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

KARABULUT, I.; TURAN, S.; ERGIN, G. Effects of chemical interesterification in solid fat content and slip melting point of fat/oil blends. **European Food Research Technology**, v.218, p.224-229, 2004.

KARUPAIAH, T.; SUNDRAM, K. Effects of stereospecific positioning of fatty acids in triacylglycerol structures in native and randomized fats: a review of their nutritional implications. **Nutrition and Metabolism**, v.4, n.16, p.1-17, 2007.

KASK, S.; ADAMBERG, K.; ORLOWSKI, A.; VOGENSEN, F.K.; MØLLER, P.L.; ARDÖ, Y.; PAALME, T. Physiological properties of *Lactobacillus paracasei*, *L. danicus* and *L. curvatus* strains isolated from Estonian semi-hard cheese. **Food Research International**, v.36, p.1037-1046, 2003.

KAUR, N.; GUPTA, A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **Journal of Bioscience**, v.27, n.7, p.703-714, 2002.

KELLY, G. Inulin - type prebiotics – A review: Part 1. **Alternative Medicine Review**, v.13, n.4, p.315-328, 2008.

KHALF, M.; DABOUR, N.; KHEADR, E.; FLISS, I. Viability of probiotic bacteria in maple sap products under storage and gastrointestinal conditions. **Bioresource Technology**, v.101, n.20, p.7966-7972, 2010.

KHALIL, A.H.; MANSOUR, E. H. Alginate encapsulated bifidobacteria survival in mayonnaise. **Journal of Food Science**, v.63, n.4, p.702-705, 1998.

KIM, B.H.; LUMOR, S.E.; AKOH, C.C. *Trans*-free margarines prepared with canola oil/palm stearin/palm kernel oil-based structured lipids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.8195-8205, 2008.

KIM, B.H.; SHEWFEL, R.L.; LEE, H.; AKOH, C.C. Sensory evaluation of butterfat-vegetable oil blend spread prepared with structured lipid containing canola oil and caprylic acid. **Journal of Food Science**, v.70, n.7, p.406-412, 2005.

KIP, P.; MEYER, D.; JELLEMA, R.H. Inulins improve sensoric and textural properties of low-fat yoghurts. **International Dairy Journal**, v.16, p.1098-1103, 2006.

KLEWICKA, E.; MOTYL, I.; LIBUDZISZ, Z. Fermentation of beet juice by bacteria of genus *Lactobacillus* sp. **European Food Research Technology**, v.218, p.178-183, 2004.

KOLANOWSKI, W.; SWIDERSKI, F.; JAWORSKA, D.; BERGER, S. Stability, sensory quality, texture properties and nutritional value of fish oil-enriched spreadable fat. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.84, p.2135-2141, 2004.

KOLIDA, S.; GIBSON, G.R. The prebiotic effect: review of experimental and human data. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B., ed. **Handbook of prebiotics**. Boca Raton: CRC, 2008. p.69-92.

KOLIDA, S.; TUOHY, K.; GIBSON, G.R. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**, v.87, suppl.2, p.S193-S197, 2002.

KONG, F.; SINGH, R.P. Disintegration of solid foods in human stomach. **Journal of Food Science**, v.73, n.5, p.67-80, 2008.

KOS, B.; ŠUŠKOVIĆ, J.; GORETA, J.A.H.; MATOŠIĆ, S. Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. **Food Technology and Biotechnology**, v.38, n.2, p.121-127, 2000.

KOS, B.; ŠUŠKOVIĆ, J.; VUKOVIĆ, S.; ŠIMPRAGA, M.; FRECE, J.; MATOŠIĆ, S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.981-987, 2003.

KOSIN, B.; RAKSHIT, S.K. Microbial and processing criteria for production of probiotics: A review. **Food Technology and Biotechnology**, v.44, n.3, p.371-379, 2006.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, v.13, p.3-13, 2003.

KRAVTSOV, E.G.; YERMOLAYEV, A.V.; ANOKHINA, V.; YASHINA, N.V.; CHESNOKOVA, V.L.; DALIN, M.V. Adhesion characteristics of *Lactobacillus* is a criterion of the probiotic choice. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.145, n.2, p.232-234, 2008.

KUMMEROW, F.A.; ZHOU, Q.; MAHFOUZ, M.M.; SMIRICKY, M.R.; GRIESHP, C.M.; SCHAEFFER, D.J. *Trans* fatty acids in hydrogenated fat inhibited the synthesis of the polyunsaturated fatty acids in the phospholipid of arterial cells. **Life Sciences**, v.74, p.2707-2723, 2004.

KUN, S.; REZESSY-SZABO, J.M.; NGUYEN, Q.D.; HOSCHKE, A. Changes of microbial population and some components in carrot juice during fermentation with selected *Bifidobacterium* strains. **Process Biochemistry**, v.43, p.816-821, 2008.

KWAK, N.S.; JUKES, D.J. Functional foods. Part 1. The development of a regulatory concept. **Food Control**, v.12, p.99-107, 2001.

LAJOLO, F.M. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE ALIMENTOS FUNCIONAIS. ILSI – Brasil, São Paulo, 1999 *apud* PUPIN, A.M. Probióticos, prebióticos e simbióticos: aplicações em alimentos funcionais. In: Alimentos funcionais e Biotecnologia. SEMINÁRIO NOVAS ALTERNATIVAS DE MERCADO, Campinas, 2002, p.133-145.

LAMOUREUX, L.; ROY, D.; GAUTHIER, S.F. Production of oligosaccharides in yogurt containing bifidobacteria and yogurt cultures. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.1058-1069, 2002.

LAPARRA, J.M.; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. **Pharmacological Research**, v.61, p.219-225, 2010.

LARQUÉ, E.; ZAMORA, S.; GILB, A. Dietary *trans* fatty acids in early life: a review. **Early Human Development**, v.65, p.S31–S41, 2001.

LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. **Sensory Evaluation of Foods: Principles and Practices**. Gaithersburg: Aspen, 1999. 827p.

LEAHY, S.C.; HIGGINS, D.G.; FITZGERALD, G.F.; van SINDEREN, D. Getting better with bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.1303-1315, 2005.

LEE, J.H.; AKOH, C.C.; HIMMELSBACH, D.S.; LEE, K.T. Preparation of interesterified plastic fats from fats and oils free of *trans* fatty acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.11, p.4039-4046, 2008.

LEE, Y.K.; SALMINEN, S. The coming age of probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v.6, p.241-245, 1995.

LIAN, W.C.; HSIAO, H.C.; CHOU, C.C. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, p.293-301, 2003.

LIBBEY, P.; RID, K.; MASERI, P.M. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, v.105, p.1135–1143, 2002.

LIN, S.W.; YOO, C.K. Short-path distillation of palm olein and characterization of products. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.111, p.142-147, 2009.

LISERRE, A.M.; RÉ, M.I.; FRANCO, B.D.G.M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Biotechnology**, v.21, p.1-16, 2007.

LIU, D.M.; LI, L.; YANG, X.Q.; LIANG, S.Z.; WANG, J.S. Survivability of *Lactobacillus rhamnosus* during the preparation of soy cheese. **Food Technology and Biotechnology**, v.44, n.3, p.417-422, 2006.

LÓPEZ-MOLINA, D.; NAVARRO-MARTÍNEZ, M.D.; MELGAREJO, F.R.; HINER, A.N.P.; CHAZARRA, S.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.N. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L.). **Phytochemistry**, v.66, p.1476-1484, 2005.

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

LUCAS, A.; SODINI, I.; MONNETA, C.; JOLIVET, P.; CORRIEU, G. Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milkprotein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v.14, p.47-53, 2004.

LUCKOW, T.; DELAHUNTY, C. Which juice is 'healthier'? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. **Food Quality and Preference**, v.15, p.751-759, 2004.

MAGARIÑOS, H.; CARTES, P.; FRASER, B.; SELAIVE, S.; COSTA, M.; FIGUEROLA, F.; PIZARRO, O. Viability of probiotic micro-organisms (*Lactobacillus casei* Shirota and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) in a milk-based dessert with cranberry sauce. **International Journal of Dairy**, v.61, n.1, p.96-101, 2008.

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

MAI, V.; DRAGANOV, P.V. Recent advances and remaining gaps in our knowledge of associations between gut microbiota and human health. **World Journal of Gastroenterology**, v.15, n.1, p.81-85, 2009.

MAINVILLE, I.; ARCAND, Y.; FARNWORTH, E.R. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v.99, p.287-296, 2005.

MAKRAS, L.; VAN ACKER, G.; DE VUYST, L. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.11, p.6531-6537, 2005.

MAKRAS, L.; VUYST, L. The *in vitro* inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. **International Dairy Journal**, v.16, p.1049-1057, 2006.

MALAYSIAN PALM OIL AND BOARD. World production of 17 oils and fats: 1998-2007. Disponível em: <http://www.mpob.gov.my>. Acesso em: 15 ago. 2008.

MALLA, S.; HOBBS, J.E.; PERGER, O. Valuing the health benefits of a novel functional food. **Canadian Journal of Agricultural Economics**, v.55, p.115-136, 2007.

MANNING, T.S.; GIBSON, G.R. Prebiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.18, n.2, p.287-298, 2004.

MANTZIORIS, E.; JAMES, M.J.; GIBSON, R.A.; CLELAND, L.G. Dietary substitution with an α -linolenic acid-rich vegetable oil increases eicosapentaenoic acid concentrations in tissues. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.59, n.6, p.1304-1309, 1994.

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

MARTIN, C.A.; ALMEIDA, V.V.; RUIZ, M.R.; VISENTAINER, J.E.L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v.19, n.6, p.761-770, 2006.

MARTIN, C.A.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N.E. Ácidos graxos *trans*: implicações nutricionais e fontes na dieta. **Revista de Nutrição**, v.17, n.3, p.361-368, 2004.

MARTIN, C.A.; MILINSK, M.C.; VISENTAINER, J.V.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N.E. *Trans* fatty acid-forming processes in foods: a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.79, n.2, p.343-350, 2007.

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, p.827-833, 2003.

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

MASCO, L.; CROCKAERT, C.; VAN HOORDE, K.; SWINGS, J.; HUYS, G. *In vitro* assessment of the gastrointestinal transit tolerance of taxonomic reference strains from human origin and probiotic product Isolates of *Bifidobacterium*. **Journal of Dairy Science**, v.90, p. 3572–3578, 2007.

MASCO, L.; VENTURA, M.; ZINK, R.; HUYS, G.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.1137-1143, 2004.

MASUCHI, M.H.; CELEGHINI, R.M.S.; GONÇALVES, L.A.G.; GRIMALDI, R. Quantificação de TBHQ (terc butil hidroquinona) e avaliação da estabilidade oxidativa em óleos de girassol comerciais. **Química Nova**, v.31, n.5, p.1053-1057, 2008.

MATER, D.D.G.; BRETIGNY, L.; FIRMESSE, O.; FLORES, M.J.; MOGENET, A.; BRESSON, J.L.; CORTIER, G. *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. **FEMS Microbiology Letters**, v.250, p.185-187, 2005.

MATIJEVIC, B.; BOTANIC, R.; TRATNIK, L.; JELICIC, I. The influence of whey protein concentrate on growth and survival of probiotic bacteria in whey. **Mljekarstvo**, v.58, n.3, p.243-255, 2008. [Abstract].

MATSUMOTO, M.; OHISHIA, H.; BENNO, Y. H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. **International Journal of Food Microbiology**, v.93, 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, 2006a.

MÄTTÖ, J.; FONDÉN, R.; TOLVANEN, T.; VON WRIGHT, A.; VILPPONEN-SALMELEDA, T.; REETTA, S.; SAARELA, M. Intestinal survival and persistence of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains administered in triple-strain yoghurt. **International Dairy Journal**, v.16, p.1174–1180, 2006b.

McCLEMENTS, D.J. Emulsion Ingredients. **Food emulsions. Principles, practices, and techniques**. 2ed. Boca Raton: CRC Press, 2005. p.83-124.

MEILE, L.; LE BLAY, G.; THIERRY, A. Safety assessment of dairy microorganisms: *Propionibacterium* and *Bifidobacterium*. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p.316–320, 2008.

MEILE, L.; LUDWIG, W.; RUEGER, U.; GUT, C.; KAUFMANN, P.; DASEN, G.; WENGER, S.; TEUBER, M. *Bifidobacterium lactis*. sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. **Systematic and Applied Microbiology**, v.20, p.57-64, 1997.

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

METIN, S., HARTEL, R.W. Thermal analysis of isothermal crystallization kinetics in blend of cocoa butter with milk fat or milk fat fractions. **Journal American Oil Chemists' Society**, v.75, n.11, p.1617-1624, 1998.

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

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

MIETTINEN, T.A.; GYLLING, H. Cholesterol absorption efficiency and sterol metabolism in obesity. **Atherosclerosis**, v.153, p.241–248, 2000.

MISKANDAR, M.S.; MAN, Y.B.C.; YUSOFF, M.S.A.; RAHMAN, R.A. Effect of emulsion temperature on physical properties of palm oil-based margarine. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v.79, n.12, p.1163-1168, 2002.

MODZELEWSKA-KAPITULA, M.; KLEBUKOWSKA, L.; KORNACKI, K. Influence of inulin and potentially probiotic *Lactobacillus plantarum* strain on microbiological quality and sensory properties of soft cheese. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.57, n.2, p.143-146, 2007.

MOHAN, R.; KOEBNICK, C.; SCHILDT, J.; SCHMIDT, S.; MUELLER, M.; POSSNER, M.; RADKE, M.; BLAUT, M. Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.11, p.4025-4031, 2006.

MORELLI, L. *In vitro* assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. **International Dairy Journal**, v.17, p.1278-1283, 2007.

MORENO, F.J.; LOPEZ-FANDIÑO, R.; OLANO, A. Characterization and functional properties of lactosyl caseinomacropeptide conjugates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.18, p.5179-5184, 2002.

MOSCATTO, J.A.; PRUDÊNCIO-FERREIRA, S.H.; HAULY, M.C.O. Farinha de yacon e inulina como ingredientes na formulação de bolo de chocolate. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.4, p.634-640, 2004.

MUN, S.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Influence of emulsifier type on *in vitro* digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. **Food Research International**, v.40, p.770-781, 2007.

MUÑOZ, J.; ALFARO, M.C.; ZAPATA, I. Avances en la formulación de emulsiones. **Grasas y Aceites**, v.58, n.1, p.64-73, 2007.

NEBESNY, E.; DOROTA, Z.; MOTYL, I.; LIBUDZISZ, Z. Dark chocolates supplemented with *Lactobacillus* strains. **European Food Research Technology**, v.225, p.33-42, 2007.

NICOLI, J.R.; VIEIRA, E.C.; PENNA, F.J.; VIEIRA, L.Q.; RODRIGUES, A.C.P.; NEUMANN, E.; SILVA, A.M.; FILHO, J.V.M.L.; BAMBIRRA, E.A.; ARANTES, R.M.E.; MACHADO, D.C.C. Probióticos: experiências com animais gnotobióticos. In: FERREIRA, C.L.L.F., ed. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. p.123-133.

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

O'BRIEN, R.D. Margarine. In: **Fats and Oils: Formulating and Processing for Applications**. 3ed. Boca Raton: CRC Press, 2009. p.447-472.

O'BRIEN, J.; CRITTENDEN, R.; OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S. Safety evaluation of probiotics. **Trends Food Science & Technology**, v.10, p.418-424, 1999.

OELSCHLAEGER, T.A. Mechanisms of probiotic actions – A review. **International Journal of Medical Microbiology**, v.300, p.57-62, 2010.

O'FLAHERTY, S.; KLAENHAMMER, T.R. The role and potential of probiotic bacteria in the gut, and the communication between gut microflora and gut/host. **International Dairy Journal**, v.20, p.262-268, 2010.

OLIVEIRA, R.P.S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, M.N. Effect of inulin on growth and acidification performance of different probiotic bacteria in co-cultures and mixed culture with *Streptococcus thermophilus*. **Journal of Food Engineering**, v.91, p.133-139, 2009.

OMIDI, H.; TAHMASEBI, Z.; NAGHDI BADI, H.A.; TORABI, H.; MIRANSARI, M. Fatty acid composition of canola (*Brassica napus* L.), as affected by agronomical, genotypic and environmental parameters. **Comptes Rendus - Biologies**, v.333, n.3, p.248-254, 2010.

ONG, A.S.H.; CHOO, Y.M.; OOI, C.K. Development in palm oil. In: HAMILTON, R.J., ed. **Developments in oils and fats**. Chapman & Hall, 1995. p.153-191.

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, p.103-106, 2004.

OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.82, p.279-289, 2002.

PACHECO, K.C.; DEL TORO, G.V.; MARTÍNEZ, F.R.; DURÁN-PÁRAMO, E. Viability of *Lactobacillus delbrueckii* under human gastrointestinal conditions simulated *in vitro*. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v.5, n.1, p.37-42, 2010.

PAL, R. Techniques for measuring the composition (oil and water content) of emulsions - a state of the art review. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.84, p.141-193, 1994.

PALZER, S. Food structures for nutrition, health and wellness. **Trends in Food Science & Technology**, v.20, n.5, p.194-200, 2009.

PARK, Y.S.; LEE, J.Y.; KIM, Y.S.; SHIN, D.H. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from feces of newborn baby and from *Dongchimi*. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.50, p.2531-2536, 2002.

PARVEZ, S.; MALIK, K.A.; AH KANG, S.; KIM, H.Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, n.6, p.1171-1185, 2006.

PAVAN, R. **Avaliação dos teores de ácidos graxos *trans* em margarinas e cremes vegetais após a resolução RDC 360 (ANVISA)**. Dissertação. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Brasil, 2008, 83p.

PETRAUSKAITE, A.; DE GREYT, W.; KELLENS, M.; HUYGHEBAERT, A. Physical and chemical properties of *trans*-free fats produced by chemical interesterification of vegetable oil blends. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.75, n.4, p.489-493, 1998.

PICARD, C.; FIORAMONTI, J.; FRANCOIS, A.; ROBINSON, T.; NEANT, F.; MATUCHANSKY, C. Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.22, p.495-512, 2005.

POMPEI, A.; CORDISCO, L.; RAIMONDI, S.; AMARETTI, A.; PAGNONI, U.G.; MATTEUZZI, D.; ROSSI, M. *In vitro* comparison of the prebiotic effects of two inulin-type fructans. **Anaerobe**, v.14, p.280-286, 2008.

POSSEMIERS, S.; MARZORATI, M.; VERSTRAETE, W.; WIELE, T. Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p.97-103, 2010.

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

PRIETO, B.; FRANCO, I.; FRESNO, J.M.; PRIETO, J.G.; BERNARDO, A.; CARBALLO, J. Effect of ripening time and type of rennet (farmhouse rennet from kid or commercial calf) on proteolysis during the ripening of León cow milk cheese. **Food Chemistry**, v.85, p.389-398, 2004.

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

RAC, J.N.R.; GIOIELLI, L.A. Lipídios modificados obtidos a partir de gordura do leite, óleo de girassol e ésteres de fitosteróis para aplicação em *spreads*. **Química Nova**, v.31, n.8, p.1960-1965, 2008.

RAMCHANDRAN, L.; SHAH, N.P. Characterization of functional, biochemical and textural properties of symbiotic low-fat yogurts during refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, v.43, p.819-827, 2010.

RANJITH, H.M.P. Water continuous emulsions. In: RAJAH, K.K., ed. **Fats in food technology**. Sheffield Academic Press: CRC Press, 2002. p.69-122.

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.; MAITIN, V. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.490-496, 2002.

RIBEIRO, A.P.B.; MOURA, J.M.L.N.; GRIMALDI, R.; GONÇALVES, L.A.G. Interesterificação química: alternativa para obtenção de gorduras zero *trans*. **Química Nova**, v.30, n.5, p.1295-1300, 2007.

RITTER, P.; KOHLER, C.; AH, U. Evaluation of the passage of *Lactobacillus gasseri* K7 and bifidobacteria from the stomach to intestines using a single reactor model. **BMC Microbiology**, v.9, p.1-9, 2009.

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

ROBERFROID, M.B. Concepts and strategy of functional food science: the european perspective. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, n.6, suppl., p.1660-1664, 2000.

ROBERFROID, M.B. Inulin-type fructans: functional food ingredients. Boca Raton: CRC, 2005. 359p.

ROBERFROID, M.B. Inulin-type fructans: functional food ingredients. **Journal of Nutrition**, v.137, n.11, p.2493S-2502S, 2007.

ROBERFROID, M.B. General introduction: prebiotics in nutrition. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B., ed. **Handbook of prebiotics**. Boca Raton: CRC, 2008a. p.1-11.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics: concept, definition, criteria, methodologies, and products. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B., ed. **Handbook of prebiotics**. Boca Raton: CRC, 2008b. p.39-68.

ROBINSON, D.J.; RAJAH, K.K. Spreadable products. In: RAJAH, K.K., ed. **Fats in food technology**. Sheffield Academic Press: CRC Press, 2002. p.192-227.

RODRIGUES, J.N.; FILHO, J.M.; TORRES, R.P.; GIOIELLI, L.A. Caracterização físico-química de creme vegetal enriquecido com ésteres de fitosteróis. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.40, n.4, p.226-223, 2004.

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 de Alimentos**, v.23, n.2, p.226-233, 2003.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 1ed., Campinas: Editora Casa do Pão, 2005. 326p.

ROKKA, S.; RANTAMÄKI, P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.231, p.1-12, 2010.

RONKART, S.N.; PAQUOT, M.; DEROANNE, C.; FOUGNIES, C.; BESBES, S.; BLECKER, C.S. Development of gelling properties of inulin by microfluidization. **Food Hydrocolloids**, v.24, n.4, p.318-324, 2010.

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

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 the American Oil Chemists' Society**, v.73, n.8, p.963-972, 1996.

ROUZAUD, G.C.M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: functional ingredients for microbial management strategies. In BILIADERIS, C.G.; IZYDORCZYK, M.S., eds. **Functional food carbohydrates**. CRC Press, 2007, p.479-509.

ROY, D. Technological aspects related to the use of Bifidobacteria in dairy products. **Lait**, v.85, p.39-56, 2005.

ROZADA-SÁNCHEZ, R.; SATTUR, A.P.; THOMAS, K.; PANDIELLA, S.S. Evaluation of *Bifidobacterium* spp. for the production of a potentially probiotic malt-based beverage. **Process Biochemistry**, v.43, p.848-854, 2008.

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

RYBKA, S.; FLEET, G.H. Populations of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species in Australian yoghurts. **Food Australia**, v.49, n.10, p.471-475, 1997.

RYHÄNEN, E.L.; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; PAHKALA, E. A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. **International Dairy Journal**, v.11, p.441-447, 2001.

SAAD, S.M.I. Alimentos funcionais probióticos e prébióticos. In: TIRAPEGUI, J. **Nutrição: fundamentos e aspectos atuais**. 2ed. –São Paulo: Atheneu, 2006a. p.275-283.

SAAD, S.M.I. Probióticos e Prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.1, p.1-16, 2006b.

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

SAARELA, M.; VIRKAJARVI, I.; ALAKOMIA, H.L.; SIGVART-MATTILA, P.; MÄTTÖ, J. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. **International Dairy Journal**, v.16, p.1477-1482, 2006.

SALEM, M.M.E.; EL-GAWAD, M.A.M.A.; HASSAN, F.A.M.; EFFAT, B.A. Use of synbiotics for production of functional low fat Labneh. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.57, n.2, p.151-159, 2007.

SALLANS, F.; RODRIGUEZ, F.; SABLAYROLLES, B.; COMBES, A.; PATAU, J.P.; ROUFFIAC, R. Etude comparative de cinq specialties de théophylline a liberation prolongée. **Journal de Pharmacie Belgique**, v.43, p.81-87, 1988.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; MORELLI, L.; MARTEAU, P.; BRASSART, D.; DE VOS, W.M.; FONDÉN, R.; SAXELIN, M.; COLLINS, K.; MOGENSEN, G.; BIRKELAND, S.E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Demonstration of safety of probiotics: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.44, p.93-106, 1998.

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

SANIBAL, E.A.A.; FILHO, J.M. Perfil de ácidos graxos *trans* de óleo e gordura hidrogenada de soja no processo de fritura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.1, p.27-31, 2004.

SÁNCHEZ, B.; CHAMPOMIER-VERGÈS, M.C.; STUER-LAURIDSEN, B.; RUAS-MADIEDO, P.; ANGLADE, P.; BARAIGE, F.; REYES-GAVILÁN, C.G.; JOHANSEN, E.; ZAGOREC, M.; MARGOLLES, A. Adaptation and response of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* to bile: a proteomic and physiological approach. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.1, p.6757-6767, 2007.

SCHIFFRIN, E.J.; BLUM, S. Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.56, suppl.3, p.S60-S64, 2002.

SCHILLINGER, U.; GUIGAS, C.; HOLZAPFEL, W.H. *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. **International Dairy Journal**, v.15, p.1289-1297, 2005.

SCHMIDT, G.; ZINK, R. Basic features of the stress response in three species of bifidobacteria: *B. longum*, *B. adolescentis*, and *B. breve*. **International Journal of Food Microbiology**, v.55, p.41-45, 2000.

SCHOLZ-AHRENS, K.E.; ADE, P.; MARTEN, B.; WEBER, P.; TIMM, W.; ASIL, Y.; GLÜER, C.C.; SCHREZENMEIR, J. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. **The Journal of Nutrition**, v.137, p.838S-846S, 2007.

SEGURA, J.A.; HERRERA, M.L.; ANON, M.C. Margarines: a rheological study. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v.72, n.3, p.375-378, 1995.

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

SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V.; BRITZ, M.L.; KYLE, W.S.A. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. **International Dairy Journal**, v.5, p.515-521, 1995.

SHEEHAN, V.M.; SLEATOR, R.D.; HILL, C.; FITZGERALD, G.F. Improving gastric transit, gastrointestinal persistence and therapeutic efficacy of the probiotic strain *Bifidobacterium breve* UCC2003. **Microbiology**, v.153, p.3563-3571, 2007.

SHEU, T.Y.; MARSHALL, R.T. Microentrapment of Lactobacilli in calcium alginate gels. **Journal of Food Science**, v.58, n.3, p.557-561, 1993.

SHIMA, M.; MATSUO, T.; ADACHI, S. Effects of inner-phase components of water-in-oil-in-water emulsion on low-pH tolerance of *Lactobacillus acidophilus* incorporated into inner-water phase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.103, n.3, p.278-281, 2007.

SHIMAKAWA, Y.; MATSUBARA, S.; YUKI, N.; IKEDA, M.; ISHIKAWA, F. Evaluation of *Bifidobacterium breve* strain Yakult-fermented soymilk as a probiotic food. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, p.131-136, 2003.

SHIN, H.S.; LEE, J.F.; PESTKA, J.J.; USTUNOL, Z. Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp. in skim milk containing oligosaccharides and inulin. **Food Microbiology and Safety**, v.65, n.5, p.884-887, 2000.

SILVA, R.C.; ESCOBEDO, J.P.; GIOIELLI, L.A. Comportamento de cristalização de lipídios estruturados por interesterificação química de banha e óleo de soja. **Química Nova**, v.31, n.2, p.330-335, 2008.

SIMÕES, I.S.; GIOIELLI, L.A.; OLIVEIRA, M.N. Consistência de mistura de gorduras hydrogenadas de mistura de óleo de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.3, 1998.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - A review. **Appetite**, v.5, p.456-467, 2008.

SKODVIN, T.; SJÖBLOM, J.; SAETEN, J.O.; WÄRNHEIM, T.; GESTBLOM, G. A time domain dielectric spectroscopy study of some model emulsions and liquid margarines. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.83, p.75-82, 1994.

SOLANO-AGUILAR, G.; DAWSON, R.; RESTREPO, M.; ANDREWS, K.; VINYARD, B.; URBAN, J.F. Detection of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bb12) in the intestine after feeding of sows and their piglets. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.20, p.6338-6347, 2008.

SOUSA, M.J.; ARDÖ, Y.; MCSWEENEY, P.L.H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, v.11, p.327-345, 2001.

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

SOUZA, C.H.B.; SAAD, S.M.I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-chemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. **LWT – Food Science and Technology**, v.42, n.2, p.633-640, 2009.

SPILLER, R. Review article: probiotics and prebiotics in irritable bowel syndrome. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.28, p.385-396, 2008.

SREENIVASAN, B. Interesterification of fats. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.55, n.11, p.796-805, 1978.

STANTON, C.; GARDINER, G.; LYNCH, P.B.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Probiotic cheese. **International Dairy Journal**, v.8, p.491-497, 1998.

STANTON, C.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; VAN SINDEREN, D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, p.198-203, 2005.

STATSOFT INC., Statistica for Windows, Version 8.0, 2300 East 14th Street, Tulsa, OK, 74104, USA.

STRINGHETA, P.C.; OLIVEIRA, T.T.; GOMES, R.C.; PENHA, M.; AMARAL, H.; CARVALHO, A.F.; VILELA, M.A.P. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.2, p.181-194, 2007.

SUÁREZ-SOLÍS, V.; CARDOSO, F.; VILLAVICENCIO, M.N.; FERNÁNDEZ, M.; FRAGOSO, L. Queso fresco probiótico. **Alimentaria: Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos**, v.333, p.83-86, 2002.

SVENSSON, U. Industrial perspectives. In: TANNOCK, G.W. **Probiotics: a critical review**. Wymondham: Horizon Scientific, 1999. p.57-64.

SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p.137-142, 2004.

TAKAHASHI, N.; XIAO, J.Z.; MIYAJI, K.; YAESHIIMA, T.; HIRAMATSU, A.; IWATSUKI, K.; KOKUBO, S.; HOSONO, A. Selection of acid tolerant Bifidobacteria and evidence for a low-pH-inducible acid tolerance response in *Bifidobacterium longum*. **Journal of Dairy Research**, v.71, n.3, p.340-345, 2004.

TAN, C.P.; CHE MAN, Y.B. Differential scanning calorimetric analysis of palm oil, palm oil based products and coconut oil: effects of scanning rate variation. **Food Chemistry**, v.76, p.89-102, 2002.

TAN, Y.A.; SAMBANTHAMURTHI, R.; SUNDRAM, K.; WAHIDA, M.B. Valorisation of palm by-products as functional components. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.109, p.380-393, 2007.

TANAKA, L.; MIURA, S.; YOSHIOKA, T. Formation of granular crystals in margarine with excess amount of palm oil. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v.84, p.421-426, 2007.

TAVELLA, M.; PETERSON, G.; ESPECHE, M.; CAVALLERO, E.; CIPOLLA, L.; PEREGO, L.; CABALLERO, B. *Trans* fatty acid content of a selection of foods in Argentina. **Food Chemistry**, v.69, p.209-213, 2000.

TESHIMA, E. Aspectos terapêuticos de probióticos, prebióticos e simbióticos. In: FERREIRA, C.L.L.F., ed. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Suprema, Viçosa, 2003. p.35-60.

THAMMARUTWASIK, P.; HONGPATTARAKERE, T.; CHANTACHUM, S.; KIJROONGROJANA, K.; ITHARAT, A.; REANMONGKOL, W.; TEWTRAKUL, S.; OORAIKUL, B. Prebiotics – a review. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v.31, n.4, p.401-408, 2009.

THOMSON, A.B.R.; DROZDOWSKI, L.; LORDACHE, C.; THOMSON, B.K.A.; VERMEIRE, S.; CLANDININ, M.T.; WILD, G. Small bowel review: Normal physiology, Part 1. **Digestive Disease Science**, v.48, p.1546-1564, 2003.

THOMÄ-WORRINGER, C.; SØRENSEN, J.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. **International Dairy Journal**, v.16, p.1324-1333, 2006.

TINOCO, S.M.B.; SICHIERI, R.; MOURA, A.S.; SANTOS, F.S.; CARMO, M.G.T. Importância dos ácidos graxos essenciais e os efeitos dos ácidos graxos *trans* do leite materno para o desenvolvimento fetal e neonatal. **Cadernos de Saúde Pública**, v.23, n.3, p.525-534, 2007.

TURGUT, T.; CAKMAKCI, S. Investigation of the possible use of probiotics in ice cream manufacture. **International Journal of Dairy Technology**, v.62, n.3, p.444-451, 2009.

UPRITCHARD, J.E.; ZEELLENBERG, M.J.; HUIZINGA, H.; VERSCHUREN, M.P.; TRAUTWEIN, A.E. Modern fat technology: what is the potential for heart health? **Proceedings of the Nutrition Society**, v.64, p.379-386, 2005.

VAN DALEN, G. Determination of the water droplet size distribution of fat spreads using confocal scanning laser microscopy. **Journal of Microscopy**, v.208, n.116-133, 2002.

VAN LOO, J.; CUMMINGS, J.; DELZENNE, N.; ENGLYST, H.; FRANCK, A.; HOPKINS, M.; KOK, N.; MACFARLANE, G.; NEWTON, D.; QUIGLEY, M.; ROBERFROID, M.; VLIET, T.; HEUVEL, E. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). **British Journal of Nutrition**, v.81, p.121-132, 1999.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics-from Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v.18, p.714-728, 2008.

VAZ, J.S.; DEBONI, F.; AZEVEDO, M.J. GROSS, J.L.; ZELMANOVITZ, T. Ácidos graxos como marcadores biológicos da ingestão de gorduras. **Revista de Nutrição**, v.19, n.4, p.489-500, 2006.

VEGA-LÓPEZ, S.; AUSMAN, L.M.; JALBERT, S.M.; ERKKILA, A.T.; LICHTENSTEIN, A.H. Palm and partially hydrogenated soybean oils adversely alter lipoprotein profiles compared with soybean and canola oils in moderately hyperlipidemic subjects. **American Journal Clinical Nutrition**, v.84, p.54-62, 2006.

VENTURA, M.; ZINK, R. Rapid identification, differentiation and proposed new taxonomic classification of *Bifidobacterium lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.6429-6434, 2002.

VERNAZZA, C.L.; GIBSON, G.R.; RASTALL, R.A. Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of *Bifidobacterium*. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, p.846-853, 2006.

VINDEROLA, C.G.; PROSELO, W.; GHIBERTO, D.; REINHEIMER, J.A. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1905-1911, 2000.

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

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Enumeration of *L. casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v.10, n.4, p.271-275, 2000.

VOROBJEVA, N.V. Selective stimulation of the growth of anaerobic microflora in the human intestinal tract by electrolyzed reducing water. **Medical Hypotheses**, v.64, p.543-546, 2005.

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, p.8-12, 2009.

WANG, I.C.; YU, R.C.; CHOU, C.C. Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**, v.23, p.128-135, 2006.

WANG, I.C.; YU, R.C.; CHOU, C.C. Growth and survival of bifidobacteria and lactic acid bacteria during the fermentation and storage of cultured soymilk drinks. **Food Microbiology**, v.19, p.501-508, 2002.

WILLEY, R. Fats, oils, and greases: The minimization and treatment of wastewaters generated from oil refining and margarine production. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.50, p.127-133, 2001.

YEO, S.K.; LIONG, M.T. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.90, n.2, p.267-275, 2010.

YILDIRIM, Z.; WINTERS, D.K.; JOHNSON, M.G. Purification, amino acid, sequence and mode of action of Bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.45-54, 1999.

YOON, K.Y.; WOODAMS, E.E.; HANG, Y.D. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. **Bioresource Technology**, v.97, p.1427-1430, 2006.

ZALIHA, O.; CHONG, C.L.; CHEOW, C.S.; NORIZZAH, A.R.; KELLENS, M.J. Crystallization properties of palm oil by dry fractionation. **Food Chemistry**, v.86, p.245-250, 2004.

ZHU, L.; DONG, X. Species identification of genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences and proposal of *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *porcinum* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.1619-1623, 2003.

ZIEMER, C.; GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspective and future strategies. **International Dairy Journal**, v.8, p.473-479, 1998.

ANEXOS

I. Protocolo de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Ofício CEP nº 133/2006)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 133/2006

São Paulo, 31 de outubro de 2006.

~~Ilmo(a). Sr(a).~~

Cinthia Hoch Batista de Souza

Orientadora Profa. Susana Marta Isay Saad

FBT

Prezado(a) Senhor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 30 de outubro de 2006, **APROVOU** o projeto "Desenvolvimento de margarina probiótica e simbiótica: viabilidade do probiótico no produto e resistência in vitro" (Protocolo CEP nº 389) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética Pesquisa
FCF/USP

II. Modelo de ficha utilizada na análise sensorial

Nome:.....**Data:**.../.../....**Amostra**
nº.....

Você está recebendo uma amostra de margarina. Por favor, prove a amostra, e em seguida, avalie usando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou do produto. Circule o número referente à sua opinião sobre o produto. Por favor, utilize o pão de forma como base para provar a margarina.

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

O que você mais gostou na amostra?Comente

—

O que você menos gostou na amostra?Comente

Obrigada pela sua participação!

III. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

- Nome do Paciente:..... Nascimento:...../...../.....
Documento de Identidade nº :.....Sexo: () M () F Data de nascimento:.....
Endereço:.....nº:.....Apto:.....Bairro:.....Cidade:.....
.CEP:.....Telefone:.....E-mail:.....
- Responsável Legal:.....Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....
Documento de Identidade Nº:.....Sexo: () M () F Data de Nascimento:...../...../.....
Endereço:.....Nº:.....Apto:.....Bairro:.....Cidade:.....CEP:.....Tel:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

- Título do Protocolo de Pesquisa: “**Desenvolvimento de margarina probiótica e simbiótica: viabilidade do probiótico no produto e resistência *in vitro***”.
Pesquisador: **Cíntia Hoch Batista de Souza**
Cargo/Função: **Doutoranda**
Inscrição Conselho Regional Nº:.....
Departamento da FCF/USP: **Departamento de Tecnologia-Bioquímico-Farmacêutica.**

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Risco Mínimo (X) Risco Médio () Risco Baixo () Risco Maior ()

(Probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo. Nos projetos com coleta de sangue, incluir detalhadamente, como observação as possíveis reações decorrentes desse procedimento.).

- Duração da Pesquisa: 4 anos – Análise sensorial: período de 2 semanas.

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

Estamos convidando você a participar da análise sensorial de margarina probiótica e simbiótica. Esse produto está sendo desenvolvido pela aluna de doutorado Cíntia Hoch Batista de Souza (Bióloga), sob orientação da Profª Drª Susana Marta Isay Saad (Farmacêutica-Bioquímica; CRF-8 nº 9.541), no Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica FCF/USP. Caso você tenha interesse em participar, por favor, acomode-se junto a uma das cabines do Laboratório Interdepartamental de Análise Sensorial da FCF/USP, localizado no Bloco 16.

O produto a ser avaliado nesta análise possui em sua formulação: água, sal, leite em pó desnatado, acidulante ácido láctico, gordura de palma, óleo de canola, emulsificantes, aroma idêntico ao natural de manteiga e corante urucum. Todos os ingredientes da formulação são ingredientes utilizados em produtos disponíveis para consumo humano, ou seja, são de grau alimentício. Além disso, os produtos foram adicionados de fibra solúvel (inulina) e fermento láctico (*Bifidobacterium* Bb-12), com efeitos benéficos ao organismo humano comprovados através da realização de ensaios em humanos; e concentrado protéico de soro (WPC) e concentrado de caseína (CMP). Todos os ingredientes utilizados na formulação base das margarinas são aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA e/ou pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, assim como a cepa de *Bifidobacterium* Bb-12, a fibra solúvel – inulina e os concentrados protéicos.

O produto foi desenvolvido e armazenado no laboratório de Tecnologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, de acordo com as Boas Práticas de Fabricação de Alimentos.

Foram realizadas análises microbiológicas dos produtos para a contagem das populações da cultura probiótica (*Bifidobacterium* Bb-12) e para a contagem da população de contaminantes (bactérias e leveduras, coliformes totais e *E. coli*). É importante ressaltar que as análises microbiológicas de contaminantes foram

realizadas apenas para verificar se algum desses microrganismos eventualmente se desenvolveu no produto, uma vez que a margarina possui características próprias que impedem a multiplicação de microrganismos patogênicos.

Para participar desta análise, você deve ter entre 18 e 60 anos, ser consumidor regular de margarinas, manteigas, produtos de alto teor de gorduras, como maioneses e produtos lácteos como iogurtes, bebidas lácteas e leites fermentados, sem nenhum tipo de manifestação de alergia ou intolerância ou outro tipo de restrição (como doença crônica ou tratamento médico com o uso de medicamentos) e você não pode estar gripado, resfriado ou indisposto. Atendendo a essas condições você poderá participar da análise sensorial da margarina, sem qualquer desconforto ou risco esperado.

Assim, você terá a oportunidade de participar da análise sensorial, provando um alimento similar aos que normalmente você consome, dando sua opinião a respeito dos produtos. Você também estará participando da pesquisa de desenvolvimento de um novo produto, que objetiva a obtenção de um alimento semelhante ao convencional, porém, com propriedades probióticas e simbióticas, uma vez que são adicionados de ingredientes que auxiliam na manutenção da saúde física e mental humana, prevenindo o perigo de aparecimento de doenças.

Todas as formulações estudadas (7 no total) serão analisadas sensorialmente. A análise sensorial será realizada em sessões distintas após 7 e 14 dias de armazenamento dos produtos. Serão analisadas 7 amostras de margarina produzida com 60% de gordura. Cada amostra será provada uma única vez por cada provador.

Os produtos serão submetidos a uma análise sensorial de aceitação, onde cada provador receberá as amostras em um recipiente adequado para alimentos contendo uma porção de aproximadamente 10 g de produto. O provador receberá uma amostra de cada vez, juntamente com pão de forma sem casca, para ser utilizado como base para provar os produtos. Para expressar sua opinião sobre o produto, os provadores utilizarão uma escala de 9 pontos, com notas variando de 1 (desgostei muitíssimo) a 9 (gostei muitíssimo).

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

Não haverá remuneração financeira para os participantes da análise. O provador poderá desistir de participar da análise a qualquer momento, sem nenhum ônus. Todas as informações pessoais serão sigilosas, garantindo a privacidade dos provadores. Caso o provador queira se interar mais sobre o produto que está sendo desenvolvido e sobre os seus possíveis efeitos sobre a saúde, nosso grupo de pesquisa estará à disposição para dar explicações à respeito, e/ou fornecer literatura científica apropriada sobre o assunto e/ou disponibilizar o projeto de pesquisa enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, o qual contém maiores detalhes e informações técnicas sobre a análise sensorial a ser realizada.

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

**CÍNTIA HOCH BATISTA DE SOUZA. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. Av. Prof. Lineu Prestes, 580, CEP 05508-000 São Paulo-SP.
Telefone: 11-3091-2379**

SUSANA MARTA ISAY SAAD. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. Av. Prof. Lineu Prestes, 580 CEP 05508-000 São Paulo-SP, Telefone: 11-3091-2378

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

“Estou ciente do objetivo da análise, não apresento reação alérgica ou intolerância aos ingredientes, tenho entre 18 e 60 anos, costumo consumir regularmente margarinas, manteigas, produtos de alto teor de gordura, produtos lácteos como iogurtes, bebidas lácteas e leites fermentados, não tenho nenhuma doença crônica (como diabetes, hipotireoidismo, hipertireoidismo, hipertensão ou outras), não estou fazendo tratamento médico (tomando algum medicamento) e aceito participar dessa análise.”

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de dezembro de 2009.

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(Cíntia Hoch Batista de Souza)

IV. Tabela com o controle do pH durante cada etapa do ensaio de resistência *in vitro*: 0-2h: etapa gástrica, 2h-4h: 1ª etapa entérica (intestino delgado) e 4h-6h: 2ª etapa entérica (intestino grosso).

Armazenamento (Dias)	Tempo do teste (horas)	pH*						
		Margarina						
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
7	0-2h	1,81±0,03	1,90±0,04	1,79±0,02	1,73±0,03	1,87±0,03	1,94±0,02	1,81±0,03
	2h-4h	4,07±0,12	5,02±0,26	4,19±0,12	4,80±0,06	4,71±0,13	5,13±0,25	4,68±0,09
	4h-6h	7,08±0,04	7,21±0,03	7,07±0,07	6,80±0,06	7,20±0,10	7,11±0,10	6,77±0,06
14	0-2h	1,84±0,04	1,80±0,03	1,87±0,02	1,84±0,07	1,98±0,02	1,98±0,07	2,00±0,17
	2h-4h	4,22±0,07	4,76±0,08	4,19±0,05	5,24±0,30	4,16±0,08	5,06±0,26	4,48±0,28
	4h-6h	7,11±0,03	7,08±0,07	6,87±0,05	6,82±0,06	7,01±0,02	7,18±0,07	6,93±0,13
21	0-2h	1,65±0,03	1,76±0,04	2,02±0,19	1,94±0,22	1,83±0,03	2,00±0,12	1,78±0,22
	2h-4h	4,82±0,10	4,83±0,22	4,08±0,25	4,93±0,29	4,20±0,11	5,24±0,31	4,29±0,08
	4h-6h	6,98±0,03	7,09±0,11	6,79±0,01	6,84±0,04	7,01±0,02	7,18±0,07	7,03±0,09
28	0-2h	1,71±0,05	1,80±0,02	1,73±0,03	2,00±0,18	1,74±0,02	1,84±0,06	1,81±0,10
	2h-4h	4,89±0,09	4,70±0,06	5,00±0,26	4,68±0,32	4,97±0,07	5,00±0,18	4,80±0,21
	4h-6h	6,81±0,02	6,90±0,02	6,82±0,06	6,78±0,12	6,77±0,04	7,22±0,04	6,89±0,04

* Valores: média ± desvio padrão – análise realizada em triplicata.

V. Ficha do aluno gerada pelo sistema Janus

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9133 - 5082418/2 - Cinthia Hoch Batista de Souza

Email: cinthiahoch@usp.br
Data de Nascimento: 15/07/1981
Cédula de Identidade: RG - 30.324.206-1 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas - Faculdade de Ciências e Letras - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - São Paulo - Brasil - 2003
Mestrado: Mestre em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - Área: Tecnologia de Alimentos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2006

Curso: Doutorado
Programa: Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área: Tecnologia de Alimentos
Data de Matrícula: 17/07/2006
Início da Contagem de Prazo: 17/07/2006
Data Limite: 15/10/2010
Orientador: Prof(a). Dr(a). Susana Marta Isay Saad - 17/07/2006 até o presente. E.Mail: susaad@usp.br
Coorientador: Prof(a). Dr(a). Luiz Antonio Gioielli - 20/09/2006 até o presente. E.Mail: lagio@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 17/07/2006
Prorrogação: 90 dias
 Período de 17/07/2010 a 15/10/2010
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 17/12/2009
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:

Última ocorrência: Prorrogação em 11/06/2010

Impresso em: 24/06/10 09:52:29

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9133 - 5082418/2 - Cíntia Hoch Batista de Souza

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
Atividade do Programa	Participou de Atividades de Monitoria junto a Disciplina FBT-0201Tecnologia de Alimentos, ministrada aos alunos de graduação do Curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	01/08/2006	30/11/2006	-	3	0	-	-	-
FBA5728-2/4	Aprimoramento Didático	03/10/2006	30/10/2006	60	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida
ICB5709-4/1	Ensaio Pedagógico	07/11/2006	11/12/2006	30	2	100	A	N	Concluída
FBT5735-5/3	Modificação Industrial de Óleos e Gorduras	04/04/2007	08/05/2007	75	0	0	-	N	Turma cancelada
FBA5703-4/1	Tópicos em Tratamento de Dados para Ciência e Tecnologia de Alimentos	11/06/2007	24/06/2007	60	4	100	A	N	Concluída
FBT5735-5/4	Modificação Industrial de Óleos e Gorduras	08/08/2007	14/09/2007	75	5	100	A	N	Concluída
FBA5887-1/3	Atualidades em Ciência, Tecnologia e Mercado de Carnes	31/03/2008	11/04/2008	30	2	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Patente Nacional depositada ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial, com o título da invenção: "Spread probiótico e/ou prebiótico, seu processo de fabricação e uso", com o número de PI0802264-0, São Paulo, Brasil, 2008 (2)	11/04/2008	11/04/2008	-	4	0	-	-	-

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	20	20	20
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	20	20	20

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

- 1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR 3588, de 11.05.2005 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 05/07/2007.
- 2) Créditos atribuídos de acordo com o disposto no Artigo 65 do Regimento de Pós-Graduação e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 26/11/2008.

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.

VI. Informações para os membros de bancas julgadoras de Mestrado e Doutorado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

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.

2.2 Tempo máximo total de arguição: 3 horas para o mestrado e 5 horas para o doutorado.

3. Não serão permitidas correções na dissertação/tese. Assim, havendo extrema necessidade, poderá ser incluída uma errata.

4. A sessão de defesa será aberta ao público.

5. 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.

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

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

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

São Paulo, 11 de dezembro de 2009.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP