UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Alimentos

**Comportamento do ácido elágico em bebidas lácteas simbióticas
suplementadas com L-triptofano e polpa de frutas vermelhas durante
armazenamento refrigerado**

Thamires Maria Simões da Silva

São Paulo
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Alimentos

**Comportamento do ácido elágico em bebidas lácteas simbióticas
suplementadas com L-triptofano e polpa de frutas vermelhas durante
armazenamento refrigerado**

Thamires Maria Simões da Silva

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Maricê Nogueira de Oliveira

São Paulo
2015

Ficha Catalográfica

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

S586c Silva, Thamires Maria Simões da
Comportamento do ácido elágico em bebidas lácteas simbióticas
suplementadas com L-triptofano e polpa de frutas vermelhas durante
armazenamento refrigerado / Thamires Maria Simões da Silva. --
São Paulo, 2015.
57p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-
Farmacêutica.
Orientador: Oliveira, Maricê Nogueira de

1. Tecnologia de alimentos 2. Produtos lácteos 3. Leite fermentado
4. Probióticos 5. Alimentos funcionais 6. Antioxidantes I. T. II.
Oliveira, Maricê Nogueira de, orientador.

Thamires Maria Simões da Silva

**Comportamento do ácido elágico em bebidas lácteas simbióticas
suplementadas com L-triptofano e polpa de frutas vermelhas durante
armazenamento refrigerado**

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a. Dr^a. Maricê Nogueira de Oliveira

Orientadora / Presidente

1º. Examinador

2º. Examinador

3º. examinador

São Paulo, _____ de 2016.

*“Tudo o que temos de decidir é o que fazer
com o tempo que nos é dado. ”*

- John Ronald Ruel Tolkien

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me guiar em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis, por estar comigo a cada segundo e por me tornar cada dia mais forte diante a cada dificuldade.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maricê Nogueira de Oliveira, por acreditar no meu potencial quando eu mesma não acreditava, se tornando o meu exemplo de profissional e conquistando toda a minha admiração.

Aos meus pais, José Antônio e Maria de Fátima, por todo apoio incondicional, amor, carinho e compreensão que me dedicaram todos esses anos.

Aos meus irmãos, Thaís e Matheus, por toda a amizade e companheirismo de uma vida.

À minha sobrinha, Maria Eduarda, por ser responsável pelos meus dias mais felizes.

Ao meu namorado, Everton, pelo amor, compreensão e por toda a sua paciência nos momentos em que mais precisei.

À professora Cristina Stewart Bittencourt Bogsan, por estar presente em todos os momentos, por me aconselhar e por me mostrar que é possível se apaixonar várias vezes pelo mesmo projeto.

À professora Cláudia Dorta, pelo incentivo a seguir esse caminho e por me guiar na direção certa.

Às senhoras Anna Carolina e Marcela, cujas amizades foram a melhor recompensa dessa experiência. Obrigada pelo carinho e ajuda em todos os momentos em que precisei.

À Natália Pratis Perina, pela amizade e por toda a imensurável ajuda nesse projeto.

Ao professor Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira, por todo apoio nos momentos finais do mestrado e por acreditar no meu potencial para os próximos projetos.

À professora Suzana Lannes, pelo apoio e pela compreensão nos momentos mais difíceis desse projeto.

À Luciana Bueno, pelo companheirismo no início do projeto e por me mostrar que sou mais forte do que imaginava.

À Alessandra e a Vânia, da Central Analítica de Química, pela dedicação nas análises referentes ao projeto.

A todos os professores do departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, em especial o Prof. Luiz Antônio Gioielli, Suzana Marta Isay Saad, Thereza Christina Vessoni Penna, Gisele Monteiro de Souza e João Carlos Monteiro de Carvalho por suas contribuições na minha formação.

A todos os funcionários do departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Nilton, Ivani, Tânia e Rose. Muito obrigada por toda ajuda e pela paciência em todos os momentos em que precisei.

Ao Alexandre Mariani que, além de um excelente técnico, se mostrou um ótimo professor, sendo responsável por uma parte considerável de todo o conhecimento que adquiri durante o mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida durante o meu mestrado.

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro através do processo 2012/ 0208-8.

À todas as novas amizades que fiz nesses dois anos de mestrado.

A todos os que, embora não foram citados, contribuíram de alguma forma para a realização desse projeto.

RESUMO

SILVA, T. M.S. **Comportamento do ácido elágico em bebidas lácteas simbióticas suplementadas com L-triptofano e polpa de frutas vermelhas durante armazenamento refrigerado. 2015. p.57** Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Os benefícios à saúde oferecidos pelos leites fermentados probióticos podem ser ampliados pela adição de polpa de frutas vermelhas uma vez que estas apresentam reconhecidas propriedades funcionais. Ácido elágico e elagitaninos presentes nas frutas apresentam função fisiológica e metabólica na alimentação. Porém, a estabilidade destes compostos bioativos em produtos probióticos durante armazenamento refrigerado ainda não foi estudada. Sendo assim, este projeto tem por finalidade investigar o comportamento do ácido elágico em bebidas lácteas simbióticas suplementadas com L-triptofano e polpa de frutas vermelhas durante armazenamento refrigerado. O estudo foi realizado através de um delineamento experimental do tipo simplex centróide para modelagem de misturas. Foram preparadas 16 bebidas lácteas divididas em duas diferentes matrizes de ensaios segundo: (i) enriquecimento ou não da bebida láctea com triptofano e (ii) composição em frutas vermelhas do preparado de frutas. As amostras de bebida láctea foram avaliadas quanto as suas características físico-químicas (pH, reologia e atributos de cor), microbiológicas, microestrutura e quanto ao teor de ácido elágico. As bebidas lácteas apresentaram reduzidas pós-acidificação sem variações significativas para as bebidas contendo triptofano. As mesmas bebidas apresentaram melhora significativa na viabilidade da bactéria probiótica *Lactobacillus acidophilus* ao longo do período estudado. Os parâmetros de cor se mostraram estáveis nas bebidas lácteas durante o armazenamento refrigerado. O comportamento reológico das bebidas lácteas foi semelhante e adição de polpa de fruta proporcionou um efeito benéfico na consistência e viscosidade dos produtos. Foi possível estimar o conteúdo ótimo de ácido elágico nas bebidas lácteas simbióticas pela metodologia de superfície de resposta. As bebidas lácteas adicionadas de polpa de morango apresentaram maiores teores de ácido elágico, principalmente nas bebidas contendo triptofano. As fotos micrografias obtidas através da microscopia eletrônica de varredura permitiram avaliar a interação dos componentes da matriz das bebidas lácteas simbióticas de forma satisfatória.

Palavras-Chave: bebidas lácteas, ácido elágico, frutas vermelhas, probióticos.

ABSTRACT

SILVA, T. M.S. **Behaviour of ellagic acid in synbiotic lactic beverages supplemented with L-tryptophan and red fruit pulp during cold storage.** 2015. p. 57 Master's Dissertation – Pharmaceutical Sciences Faculty, São Paulo University, São Paulo, 2015.

The health benefits provided by probiotic fermented milk can be enhanced by the addition of native fruit pulp as they have recognized functional properties. Ellagic acid and ellagitannins present in fruits show physiological and metabolic function. Identification of these bioactive compounds in the formulation of synbiotic fermented beverages supplemented with L-tryptophan and red fruit pulp is innovative. Therefore, this project aimed to investigate the behaviour of ellagic acid in synbiotic lactic beverages supplemented with L-tryptophan and red pulp fruits during cold storage. Through an experimental simplex centroid design for mixtures modelling 16 beverages were prepared divided into four different matrices according to : (i) enrichment or not with L-tryptophan and (ii) composition of the prepared fruit pulp. The responses to be evaluated will be defined between the physical-chemical (pH, rheology and colour attributes), microbiological, microstructure and the amounts of ellagic acid. Lactic beverages have shown low post-acidification without significant variations for beverages containing tryptophan. The improvement in the viability of the probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* throughout the study period was achieved. The colour parameters were stable during cold storage. The rheological behaviour was similar and the addition of red fruit pulps provided a beneficial effect on the consistency and viscosity of the products. It was possible to estimate the optimum amount of ellagic acid throughout response surface methodology. Lactic beverages added with strawberry pulp have had higher amounts of ellagic acid, particularly when L-tryptophan was supplemented. The photomicrographs obtained by scanning electron microscopy allowed adequate assessing the interaction of the matrix components of synbiotic lactic beverages.

Keywords: dairy beverages ellagic acid, red fruit, probiotic

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE ABREVIACÕES	iii
I - INTRODUÇÃO	1
II - REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1. Bebidas lácteas	2
2.2. Probióticos	4
2.3. Prebióticos	5
2.4. Frutas vermelhas e ácido elágico	6
2.5. Triptofano	8
III - OBJETIVOS	10
Objetivos específicos	10
IV - MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1. MATERIAL	11
4.1.1. Ingredientes	11
4.1.2. Culturas microbianas	11
4.2. MÉTODOS	11
4.2.1. Preparação da matriz fermentada	11
4.2.2. Elaboração do preparado de frutas vermelhas	13
4.2.3. Desenho experimental e preparação das bebidas lácteas	13
4.2.4. Enumeração de bactérias viáveis	16
4.2.5. Análises físico-químicas	16
4.2.6. Determinação instrumental da cor	17
4.2.7. Propriedades reológicas	17
4.2.8. Extração, hidrólise e determinação do teor de ácido elágico	17
4.2.9. Microscopia eletrônica de varredura - MEV	19
4.2.10. Análises Estatísticas	20
V - RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1. Composição centesimal das bases lácteas	21
5.2. Cinética de acidificação	22

5.3. Evolução do pH durante o armazenamento	23
5.4. Contagem de bactérias viáveis.....	25
5.5. Propriedades de cor.....	29
5.6. Propriedades reológicas	33
5.7. Perfil de ácido elágico e otimização	40
5.8. Microestrutura eletrônica de varredura (MEV)	46
VI - CONCLUSÕES	49
VII - PERSPECTIVAS	50
VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Delineamento experimental tipo simplex centróide para estudo da biodisponibilidade de ácido elágico em bebidas lácteas simbióticas suplementadas com triptofano contendo frutas vermelhas.....	15
Tabela 2. Composição do leite e do soro empregados no preparo dos produtos lácteos.....	21
Tabela 3. Parâmetros cinéticos de acidificação de <i>Streptococcus thermophilus</i> (TA040), <i>Lactobacillus bulgaricus</i> (LB340) e <i>Lactobacillus acidophilus</i> (L104) em leite a 42°C até pH 4,7.....	23
Tabela 4. Médias* dos parâmetros de cor obtidas por Newman-Keuls bebidas lácticas sem triptofano fermentadas por <i>S. thermophilus</i> (St), <i>L.bulgaricus</i> (Lb) e <i>L. acidophilus</i> (La) após 36 h (d2) e 21 dias (d21) de armazenamento a 4°C.....	31
Tabela 5. Médias* dos parâmetros de cor obtidas por Newman-Keuls bebidas lácticas com triptofano fermentadas por <i>S. thermophilus</i> (St), <i>L.bulgaricus</i> (Lb) e <i>L. acidophilus</i> (La) após 36 h (d2) e 21 dias (d21) de armazenamento a 4°C.....	32
Tabela 6. Características reológicas de bebidas lácteas sem triptofano (ME1) a 5°C ajustadas pelo modelo de Ostwald-de Waele ($\tau = k y^n$).....	37
Tabela 7. Características reológicas de bebidas lácteas com triptofano (ME2) a 5°C ajustadas pelo modelo de Ostwald-de Waele ($\tau = k y^n$).....	38
Tabela 8. Teor de ácido elágico em preparados de frutas vermelhas.....	40
Tabela 9. Coeficientes dos modelos polinomiais ajustados para o teor de ácido elágico em bebidas lácteas simbióticas preparadas com misturas de polpas de frutas vermelhas.....	43

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Cromatograma típico do ácido elágico (Coluna: Phenomenex G C-18 (250x4.6 mm – 5µm; temp. forno: 40°C; solvente A: H₂O-0,1% ácido fórmico; solvente B: ACN 0,1% ácido fórmico fluxo: 1.0 mL/min).....19
- Figura 2.** Curva padrão de ácido elágico.....19
- Figura 3.** Perfil de acidificação de *Streptococcus thermophilus* (TA040), *Lactobacillus bulgaricus* (LB340) e *Lactobacillus acidophilus* (L104) em leite a 42°C até pH 4,7. (a) pH, (b) dpH/dt. Curva média de 8 repetições.....23
- Figura 4.** Valores de pH obtidos por Tukey em bebidas lácteas fermentadas por após 36 h (d2) e 21 dias (d21) de armazenamento a 4°C. Médias (N=3) com letras diferentes são significativamente diferentes; $P \leq 0.05$. Matriz de Ensaios 1 (bebida láctea sem triptofano).....25
- Figura 5.** Valores de pH obtidos por Tukey em bebidas lácteas fermentadas após 36 h (d2) e 21 dias (d21) de armazenamento a 4°C. Médias (N=3) com letras diferentes são significativamente diferentes; $P \leq 0.05$. Matriz de Ensaios 2 (bebida láctea com triptofano).....25
- Figura 6.** Contagens de bactérias viáveis obtidas por Newman-Keuls em bebidas lácteas fermentadas por *S. thermophilus* (a), *L. bulgaricus* (b) e *L. acidophilus* (b) após 36 h (d2) e 21 dias (d21) de armazenamento a 4°C. Médias (N=3) com letras diferentes são significativamente diferentes; $P \leq 0.05$. Matriz de Ensaios 1 (bebida láctea sem triptofano).....27
- Figura 7.** Contagens de bactérias viáveis obtidas por Newman-Keuls em bebidas lácteas fermentadas por *S. thermophilus* (a), *L. bulgaricus* (b) e *L. acidophilus* (c) após 36 h (d2) e 21 dias (d21) de armazenamento a 4°C. Médias (N=3) com letras diferentes são significativamente diferentes; $P \leq 0.05$. Matriz de Ensaios 2 (bebida láctea com triptofano).....28
- Figura 8.** Reogramas das bebidas lácteas sem triptofano (ME1) após 36 h (d2) e 21 dias de armazenamento refrigerado. Curvas médias (N=2).....35
- Figura 9.** Reogramas das bebidas lácteas com triptofano (ME2) após 36 h (d2) e 21 dias de armazenamento refrigerado. Curvas médias (N=2).....36

Figura 10. Viscosidade aparente em bebidas lácteas fermentadas após 36 h (d2) e 21 dias (d21) a 4°C. Médias (N=3) com letras diferentes são significativamente diferentes: $P \leq 0.05$. Matriz de Ensaio 1 (bebida láctea sem triptofano).....39

Figura 11. Viscosidade aparente em bebidas lácteas fermentadas após 36 h (d2) e 21 dias (d21) a 4°C. Médias (N=3) com letras diferentes são significativamente diferentes; $P \leq 0.05$. Matriz de Ensaio 2 (bebida láctea com triptofano).....39

Figura 12. Teor de ácido elágico em bebidas lácteas simbióticas sem (a) e com (b) triptofano preparadas com polpas de frutas vermelhas 36h após a preparação (d2) e após 21 dias (d21) de armazenamento a 4°C. Médias (N= 2) com as letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).....42

Figura 13. Contorno mostrando o efeito da adição de polpa de morango, polpa de framboesa e de polpa de pitanga nas bebidas lácteas simbióticas sem triptofano no teor de ácido elágico ajustado por um modelo cúbico especial pelos dados experimentais do ME2 36 horas (d2).....44

Figura 14. Contorno mostrando o efeito da adição de polpa de morango, polpa de framboesa e de polpa de pitanga nas bebidas lácteas simbióticas sem triptofano no teor de ácido elágico ajustado por um modelo cúbico especial pelos dados experimentais do ME2 21 dias (d21).....44

Figura 15. Contorno mostrando o efeito da adição de polpa de morango, polpa de framboesa e de polpa de pitanga nas bebidas lácteas simbióticas com triptofano no teor de ácido elágico ajustado por um modelo cúbico especial pelos dados experimentais do ME4 36 horas (d2).....45

Figura 16. Contorno mostrando o efeito da adição de polpa de morango, polpa de framboesa e de polpa de pitanga nas bebidas lácteas simbióticas com triptofano no teor de ácido elágico ajustado por um modelo cúbico especial pelos dados experimentais do ME4 21 dias (d21).....45

Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura de bebidas lácteas fermentadas por *Streptococcus thermophilus* (TA040), *Lactobacillus bulgaricus* (LB340) e *Lactobacillus acidophilus* (L104) 36h após a fermentação a 42°C até pH 4,7, sem adição de triptofano (ME1).....48

LISTA DE ABREVIACÕES

% – Percentual

°C – Graus Celsius

a* – Cromaticidade vermelho

ANOVA – Análise de Variância

b* – Cromaticidade amarelo

CINAC – *Cinétique d' acidification*

d2 – período de 36 horas após a fermentação

d21 – período após 21 dias de armazenamento refrigerado

g – Gramas

L* – Luminosidade

La – *Lactobacillus acidophilus*

Lb – *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

ME1 – Matriz experimental 1

ME2 – Matriz Experimental 2

min – Minuto

mL – Mililitro

pH – Potencial Hidrogeniônico

pH_{vmax} – pH do leite quando a velocidade máxima é atingida

St – *Streptococcus thermophilus*

t_{max} – Tempo no qual a velocidade máxima é atingida

t_{pH4,7} – tempo necessário para atingir o pH 4,7

t_{pH5,0} – Tempo necessário para atingir o pH 5,0

t_{pH5,5} – Tempo necessário para atingir o pH 5,5

UFC – Unidade Formadora de Colônia

V_{max} – Velocidade de acidificação

I - INTRODUÇÃO

Diariamente os seres humanos são expostos a uma série de agentes oxidantes relacionados a um número cada vez maior de patologias (PINTO, 2008). A crescente conscientização dos consumidores quanto à relação entre a alimentação e a saúde, bem como a sua preferência em prevenir ao invés de curar doenças tem impulsionado o desenvolvimento de novos alimentos funcionais. Estes estão ganhando cada vez mais espaço no mercado, estimulados pela procura dos consumidores que buscam alimentos capazes de auxiliarem na manutenção da saúde e de exercerem benefícios além da nutrição básica (OLIVEIRA *et al.*, 2002; SIRÓ *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2013; FERNANDES, 2013; SIMEONI *et al.*, 2014).

Dentre esse mercado de alimentos funcionais, os alimentos que contenham bactérias probióticas incorporados às suas formulações, estão recebendo grande destaque na indústria alimentícia (SIMEONI *et al.*, 2014). Da mesma forma, o acréscimo de ingredientes prebióticos na formulação de novos produtos, juntamente ou não com a adição de probióticos, tem sido muito incentivado diante dos benefícios potenciais a saúde do consumidor, que são relatados por vários autores (OLIVEIRA *et al.*, 2002; MOROTI *et al.*, 2008; SIRÓ *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2011; SLAVIN, 2013).

Alimentos ou formulações nutricionais que contenham tanto probióticos quanto prebióticos são tidos como simbióticos, uma vez que o prebiótico empregado estimule seletivamente o probiótico presente no produto (KOLIDA E GIBSON, 2011). Essas formulações diferenciadas atendem à demanda das pessoas que buscam a manutenção da saúde e do bem-estar, podendo auxiliar no tratamento de enfermidades como infecção, redução da atividade imunológica, alterações no trato-gastrointestinal como na síndrome do intestino curto (DOUGLAS E SANDERS, 2008).

Os derivados lácteos correspondem a grande parte dos produtos probióticos presentes no mercado mundial de alimentos funcionais, apresentando uma grande aceitabilidade e imensa popularidade (SIMEONI *et al.*, 2014). Os benefícios de produtos lácteos simbióticos, como iogurtes e bebidas lácteas, podem ainda ser ampliados com a adição de polpas de frutas vermelhas que, além do acréscimo nutricional, possuem reconhecidos benefícios a saúde como fontes de compostos bioativos que estão presentes tanto nas frutas como em seus

derivados, e da suplementação com aminoácidos essenciais os quais não são produzidos pelo organismo e são obtidos unicamente através da dieta (SOUZA, 2013).

II - REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Bebidas lácteas

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea (ANVISA, 2005), “bebida láctea é o produto lácteo resultante da mistura do leite (*in natura*, pasteurizado, esterilizado, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado e em pó) adicionado ou não de produto(s) ou substância(s) alimentícia(s), gordura vegetal, leite(s) fermentado(s), fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos”.

“A bebida láctea fermentada é o produto produzido mediante a ação de cultivo de microrganismos específicos e/ou adicionado de leite(s) fermentado(s) e que não pode ser submetido a tratamento térmico após a fermentação”. Nesta categoria, a contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g, no produto final, para o(s) cultivo(s) láctico(s) específico(s) empregado(s), durante todo o prazo de validade (ANVISA, 2002).

A tecnologia de fabricação de bebidas lácteas fermentadas envolve a mistura de iogurte e soro de leite, em proporções adequadas, podendo ter a adição de polpa de fruta e outros aditivos permitidos. O produto final deve conter bactérias lácticas viáveis e em número adequado. Devido a sua acidez, as bebidas lácteas fermentadas tendem a apresentar vida de prateleira mais longa que leites pasteurizados, mostrando-se semelhante a iogurtes e leites fermentados quando mantidas em temperatura de 5 a 10°C (OLIVEIRA, 2009, MARQUES, 2012).

A produção de leites fermentados no Brasil, especialmente de bebidas lácteas, vem crescendo significativamente e o futuro aponta para o desenvolvimento das bebidas funcionais, com a incorporação de microrganismos probióticos (PFLANZER *et al.*, 2010; SIQUEIRA *et al.*, 2013). Segundo Thamer e Penna (2006), esse aumento na produção e no desenvolvimento de bebidas lácteas está sendo impulsionado pela demanda crescente dos consumidores por alimentos funcionais.

As formulações de bebida láctea fermentadas possuem alto valor nutricional e com isso tem a vantagem de poderem ser oferecidas para complementar as necessidades nutricionais das pessoas em geral. Adicionalmente, ao agregar nutrientes bioativos a esses produtos, como compostos antioxidantes, viabiliza o seu consumo como forma de complementar uma alimentação inadequada (KEMPKA *et al.*, 2008).

Levando-se em consideração o grande número de formulações disponíveis que diferem com relação aos ingredientes e as concentrações utilizadas nos produtos, há uma preocupação cada vez maior em valorizar as características nutricionais, conveniência e praticidade do consumo de produtos lácteos (ANTUNES *et al.*, 2007; KEMPKA *et al.*, 2008). Particularmente, o consumo de bebidas lácteas fermentadas tem a atratividade das pessoas por serem mais fluídas e refrescantes que os iogurtes, podendo ser consumidas geladas e apresentando um sabor suave e agradável ao paladar (OLIVEIRA, 2009).

A utilização do soro do leite na elaboração de bebidas lácteas, além das características nutricionais, confere propriedades tecnológicas desejáveis além de melhorar a relação custo/benefício para o produto (KEMPKA *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2013). Segundo Peregrine e Carrasqueira (2008), o soro do leite apresenta de 4 a 6 gramas de proteínas por litro que pode exercer vários efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular graças às suas propriedades redutoras (cisteína, estímulo à síntese de glutathione), sequestrantes de radicais livres (glutathione, lactoferrina, lactoperoxidase) que são também inibidores da lipoxidação das lipoproteínas e artérias. Essa combinação, de um alimento suplementado com proteínas e bactérias probióticas, pode gerar um produto com propriedades tecnológicas e funcionais que atendam as demandas por produtos saudáveis (COSTA *et al.*, 2013).

Pela legislação vigente, alimentos ou formulações nutricionais que contenham em sua composição probióticos ou prebióticos são considerados alimentos funcionais. Ainda dentro desse contexto, aqueles alimentos ou formulações nutricionais que contenham os dois componentes são tidos como simbióticos, uma vez que o prebiótico empregado estimule seletivamente o probiótico presente no produto. Essas formulações diferenciadas atendem as pessoas que buscam a manutenção da saúde e do bem-estar e as que buscam auxiliar no tratamento de enfermidades como infecção, redução da atividade imunológica, alterações no trato-gastrointestinal como na síndrome do intestino curto (DOUGLAS E SANDERS, 2008).

2.2. Probióticos

“Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem uma série de benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002). Quando consumidos, os probióticos agem no trato gastrointestinal do hospedeiro exercendo influência considerável sobre uma série de reações bioquímicas do mesmo, causando benefícios como o alívio à intolerância à lactose, o equilíbrio da microbiota intestinal, a melhora da imunidade, além de efeito hipocolesterolêmico e anticarcinogênico (OLIVEIRA, 2002; OLIVEIRA, 2007; VASILJEVIC E SHAH, 2008; SOUZA, 2010; RAIZEL, 2012).

Para que uma bactéria seja considerada probiótica ela deve corresponder a uma série de critérios preferenciais, como o gênero ao qual ela pertence, ser de origem humana, apresentar alta estabilidade frente ao ácido e à bile, ter a capacidade de aderir à mucosa intestinal, capacidade de colonizar o trato gastrointestinal humano, capacidade de produzir compostos antimicrobianos e ser metabolicamente ativa no intestino (OLIVEIRA, 2002).

Dentre os gêneros que integram os probióticos o *Bifidobacterium* e o *Lactobacillus* apresentam grande destaque, em especial as espécies *B. bifidum* e *L. acidophilus*. Essas espécies são comumente utilizadas em suplementações probióticas em alimentos e, como mostram diversos estudos, habitam todas as porções do trato gastrointestinal humano saudável (MOROTI *et al.*, 2009).

O *Lactobacillus acidophilus* é uma das espécies mais utilizadas para o desenvolvimento de produtos probióticos tanto pelo seu efeito terapêutico quanto pelo seu perfil de baixa pós-acidificação do produto sob armazenamento refrigerado, ambos aspectos interessantes para a indústria (ZACARCHENCO e MASSAGUER-ROIG, 2004, DIAS, 2012). Os efeitos terapêuticos atribuídos ao *L. acidophilus* incluem a melhora na digestão da lactose para pessoa que possuem intolerância, a redução da constipação e da diarreia infantil, melhora na resistência contra infecções causadas por salmonela, a prevenção da “diarreia do viajante” e o alívio dos sintomas da síndrome do intestino irritável (DIAS, 2012).

Os probióticos são considerados ingredientes funcionais ao serem adicionados em formulações de alimentos, como nos leites fermentados. Na sua funcionalidade, favorecem a presença de bactérias benéficas ao organismo, e em contrapartida, diminuem a concentração de bactérias e micro-organismos indesejáveis (FULLER, 1991). Como resultado, os produtos contendo probióticos na sua formulação estão ganhando popularidade e aceitação no mundo

inteiro, em especial pelos consumidores que buscam alimentos que forneçam algum tipo de benefício à saúde além da nutrição. (CRUZ, FARIA e VAN DENDER, 2007; SIRO *et al.*, 2008; MOROTI *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Diversos estudos publicados descrevem a acidificação de bactérias probióticas em leite (OLIVEIRA *et al.*, 2001; DONKOR *et al.*, 2006; DAMIN *et al.*, 2008). Porém, existem poucos dados na literatura, até o presente, sobre o perfil de acidificação de bactérias probióticas em soro e na mistura leite-soro. Portanto, a modelagem do efeito do teor de sólidos totais e do valor de pH de término da fermentação sobre a cinética de acidificação, pós-acidificação e contagem de bactérias probióticas é indispensável. Adicionalmente, a fermentação da mistura leite-soro por bactérias do iogurte e pelas probióticas pode facilitar a tecnologia de fabricação de bebidas lácteas (ALMEIDA, TAMIME e OLIVEIRA, 2009).

A preparação de bebidas lácteas funcionais de baixo custo, com boas características físico-químicas e sensoriais e com a adição de bactérias probióticas viáveis, é passível de ser obtida. O desenvolvimento deste produto tem importante alcance nutricional e econômico. Enfim, o conhecimento da vida-de-prateleira de bebidas lácteas contendo probióticos e dos efeitos que a afetam é relevante, pois existem indicativos que vários fatores, dentre os quais o teor de sólidos e o valor de pH do produto, afetam a viabilidade das bactérias probióticas em bebidas lácteas (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

2.3. Prebióticos

Os prebióticos são substâncias indigeríveis que não sofrem hidrólise enzimática no sistema digestório e chegam ao colón intactos para serem degradados pela flora bacteriana (ROBERFROID *et al.*, 2010). Devido a sua estrutura, os prebióticos são fermentados no cólon por bactérias endógenas para substratos metabólicos e energéticos e, promovem melhoria das funções intestinais por meio do estímulo ao crescimento de bactérias benéficas, resultando em efeitos específicos sobre a fisiologia gastrointestinal, biodisponibilidade de minerais, sistema imune, gênese de tumores e regulação do colesterol sérico (DOUGLAS E SANDERS., 2008).

Comparados com os probióticos, que introduzem bactérias exógenas para o lúmen, os prebióticos estimulam o crescimento preferencial de um número limitado de bactérias, especialmente *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. De todos os prebióticos disponíveis, os

frutooligosacarídeos (FOS) e a inulina possuem maior destaque na elaboração de produtos prebióticos devido os seus comprovados benefícios como componentes ativos de alimentos funcionais (ROBERFROID, 2007; DOUGLAS E SANDERS, 2008; LEMOS, 2012). No entanto, segundo Patel e Goyal (2012), os prebióticos manitol, maltodextrina, rafinose, lactulose e sorbitol também possuem benefícios comprovados para a saúde humana.

A inulina é uma fibra alimentar, pertencente ao grupo dos frutooligosacarídeos, encontrada em uma grande variedade de hortaliças, principalmente na raiz de chicória (*Cichorium intybus L.*) e na alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus*) (SILVA, 2010). O uso da inulina como prebiótico está relacionado com os efeitos benéficos que o seu consumo proporciona a proliferação seletiva das bifidobactérias e, em alguns casos, lactobacilos, o que contribui para uma significativa mudança na microbiota do intestino (ROBERFROID, 2010).

Segundo Silva (2010), a inulina não acrescenta sabor ao alimento, tornado possível o seu uso em formulações com alto teor de fibras sem grandes alterações da aparência e do sabor do alimento.

A inulina e outros compostos tidos como fibras solúveis têm gerado um interesse considerável por causa do seu potencial efeito de moderar a taxa de glicose pós-prandial e a capacidade de afetar o metabolismo dos carboidratos e dos lipídeos. A fibra solúvel, formadora de gel no trato gastrointestinal, acrescida a uma solução de glicose ou misturada aos alimentos reduz o esperado aumento da glicemia e concentração de insulina em pessoas saudáveis e com diabetes tipo 2 (ROBERFROID *et al.*, 2010).

2.4. Frutas vermelhas e ácido elágico

Diversos estudos mostram a importância de uma dieta rica em frutas e a adição destas aos alimentos pode contribuir para a melhora do seu valor nutricional e apresentar benefícios à saúde do consumidor (HASSIMOTTO *et al.*, 2008; MORENO *et al.* 2009; MURPHY *et al.*, 2012).

O ser humano naturalmente se expõe a uma quantidade elevada de agentes oxidantes que podem contribuir para o aumento no número de patologias (Pinto, 2008). O consumo elevado de frutas é comumente relacionado aos seus efeitos benéfico a saúde humana através dos seus fito-nutrientes dentre outros compostos bioativos que podem atuar na neutralização

desses agentes oxidantes ajudando a diminuir a incidência de doenças crônicas (PINTO, 2008; MURPHY *et al.*, 2012, SIQUEIRA *et al.* 2013).

As frutas vermelhas, como morango, framboesa e pitanga, têm atraído a atenção de vários estudos por serem fontes de compostos bioativos e por terem o seu consumo cada vez mais sido associado com benefícios a saúde, sendo ainda consideradas a fonte de maior importância de compostos fenólicos dentro da dieta humana (LIMA *et al.*, 2002; SAMEC, 2011; SERRA *et al.*, 2011; KUBOTA *et al.*, 2012; SOUZA, 2013).

Dentre os compostos bioativos presentes nas frutas vermelhas, entre outros, tem havido um crescente interesse científico em ácido elágico e elagitaninos, devido às suas poderosas propriedades antioxidantes, atividades biológicas benéficas e seus efeitos quimiopreventivos, mostrando-se eficaz na inibição do desenvolvimento de câncer no esôfago, fígado e de pulmão em animais (HANNUM, 2004; PINTO, 2008). Segundo Labrecque *et al.* (2005), o ácido elágico exerce efeito anticarcinogênico e antimutagênico causando apoptose em células cancerígenas, impedindo a ligação de carcinogênicos ao DNA e evitando a proliferação de tumores ao inibir proteínas fundamentais para a sua formação.

O ácido elágico está presente em quantidades mais elevadas em frutas, na sua maioria vermelhas, como em morangos, framboesas, romãs, amoras e uvas, podendo ter o seu teor preservado em sucos, geleias, compotas e outros alimentos a base de frutas (VATTEM E SHETTY, 2005; ABE, LAJOLO E GENOVESE, 2010; KOMORSKY-LOVRIC E NOVAK, 2011). Nas frutas, o ácido elágico está presente em sua forma livre, como um glicosídeo, ou na forma de elagitaninos, que são ésteres de glicose e ácido elágico que ao sofrerem uma hidrólise ácida produzem ácido elágico na sua forma livre (VATTEM E SHETTY, 2005, MORENO *et al.* 2009).

Quando exposta a ácidos ou bases as ligações de éster são hidrolisadas e o ácido hexahydroxydiphenico rearranja-se espontaneamente em ácido elágico insolúvel em água. Esta reação é a base para a detecção e quantificação de ácido elágico em alimentos (BATE-SMITH, 1972).

Pinto *et al.* (2010) relataram os níveis de ácido elágico em sete variedades de morangos cultivadas no Brasil e em compotas de morango. Os autores também avaliaram os potenciais benefícios para a saúde de elagitaninos purificados a partir de morangos em relação

a atividade antiproliferativa e inibição *in vitro* da α -amilase, mostrando relevância para a gestão de um potencial de hiperglicemia e hipertensão.

O teor de ácido elágico em frutos nativos do Brasil e em nozes é relatado por Abe, Lajolo e Genovese (2010). Os autores enfatizam a importância do consumo de jabuticaba como fonte dietética de ácido elágico.

Cordenunsi *et al.* (2005) observaram em seu estudo sobre o efeito da temperatura de armazenamento na composição química e atividade antioxidante de três cultivares de morangos, que os teores de fenólicos totais e ácido elágico livre se mantiveram estáveis nas frutas. Resultados semelhantes foram observados por Panichayupakaranant *et al.* (2010), que em seu estudo verificaram a estabilidade do ácido elágico extraído do extrato da casca da romã frente a alterações de pH, temperatura e incidência de luz, relatando que o ácido é estável a temperaturas entre 4°C e 30°C, pelo menos durante o período de 4 meses.

No entanto, se mostra necessário o estudo do comportamento do ácido elágico em derivados lácteos fermentados com adição de polpa de frutas, pois, permitirá verificar se o ácido se mantém estável durante o armazenamento do produto, proporcionando os benefícios associados a ele durante toda a vida de prateleira do mesmo.

2.5. Triptofano

O enriquecimento do leite com peptídeos e/ou aminoácidos favorece a fermentação estimulando o desenvolvimento de algumas bactérias uma vez que o crescimento de probióticos em leite é lento (OLIVEIRA *et al.*, 2001). Adicionalmente, foi demonstrado que o acréscimo de peptídeos e aminoácidos contribui com o aumento da viabilidade dos micro-organismos na elaboração de produtos lácteos probióticos durante a fermentação (DOUGLAS E SANDERS, 2008; SHOBHARANI E AGRAWAL, 2009). No entanto, não há evidências na literatura sobre o efeito que um aminoácido pode exercer na viabilidade da bactéria ou nos parâmetros físico-químicos de produtos lácteos quando adicionado após a fermentação.

O triptofano é um aminoácido essencial para o organismo dos animais e humanos. Ele está presente naturalmente em alimentos proteicos e pode ser prescrito como suplemento nutricional (ZAPPELLINI, 2002; BRIOSCHI *et al.*, 2009).

O triptofano está envolvido com a síntese do neurotransmissor serotonina, é regulador de hormônios, como na musculatura lisa do trato gastrointestinal humano, sendo regulado pelos nutrientes disponíveis na ingestão alimentar. Também são responsáveis pelas ligações covalentes mediadoras entre substâncias orgânicas e nutrientes fornecidos pela dieta em decorrência de trocas potencialmente elétricas entre as diferentes estruturas químicas, chamadas interações. Baixos níveis de serotonina estão relacionados a quadros de depressão, ansiedade, distúrbios alimentares e hipersensibilidade a dor (MORENO *et al.*, 2006; BRIOSCHI *et al.*, 2009; MARTINS, 2012).

III - OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é investigar o comportamento do ácido elágico em bebidas lácteas simbióticas suplementadas com L-triptofano e polpa de frutas vermelhas durante armazenamento refrigerado.

Objetivos específicos

- Desenvolver formulações de bebidas lácteas fermentadas simbióticas suplementadas com L-triptofano e polpa de frutas vermelhas caracterizadas de formulações controle e experimental, por meio das condições de formulação e processamento do produto;
- Avaliar as características físico-químicas, microbiológicas e de microestrutura das formulações desenvolvidas a fim de estimar as características dos produtos e sua estabilidade durante o armazenamento refrigerado;
- Determinar nas formulações desenvolvidas a quantidade de compostos bioativos – compostos do ácido elágico, e estimar pelo método de superfície de resposta a mistura de frutas vermelhas que resulte em maior teor de ácido elágico nas bebidas lácteas simbióticas.

IV - MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Ingredientes

Para a formulação das bebidas lácteas foram utilizados os seguintes ingredientes: leite em pó desnatado Molico (Nestlé, São Paulo, Brasil), soro de leite fresco (obtido através da produção de queijo minas frescal), culturas bacterianas para inoculação direta, inulina, sacarose, sucralose, acessulfame K, maltodextrina e triptofano isolado. As seguintes polpas de frutas foram utilizadas: polpa de morango (DeMarchi, Campinas, Brasil), polpa de framboesa (DeMarchi, Campinas, Brasil), e polpa de pitanga (DeMarchi, Campinas, Brasil). Todos os ingredientes foram adquiridos no comércio em São Paulo em centros de aquisição de matéria-prima atacadista provenientes de indústrias fornecedoras.

4.1.2. Culturas microbianas

As seguintes culturas liofilizadas para inoculação direta foram empregadas:

- TA040, *Streptococcus thermophilus*, DuPont, França;
- LB340, *Lactobacillus bulgaricus*, DuPont, França;
- L104, *Lactobacillus acidophilus*, DuPont, França.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Preparação da matriz fermentada

Preparo da base láctea

A fim de preparar a base láctea pesou-se 1.430 gramas de leite que foram diluídos em 11 litros de água filtrada, homogeneizados e pasteurizados em banho aquecido em autoclave por 20 minutos a temperatura de 65 °C. Em seguida, estes foram resfriados em banho de gelo até atingir a temperatura de 10°C e, acondicionados em câmara fria a 4°C por 24 horas antes da utilização. As bases lácteas foram preparadas segundo as Boas Práticas de Fabricação de

Alimentos nos Laboratórios do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da FCF/USP.

Preparação do inóculo

Inicialmente, 13 g de leite em pó desnatado Molico (Nestlé, São Paulo, Brasil) foram dissolvidas em 100 g de água destilada e a suspensão foi autoclavada em seguida a 121°C por 15 minutos.

Foram preparadas três pré-culturas distintas com *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus* adicionando-se 90,0 mg, 400,0 mg e 100,0 mg de cultura pura, respectivamente, em shots contendo de leite autoclavada. Estas quantidades foram suficientes para que os valores das contagens, em média, nas diferentes pré-culturas fossem de ~6,0 logUFC/mL em 50 mL de leite.

Fermentação

Após a homogeneização e ativação a 42°C por 30 minutos, 20 mL de cada uma das três pré-culturas foram adicionadas à dois recipientes contendo 5,5 litros de base láctea pré-aquecidas também a 42°C. A seguir, duas amostras de 500 mL foram retiradas de cada recipiente e transferidas para frascos estéreis que, em seguida, foram colocados em banho-maria pré-aquecido à temperatura de 42°C e, acoplados ao sistema CINAC - *Cinétique d'acidification* (Ysebaert, Frépillon, França). O valor de pH inicial foi medido e a seguir, a fermentação foi monitorada até valor de pH 4,7 através do sistema CINAC o qual permite a medição contínua e gravação do valor de pH computando a taxa de acidificação durante o período da fermentação. Simultaneamente, os baldes foram encubados em estufa B.O.D. (modelo 247 CD, São Paulo) a 42°C, onde periodicamente eram controladas a temperatura e o valor pH para acompanhamento da fermentação até atingir o pH desejado.

Quando a fermentação atingiu pH 4,7, esta foi interrompida manualmente e, após o banho de gelo, a quebra do coágulo foi realizada com o auxílio de um bastão de aço inoxidável com disco perfurado movimentando-se o bastão para cima e para baixo por 60 segundos. As bases fermentadas foram rapidamente estocadas a 4°C.

A partir dos dados obtidos através do sistema CINAC foram calculadas as velocidades máximas de acidificação (dpH/dt) expressa como miliunidades de pH/min (Vmax). No final do período de incubação foram ainda calculados os seguintes parâmetros cinéticos: (i) tpH5,5:

tempo para atingir o pH 5,5 (h); (ii) tpH5,0: tempo para atingir o pH 5,0 (h); (iii) tpH4,7: tempo para atingir o pH 4,7 (h); (iv) tmax: tempo no qual se atinge a velocidade máxima (Vmax); (v) pHvmax: pH do leite quando a velocidade máxima foi atingida; A fermentação foi realizada em um total de 8 repetições, caracterizando fermentações independentes para as diferentes matrizes de ensaios pertencentes ao delineamento experimental proposto.

4.2.2. Elaboração do preparado de frutas vermelhas

O preparado de frutas foi formulado através de ensaios preliminares com diferentes proporções dos seguintes ingredientes: inulina (Siba Ingredientes, São Paulo, Brasil), sacarose (União, Brasil), sucralose (Linea, Anápolis, Brasil), acessulfame K e maltodextrina (Globalfood, São Paulo, Brasil).

Inicialmente foram pesados os edulcorantes e os demais ingredientes secos em balança semi-analítica (Quimis, São Paulo, Brasil). Em seguida, os ingredientes secos, exceto inulina, foram homogeneizados manualmente, transferidos para equipamento Thermomix (Vorwerk & Co. KG, TM31, Wuppertal, Alemanha) e acrescidos das polpas de frutas, em diferentes proporções. Ao todo, foram elaborados sete preparados de frutas, cujas proporções de frutas se dividiam em: (i) três preparados com a polpa pura (100%), morango framboesa e pitanga, (ii) três preparados com a mistura binária entre as polpas de fruta (50-50%) e (iii) um preparado com a mistura ternária das frutas (33-33-33%).

A inulina hidratada foi adicionada ao preparado de frutas por último, sob agitação moderada por cerca de 10 minutos. Por fim, e no mesmo equipamento, foi feita a pasteurização da polpa de frutas que consistiu na continuidade da agitação moderada a uma temperatura de 80°C por 20 minutos, seguida de resfriamento em banho de gelo e estocagem a 4°C por 24 horas antes da utilização.

4.2.3. Desenho experimental e preparação das bebidas lácteas

As variáveis estudadas foram: (i) composição do preparado de frutas vermelhas de acordo com o delineamento experimental proposto por HARE (1974) apresentado na Tabela 1 e, (ii) a suplementação ou não com L-triptofano.

Desse modo, a formulação dos produtos correspondente às bebidas lácteas sem (ME1) e com L-triptofano (ME2) foi feita pela combinação da base láctea (40%), soro de leite (40%) e preparado de frutas vermelhas (20%) sem suplementação ou suplementada com L-triptofano, respectivamente. Os produtos finais correspondem a bebidas lácteas simbióticas.

O desenho experimental mostrado nas matrizes de ensaios contemplaram sete experimentos sendo três com as polpas de frutas vermelhas (morango, framboesa e pitanga) puras, dois correspondentes a misturas binárias e um a uma mistura ternária. Em paralelo aos sete experimentos delineados em cada matriz de ensaio foi realizado um ensaio controle isento de polpa de frutas. As duas matrizes de ensaio foram executadas em dois períodos distintos.

Foram preparados 16 produtos com formulações distintas divididos em dois grupos, de acordo com a adição ou não de L-triptofano, dentre os quais duas formulações sem adição de preparado de frutas vermelhas foram usadas como controle (Tabela 1). Após a fabricação, os produtos foram envasados manualmente em garrafas plásticas de 100 mL, cujas tampas foram lacradas e armazenadas a 4°C durante 21 dias. Os experimentos foram feitos em duplicata em dias diferentes.

O leite e o soro foram analisados quanto a sua composição centesimal (sólidos totais, gordura e proteína). A cinética de acidificação durante a fermentação foi seguida e os parâmetros de acidificação calculados. Após 36h (d2) da preparação e vinte e um dias (d21) de armazenamento dos produtos a 4°C, foram ainda avaliados a evolução do valor de pH, o número de bactérias iniciadoras e probióticas viáveis, os atributos de cor (luminosidade, vermelho, amarelo, croma e h), os parâmetros reológicos (índice de comportamento de fluxo, índice de consistência e viscosidade aparente) e a identificação de ácido elágico e sua otimização através da metodologia de superfície de resposta foi realizada. Finalmente, a microestrutura de algumas bebidas lácteas foi determinada.

Tabela 1. Delineamento experimental tipo simplex centróide para estudo da quantificação de ácido elágico em bebidas lácteas simbióticas suplementadas com triptofano contendo frutas vermelhas

Matriz Ensaio	Produtos	Bebida Láctea	Matriz Láctea (80%)		Triptofano	Preparado de fruta (20%)		
		Ensaio	Leite (%)	Soro (%)	(mg)	Variáveis codificadas		
						Polpa de frutas		
						x_1	x_2	x_3
Matriz Ensaios 1	1	Controle	50	50	0	---	---	---
	2	BL1	50	50	0	1,000	0,000	0,000
	3	BL2	50	50	0	0,000	1,000	0,000
	4	BL3	50	50	0	0,000	0,000	1,000
	5	BL4	50	50	0	0,500	0,500	0,000
	6	BL5	50	50	0	0,500	0,000	0,500
	7	BL6	50	50	0	0,000	0,500	0,500
	8	BL7	50	50	0	0,333	0,333	0,333
Matriz Ensaios 2	9	Controle*	50	50	500	---	---	---
	10	BL1*	50	50	500	1,000	0,000	0,000
	11	BL2*	50	50	500	0,000	1,000	0,000
	12	BL3*	50	50	500	0,000	0,000	1,000
	13	BL4*	50	50	500	0,500	0,500	0,000
	14	BL5*	50	50	500	0,500	0,000	0,500
	15	BL6*	50	50	500	0,000	0,500	0,500
	16	BL7*	50	50	500	0,333	0,333	0,333

x_1 : polpa de morango; x_2 : polpa de framboesa; x_3 : polpa de pitanga.

BL: Bebida Láctea

Aos resultados das respostas analíticas do teor de ácido elágico foram testados três modelos de regressão (linear, quadrática e cúbico especial) aplicados à misturas. A adequação dos modelos aos resultados experimentais foi avaliada em relação à falta de ajuste, à análise

de variância e à comparação entre os valores estimados e observados numa mistura selecionada. Quando a avaliação da falta de ajuste do modelo linear foi significativa ($P \leq 0,05$), buscou-se um modelo mais complexo como o quadrático ou cúbico especial (BARROS NETO *et al.*, 1995). Os coeficientes dos modelos foram calculados por regressão múltipla, a análise de variância (ANOVA), assim como os diagramas triangulares (representação gráfica das curvas de nível), foi calculada com auxílio do programa Statistica versão 11.0, Tulsa, USA.

4.2.4. Enumeração de bactérias viáveis

Amostras das bebidas lácteas (1 mL) foram homogeneizadas com 9 mL de água peptonada 0,1% p/v durante 1 min em um agitador de tubos e, em seguida, foram feitas diluições seriadas utilizando-se o mesmo diluente e inoculações em meios seletivos. As bactérias lácteas *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* foram enumeradas em ágar M17 e em MRS - pH 5,4 respectivamente. Os meios citados foram preparados de acordo com recomendações de Saccaro *et al.* (2011). *L. acidophilus* foi enumerado em meio seletivo ágar MRS adicionado de clindamicina após incubação a 37°C por 72h em jarra de anaerobiose de acordo com a metodologia descrita por Dave e Shah (1996) e Saccaro *et al.* (2011). As condições de anaerobiose foram estabelecidas usando-se AnaeroGen (Oxoid, Basingstoke). Placas contendo de 30 a 300 colônias foram escolhidas para serem enumeradas e as unidades formadoras de colônias por mL de produto (UFC/mL) foram calculadas. A seletividade dos meios de cultura foi confirmada por observação microscópica da aparência das células nas colônias.

4.2.5. Análises físico-químicas

Determinação do pH

Os valores de pH foram determinados em potenciômetro digital (Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Switzerland), devidamente calibrado com soluções tampão de pH 7,0 e 4,0 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

Composição centesimal

Foram determinados o sólidos totais não gordurosos, proteína e gordura do leite e do soro em equipamento EkoMilk (EON Trading & Bulteh 2000, Stara Zagora, Bulgária) pelo método de análise por ultrassom.

4.2.6. Determinação instrumental da cor

As análises de cor foram realizadas em colorímetro Hunter Lab, modelo Color Quest XE (Reston, Virginia, Estados Unidos) e programa de análise de cor. Foram determinados atributos de luminosidade (L^*), vermelho (a^*) e amarelo (b^*) usando escala CIELAB (ROSSO e MERCADANTE, 2007). Os valores de croma (c^*), definido pela parte da cor em que não há participação e o ângulo de tom (h), que representa a cor no espaço bidimensional, foram calculados pelas seguintes equações:

$$c^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

$$h = \tan^{-1} b^*/a^*$$

4.2.7. Propriedades reológicas

Os parâmetros reológicos das bebidas lácteas experimentais foram obtidos, em duplicata, a 5 e 25°C, ciclos ascendentes e descendentes usando-se um reômetro de cone e placa, modelo RVDV III, marca Brookfield (Stoughton, USA). Foram utilizadas rotações de 10 a 250 rpm, com acréscimos de 10 rpm a cada 30 segundos, 5,0 mL de amostra e cilindro CP 40. A descrição do comportamento reológico foi realizada utilizando-se o modelo reológico de Ostwald-de Waele ($\tau = k \dot{\gamma}^n$), através do programa computacional Excel conforme estudado por (BENEZECH E MAINGONNAT, 1994). Para a medida da viscosidade aparente, aos dados experimentais determinados foi adotado o valor da rotação a 60 rpm conforme descrito por (SHAKER, JUMAH E ABUJDAYIL, 2000). Os resultados foram expressos em mPa.sⁿ.

4.2.8. Extração, hidrólise e determinação do teor de ácido elágico

Para a determinação do ácido elágico livre e total, foi utilizado o método de Pinto *et al.* (2008) em amostras de polpas de fruta e as bebidas lácteas simbióticas foram liofilizadas em equipamento modelo Edwards L4KR 118 (BOC Edwards, Brasil) previamente à análise.

Inicialmente, procedeu-se a extração das amostras em acetona 80% em uma proporção de 4 g da amostra para 90 mL de acetona e com o uso do Ultra-Turrax (Marconi, M102, Brasil). A amostra foi agitada no Ultra-turrax em banho de gelo, com 30 mL de acetona 80% por 1 minuto em velocidade 3, sendo esse procedimento realizado por mais três vezes com um intervalo de 5 minutos entre cada agitação. Os extratos obtidos foram filtrados utilizando-se papel filtro Whatman nº 6 e o resíduo foi submetido à extração por mais 2 vezes nas mesmas condições, até a obtenção de volume final de 60 mL.

A seguir, realizou-se a etapa de hidrólise, concentrando-se o extrato filtrado em rotaevaporador (Fusatom, 802, Brasil) até cerca de 20 mL. Feito isto, adicionou-se ao filtrado concentrado 20 mL de ácido trifluoracético 2 N e a mistura foi encaminhada para secagem também no rotaevaporador a 120°C por 90 minutos. Posteriormente, foram adicionados 20 mL de álcool butílico terciário à amostra hidrolisada e esta retornou ao rotaevaporador para secagem. Após secagem completa a amostra foi suspensa novamente em 10 mL de metanol e filtrada em microtubos utilizando filtros de polietileno com membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,22 µm de poro (Millipore Ltd., Bedford, EUA).

A quantificação do teor de ácido elágico foi realizada por HPLC usando auto-injetor SIL 20AC (Shimadzu, Tokyo, Japão) e coluna de permuta de cátions (Phenomenex G C-18 de 250x4.6 mm – 5µm), a 40 ° C. A fase móvel foi composta de solvente A (H₂O-0,1% ácido fórmico) e solvente B (ACN 0,1% ácido fórmico) e a taxa de fluxo foi de 1.0 mL/min (bomba LC-20AD). Os compostos foram detectados em detector SPD-20A (Shimadzu, Tokyo, Japão) em $\lambda = 254$ nm e, os resultados foram analisados usando o software acoplado ao sistema.

As concentrações de ácido elágico foram determinadas a partir da área do pico por equação de regressão exponencial obtida a partir da curva de calibração preparada com padrões de ácido elágico (Sigma E2250 CAS Number 476-66-4) nas concentrações de 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 e 10,0 µg/mL. A curva de calibração foi exponencial ($R^2 = 0,9944$) ao longo da gama de concentração 0,5 e 10,0 µg/mL. O cromatograma e a curva padrão podem ser vistos respectivamente nas Figuras 1 e 2. Cada medição do teor de ácido elágico foi expressa em µg/mL como uma média de duas repetições. As análises foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da USP.

Figura 1. Cromatograma típico do ácido elágico (Coluna: Phenomenex G C-18 (250x4.6 mm – 5µm; temp. forno: 40°C; solvente A: H₂O-0,1% ácido fórmico; solvente B: ACN 0,1% ácido fórmico fluxo: 1.0 mL/min).

Figura 2. Curva padrão de ácido elágico.

4.2.9. Microscopia eletrônica de varredura - MEV

Amostras referentes ao ensaio 1 (adicionado de polpa de morango), 7 (adicionado com a mistura das três polpas de frutas) e ao controle (sem adição de polpa de fruta) das bebidas lácteas de cada matriz experimental (ME1 e ME2) foram liofilizadas após 24 horas de armazenamento em -80°C com o uso do equipamento modelo Edwards L4KR 118 (BOC Edwards, Brasil). As amostras liofilizadas foram fixadas com solução de 25% de glutaraldeído diluído em tampão fosfato de sódio (1:19) por 24 horas de acordo com o método

adaptado de Oliveira *et al.* (2002). Posteriormente, as amostras foram submetidas à desidratação graduada em álcool (50, 60, 70, 80, 90 e 95%), seguida por desidratação três vezes em álcool anidro. Após a desidratação, as amostras foram direcionadas à secagem pelo método do ponto crítico sob CO₂ com meio LBA-TEC CPD 030 aparelhos (Liechtenstein, Alemanha).

As amostras foram então colocadas em *stubs* cobertos com fita de cobre dupla-face e receberam um revestimento de ouro final, realizado através de dispersão catódica das amostras em Balzers Union SCD 040 (Liechtenstein, Alemanha). A observação e microfotografias das amostras foram feitas em diferentes campos de emissão no microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JEOL modelo JSM-7401-F, JEOL Ltd., Japão), que operam com tensão de 1.0-10.0kV. As imagens foram registradas sob ampliações de 5.000 kV e foram observados em seis campos. A microscopia eletrônica de varredura foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

4.2.10. Análises Estatísticas

As amostras foram analisadas em duplicata após dois (d2) e vinte e um (d21) dias de armazenamento a 4°C. Análise de variância multifatorial e testes de comparação de média foram aplicados usando o programa Statistica 11.0 (Statsoft, Tulsa, USA) a fim de determinar a significância estatística da diferença entre as médias. As médias foram comparadas através do teste de Newman Keuls usando $P \leq 0,05$.

Uma correlação multivariada de análise de Pearson foi realizada e a verificação da distribuição de normalidade dos dados foi considerada. Para todos os ensaios, foi considerado o nível de significância estatística de 95 %. A estimativa do valor dos coeficientes de todas as regressões foi obtida pelo método dos mínimos quadrados, para todos os ensaios relacionados à otimização das condições entre o preparado das polpas das frutas e a base láctea simbiótica. A adequação dos modelos propostos foi avaliada pela análise do resíduo, comparando-se a proporção da variação que é explicada pelo modelo, isto é, pela análise do coeficiente de determinação R². Os cálculos e figuras foram elaborados utilizando-se o programa Statistica 11.0 (Statsoft, Tulsa, USA).

V - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Composição centesimal das bases lácteas

A composição do leite e do soro empregados no preparo das bebidas lácteas pode ser vista na Tabela 2.

Tabela 2. Composição do leite e do soro empregados no preparo dos produtos lácteos.

Componente	Leite	Soro
Sólidos Totais (g.100g ⁻¹)	11,66 ± 0,84	1,70 ± 0,01
Proteína (g.100g ⁻¹)	4,33 ± 0,23	0,56 ± 0,04
Gordura (g.100g ⁻¹)	-	-

(-)Valores iguais a zero. N=8

O leite e o soro utilizados na elaboração das bebidas lácteas apresentaram poucas variações ($P \leq 0,05$) quanto ao teor de sólidos totais e proteína entre as matrizes estudadas por isso as médias dos resultados obtidos foram (Tabela 2). O teor de gordura do leite e do soro foi zero.

O leite utilizado para desenvolver as bebidas lácteas apresentou teores de sólidos totais e proteínas de $11,66 \pm 0,84$ e $4,33 \pm 0,23$ g.100g⁻¹ respectivamente, enquanto para o soro foram obtidos os resultados de $1,70 \pm 0,01$ e $0,56 \pm 0,04$ g.100g⁻¹ para as mesmas análises.

Os resultados encontrados por Cunha *et al.* (2008) em uma análise semelhante ao leite e ao soro que empregaram no desenvolvimento de leites fermentados e bebidas lácteas, se mostraram próximos aos obtidos nesse trabalho, apresentando o teor de 11,84% de sólidos totais e 3,14% de proteína no leite e 6,10% e 0,66% de proteína no soro, divergindo quanto aos sólidos totais do soro de leite, os quais foram encontrados no teor de 6,10%.

Os resultados obtidos sobre a composição do leite também são semelhantes aos observados por Marafon (2010) em seu estudo sobre a otimização das propriedades reológicas de iogurtes probióticos, cujo o leite utilizado apresentou teores de sólidos totais e proteínas iguais a 12,93 e 4,83 g.100g⁻¹ respectivamente.

A quantidade de proteína no leite, bem como o teor de sólidos totais, está relacionada não só a qualidade nutricional dessa matéria prima, mas também interfere de forma positiva na reologia de iogurtes e produtos lácteos, melhorando a sua consistência através do desenvolvimento das micelas de caseína no leite (MARAFON, 2010).

5.2. Cinética de acidificação

A curva de acidificação do leite por *Streptococcus thermophilus* (TA040), *Lactobacillus bulgaricus* (LB340) e *Lactobacillus acidophilus* (L104) em leite a 42°C até pH 4,7 para os delineamentos ME1 (bebida láctea) e ME2 (bebida láctea com triptofano) são apresentados na Figura 3. Os parâmetros cinéticos de acidificação das quatro matrizes são mostrados na Tabela 3.

Foi necessário o período de 3,25 horas para que a fermentação alcançasse o valor de pH 5,5 (TpH5,5) e 5,19 horas para que fosse concluída, chegando ao pH 4,7 (TpH4,7). Quanto ao valor de Vmax, correspondente a velocidade máxima de acidificação durante a fermentação, foi obtido o valor médio de 19,55 upH.min⁻¹.

Esses resultados estão de acordo com os obtidos nos trabalhos de Oliveira *et al.* (2001, 2002) e Santo (2012).

(a)

(b)

Figura 3. Perfil de acidificação de *Streptococcus thermophilus* (TA040), *Lactobacillus bulgaricus* (LB340) e *Lactobacillus acidophilus* (L104) em leite a 42°C até pH 4,7. (a) pH, (b) $\frac{dpH}{dt}$. Curva média de 8 repetições.

Tabela 3. Parâmetros cinéticos de acidificação de *Streptococcus thermophilus* (TA040), *Lactobacillus bulgaricus* (LB340) e *Lactobacillus acidophilus* (L104) em leite a 42°C até pH 4,7.

pH Inicial	TpH5,5 (h)	TpH5,0 (h)	TpH4,7 (h)	Vmax (upH.min ⁻¹)	Tvmax (h)	pHVmax
6,41±0,25	3,25±0,00	3,93±0,09	5,19±0,12	19,55±0,79	3,00±0,00	5,78±0,03

N=6

5.3. Evolução do pH durante o armazenamento

A evolução do valor de pH de bebidas lácteas fermentadas por *S. thermophilus* (St), *L. bulgaricus* (Lb) e *L. acidophilus* (La) após 36 h (d2) e 21 dias (d21) de armazenamento a 4°C é apresentada nas Figuras 4 e 5.

Houve uma diferença significativa no valor de pH tanto entre o controle e as bebidas lácteas sem adição de triptofano (Figura 4) quanto as bebidas lácteas entre si, podendo estar correlacionado com acidez de cada fruta utilizada. As bebidas lácteas que receberam a adição

do preparado de fruta com a mistura de framboesa e pitanga, obtiveram o menor valor de pH ao final do período analisado, sendo este de 4,13. No entanto, a bebida láctea adicionada da polpa de morango, apresentou o decréscimo mais acentuado entre d2 e d21, de 0,34 unidades de pH.

Embora as bebidas lácteas com adição de triptofano tenham apresentado decréscimos mais acentuados de pH entre 36 horas após a fermentação (d2) e ao final do período de armazenamento refrigerado (d21), os mesmos não foram significativos para a maioria das bebidas, com exceção da bebida adicionada da polpa de morango, que apresentou a maior variação do valor de pH, de 4,80 (d2) para 4,28 (d21), entre os períodos analisados (Figura 5).

O perfil de pós-acidificação é um parâmetro de controle importante para produtos lácteos fermentados, pois está relacionado não só as características físicas e sensoriais do produto, mas como também a viabilidade das bactérias presentes no mesmo. Produtos lácteos que apresentam alta taxa de acidificação ficam sujeitos a separações de fase e podem se tornar muito ácido ao paladar, diminuindo consideravelmente a aceitabilidade do produto pelo consumidor. Do mesmo modo, um pH muito baixo em produtos fermentados afeta diretamente a viabilidade das bactérias causando sua morte (OLIVEIRA *et al.*, 2002; THAMER E PENNA, 2006).

Segundo Oliveira *et al.* (2002), as variações de pH ao longo do período de estocagem que se apresentam menores que 0,12 são decréscimos não perceptíveis, ao mesmo tempo que as variações entre 0,14 e 0,32 correspondem a decréscimos perceptíveis. Em vista disso, pode se observar que os produtos contendo triptofano mostraram decréscimos perceptíveis no pH ao final dos 21 dias de armazenamento.

Em um estudo realizado por Zacarchenco e Massaguer-Roig (2004), onde foi avaliado o perfil de diferentes combinações de bactérias em leites fermentados, foi observado que o *L. acidophilus* tem uma capacidade reduzida de pós-acidificação em estocagem refrigerada. Em vista disso, o triptofano pode ter exercido efeito estimulante para essa pós-acidificação por parte do *L. acidophilus*.

Figura 4. Valores de pH obtidos por Tukey em bebidas lácteas fermentadas por após 36 h (d2) e 21 dias (d21) de armazenamento a 4°C. Médias (N=3) com letras diferentes são significativamente diferentes; $P \leq 0.05$. Matriz de Ensaio 1 (bebida láctea sem triptofano).

Figura 5. Valores de pH obtidos por Tukey em bebidas lácteas fermentadas após 36 h (d2) e 21 dias (d21) de armazenamento a 4°C. Médias (N=3) com letras diferentes são significativamente diferentes; $P \leq 0.05$. Matriz de Ensaio 2 (bebida láctea com triptofano).

5.4. Contagem de bactérias viáveis

A contagem de bactérias viáveis em bebidas lácteas fermentadas por *S. thermophilus* (St), *L. bulgaricus* (Lb) e *L. acidophilus* (La) após 36 h (d2) e 21 dias (d21) de armazenamento a 4°C é apresentada nas Figuras 6 (ME1 bebida lácteas) e 7 (ME2 bebida láctea com triptofano).

Foi observado diferença significativa nas contagens de *S. thermophilus* entre o controle e as demais bebidas lácteas também para as duas matrizes (Figura 6a e Figura 7a), apresentando viabilidade entre 10^8 e 10^9 UFC/mL. O *S. thermophilus* foi encontrado em maiores proporções e com maior estabilidade entre d2 e d21 em todas as matrizes de ensaio (ME1 e ME2) quando comparado as demais bactérias, isso mostra sua estabilidade em produtos lácteos durante o armazenamento refrigerado. Essa estabilidade também foi observada nos resultados obtidos por Ramos *et al.* (2013) em seu estudo sobre bebidas lácteas fermentadas com *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *B. bifidum*.

As bebidas lácteas sem a adição de triptofano (ME1) apresentaram melhor viabilidade do *L. bulgaricus*, entre 10^7 e 10^8 UFC/mL, quando comparada com as bebidas adicionadas de triptofano (ME2), quantidade inferior a 10^7 UFC/mL. Essa diferença entre as duas matrizes pode estar relacionada ao maior pós-acidificação das bebidas pertencentes a ME2, uma vez que um pH mais baixo, observado nesses produtos, pode afetar a viabilidade das bactérias presentes no produto, como o *L. bulgaricus* (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Os resultados são semelhantes aos observados por Bueno *et al.* (2013) quanto a viabilidade de *L. bulgaricus* em iogurtes adicionados das mesmas combinações de frutas que o atual trabalho.

O *L. acidophilus* mostrou melhor estabilidade nas bebidas lácteas sem a adição de triptofano (ME1), apresentando pouca variação da sua viabilidade, embora significativa, que permaneceu na média de 10^7 UFC/mL entre 36 horas após a fermentação e ao final de 21 dias de armazenamentos refrigerado. Um resultado diferente foi observado quanto a viabilidade do *L. acidophilus* nas bebidas lácteas que apresentam triptofano em sua composição (ME2) que mostraram aumento significativo no número de células viáveis no d21 quando comparado ao d2, variando entre uma média de 10^6 para 10^8 UFC/mL entre os períodos analisados. Tal comportamento será avaliado e melhor estudado em trabalhos futuros.

Ambas as matrizes estudadas apresentaram quantidades adequadas da bactéria probiótica *L. acidophilus* que, segundo recomendado pela legislação que é de 10^6 UFC/mL para que o produto seja considerado um probiótico (ANVISA, 2002).

a)

b)

c)

Figura 6. Contagens de bactérias viáveis obtidas por Newman-Keuls em bebidas lácteas fermentadas por *S. thermophilus* (a), *L. bulgaricus* (b) e *L. acidophilus* (b) após 36 h (d2) e 21 dias (d21) de armazenamento a 4°C. Médias (N=3) com letras diferentes são significativamente diferentes; $P \leq 0.05$. Matriz de Ensaio 1 (bebida láctea sem triptofano).

a)

b)

c)

Figura 7. Contagens de bactérias viáveis obtidas por Newman-Keuls em bebidas lácteas fermentadas por *S. thermophilus* (a), *L. bulgaricus* (b) e *L. acidophilus* (c) após 36 h (d2) e 21 dias (d21) de armazenamento a 4°C. Médias (N=3) com letras diferentes são significativamente diferentes; $P \leq 0.05$. Matriz de Ensaio 2 (bebida láctea com triptofano).

5.5. Propriedades de cor

Os resultados para os parâmetros CIELAB, L^* , a^* , b^* e c^* dos diferentes produtos fermentados por *S. thermophilus* (St), *L. bulgaricus* (Lb) e *L. acidophilus* (La) após 36 h (d2) e 21 dias (d21) de armazenamento a 4°C podem ser vistos nas Tabelas 4 e 5. Valores de L^* representam luminosidade ou brilho, com escala variando de preto (0) a branco (100); a^* equivale ao eixo que varia de verde (-100) a vermelho (100), b^* , azul (-100) a amarelo (100) e o croma (c^*) equivale à saturação.

Houve diferenças significativas nos parâmetros, L^* , a^* , b^* entre o controle e as bebidas lácteas, tendo estas permanecido estáveis durante armazenamento refrigerado, o que mostra a cor dos produtos não sofre alterações no decorrer da sua vida de prateleira. O mesmo não ocorreu com o parâmetro c^* que, embora tenha apresentado uma diferença significativa entre o controle e as bebidas lácteas, sofreu variação entre 36h (d2) após a fermentação e o final dos 21 dias de armazenamento (d21).

Quanto aos valores de L^* , pode ser observada uma tendência onde as bebidas lácteas adicionadas de polpa de morango apresentaram valores maiores e a os produtos que continham a mistura de polpa de morango e pitanga obtiveram menores valores de luminosidade. Após 36h da preparação, os valores de L^* para as bebidas lácteas sem triptofano (ME3) variaram de 66,33 - 68,28, enquanto para as bebidas lácteas adicionadas de triptofano (ME4) a variação foi de 60,52 - 65,12. Todos os controles obtiveram valores de L^* superiores aos produtos lácteos analisados respectivos à suas matrizes de ensaio.

Em contraste aos resultados de L^* , os valores de b^* e c^* apresentados pelas bebidas lácteas foram mais elevados que os obtidos pelos controles, o que foi observado em todas as matrizes de ensaio. As bebidas lácteas que receberam adição de polpa de pitanga apresentaram maior intensidade da coloração amarela, caracterizada por maiores valores de b^* , bem como os produtos lácteos que continham as misturas binárias ou a ternária das polpas de frutas com a presença de pitanga. Esses atributos de cor permaneceram estáveis até ao final do período de 21 dias de armazenamento.

Os valores obtidos para a^* , que representa a intensidade da coloração vermelha nos produtos, se mostraram mais elevados para as bebidas lácteas as quais foi adicionada a

mistura da polpa de morango e pitanga – em torno de 6,25, enquanto a mistura da polpa de framboesa e morango proporcionou bebidas lácteas com os menores valores de a^* , sendo estes de 2,10 e 2,56 nas matrizes sem e com triptofano, respectivamente. Esse atributo de cor se mostrou estável, havendo uma tendência ao aumento da intensidade da coloração vermelha nas bebidas lácteas ao longo do período de armazenamento. Os controles apresentaram valores negativos de a^* decorrentes da ausência das polpas de frutas e foram considerados como não detectados.

Os resultados obtidos se mostram semelhante aos resultados obtidos por Bueno *et al.* (2014) em um estudo onde avaliaram os parâmetros de cor de iogurtes adicionados com as mesmas combinações de polpas de frutas que foi utilizado no atual trabalho. As bebidas lácteas podem apresentar menor intensidade da coloração vermelha quando comparadas a iogurtes com as mesmas polpas de frutas devido coloração do soro que pode proporcionar um produto mais esverdeado, caracterizados por menores valores de a^* (CALDEIRA *et al.*, 2010).

Caldeira *et al.* (2010), ao avaliarem a coloração de bebidas lácteas adicionadas de polpa de morango e que apresentavam diferentes proporções de soro de leite, obtiveram valores superiores de L^* e a^* quantos as bebidas lácteas analisadas nesse trabalho variando de 69,32 – 80,05 e 10,57 – 14,00, respectivamente. No entanto, os valores obtidos pelos autores de b^* foram inferiores, chegando a 2,48, enquanto, nesse atual trabalho, os produtos lácteos do que apresentavam pitanga em sua composição chegaram a 32,75 (ensaio 3 de ME1, bebida láctea sem triptofano).

Segundo Dias (2012), a coloração presente nas bebidas lácteas é totalmente dependente dos pigmentos presentes nas frutas, estes por sua vez variam de forma sazonal e de acordo com a proporção de fruta que é adicionada a bebida, o que explica as diferenças entre os resultados de diferentes trabalhos.

Tabela 4. Médias* dos parâmetros de cor obtidas por Newman-Keuls bebidas lácticas sem triptofano fermentadas por *S. thermophilus* (St), *L. bulgaricus* (Lb) e *L. acidophilus* (La) após 36 h (d2) e 21 dias (d21) de armazenamento a 4°C.

Ensaio	Proporção de polpa de morango, framboesa e pitanga	d2					d21				
		(x ₁ , x ₂ , x ₃)	L*	a*	b*	c*	h	L*	a*	b*	c*
1	(1, 0, 0)	65,40 ^f	0,62 ^b	17,30 ^c	4,16 ^c	1,53 ^g	65,12 ^c	0,65 ^b	17,83 ^a	4,22 ^d	1,53 ^h
2	(0, 1, 0)	62,72 ^d	4,30 ^f	15,22 ^a	3,90 ^a	1,28 ^c	62,02 ^a	5,23 ^f	15,75 ^b	3,96 ^b	1,24 ^b
3	(0, 0, 1)	63,49 ^a	4,30 ^f	32,75 ^h	5,72 ^h	1,38 ^a	62,38 ^a	5,75 ^g	32,32 ^g	5,68 ^g	1,38 ^e
4	(½,½, 0)	63,84 ^a	2,10 ^c	16,23 ^b	4,02 ^b	1,44 ^f	63,34 ^{ab}	2,56 ^c	16,71 ^c	4,08 ^c	1,41 ^f
5	(½, 0, ½)	61,51 ^b	6,27 ^h	24,75 ^f	4,97 ^f	1,32 ^d	60,52 ^d	6,23 ^h	24,84 ^e	4,98 ^e	1,32 ^c
6	(0, ½, ½)	64,28 ^e	3,57 ^d	25,61 ^g	5,06 ^g	1,43 ^e	64,46 ^c	3,34 ^d	26,06 ^f	5,10 ^f	1,44 ^g
7	(⅓,⅓,⅓)	62,29 ^c	4,17 ^e	22,04 ^d	4,69 ^d	1,38 ^a	62,60 ^{ab}	4,17 ^e	22,46 ^a	4,74 ^a	1,38 ^d
Controle	(0, 0, 0)	78,88 ^g	nd	22,57 ^e	4,75 ^e	1,23 ^b	78,44 ^e	nd	22,59 ^a	4,75 ^a	1,23 ^a

*Médias (N = 4) com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes; $P \leq 0,05$; nd: não detectado.

Tabela 5. Médias* dos parâmetros de cor obtidas por Newman-Keuls bebidas lácticas com triptofano fermentadas por *S. thermophilus* (St), *L.bulgaricus* (Lb) e *L. acidophilus* (La) após 36 h (d2) e 21 dias (d21) de armazenamento a 4°C.

Ensaio	Proporção de polpa de morango, framboesa e pitanga	d2					d21				
	(x ₁ , x ₂ , x ₃)	L*	a*	b*	c*	h	L*	a*	b*	c*	h
1	(1, 0, 0)	65,12 ^c	0,65 ^b	17,43 ^d	4,22 ^d	1,53 ^h	64,51 ^e	0,54 ^c	17,56 ^c	4,19 ^c	1,54 ^g
2	(0, 1, 0)	62,02 ^a	5,23 ^f	15,75 ^b	3,96 ^b	1,24 ^b	61,99 ^a	4,75 ^e	15,80 ^a	3,97 ^a	1,28 ^c
3	(0, 0, 1)	62,38 ^a	5,75 ^g	32,32 ^g	5,68 ^g	1,38 ^e	62,69 ^c	5,83 ^f	32,59 ^h	5,70 ^h	1,39 ^a
4	(½,½, 0)	63,34 ^{bd}	2,56 ^c	16,71 ^c	4,08 ^b	1,41 ^f	62,19 ^a	3,28 ^a	16,46 ^b	4,06 ^b	1,37 ^e
5	(½, 0, ½)	60,52 ^e	6,23 ^h	24,84 ^e	4,98 ^e	1,32 ^c	60,80 ^b	6,15 ^g	25,54 ^f	5,05 ^f	1,33 ^d
6	(0, ½, ½)	64,46 ^c	3,34 ^d	26,06 ^f	5,10 ^f	1,44 ^g	63,97 ^d	3,42 ^a	26,25 ^g	5,12 ^g	1,44 ^f
7	(⅓,⅓,⅓)	62,60 ^{ab}	4,17 ^e	22,46 ^a	4,74 ^a	1,38 ^d	62,08 ^a	4,08 ^d	22,73 ^e	4,76 ^e	1,39 ^a
Controle	(0, 0, 0)	78,44 ^f	nd	22,60 ^a	4,75 ^a	1,23 ^a	78,31 ^f	nd	21,69 ^d	4,65 ^d	1,22 ^b

*Médias (N = 4) com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes; $P \leq 0,05$; nd: não detectado.

5.6. Propriedades reológicas

A avaliação e controle dos parâmetros reológicos de produtos lácteos, como iogurtes e bebidas lácteas, são de grande importância para o controle de qualidade uma vez que a consistência e viscosidade desses produtos estão diretamente ligadas a aceitabilidade destes pelo consumidor (MATHIAS *et al.*, 2013).

Os reogramas referentes ao comportamento reológico das bebidas lácteas após 36 h (d2) e 21 dias (d21) de armazenamento a 4°C, são representados pelas Figuras 8 e 9. Através deles, pode ser observado que todos os produtos exibiram um comportamento reológico semelhante a 5°C, caracterizado não Newtoniano com presença de tixotropia. As bebidas lácteas adicionadas de triptofano, mostraram maior estabilidade no comportamento reológico entre o período analisado, como pode ser observado nos reogramas.

A tixotropia está diretamente ligada com a diferença existente entre as curvas ascendentes e descendentes presentes nos reogramas, onde as curvas ascendentes mostraram um comportamento pseudoplástico enquanto as curvas descendentes dilatantes, indicando que houve a diminuição da viscosidade em função ao aumento do cisalhamento (GOMES e PENNA, 2009; MATHIAS *et al.*, 2013). Esse comportamento é geralmente visto como sendo típico de produtos lácteos, como iogurtes, leites fermentados e bebidas lácteas, e foram observados em outros estudos (SHAKER, JUMAH E ABU-JDAYIL, 2000; CUNHA *et al.*, 2008; PASEEPHOL *et al.*, 2008; GOMES E PENNA, 2009; MATHIAS *et al.*, 2013).

As Tabelas 6 e 7 mostram a caracterização reológica das bebidas lácteas de acordo com cada delineamento experimental. As bebidas lácteas apresentaram variação do índice de consistência de 6,1084 (d2, 36 horas após a fermentação) e 0,2855 mPa.sⁿ (d21, 21 dias de armazenamento refrigerado) para as bebidas lácteas sem triptofano e, de 1,1642 (d2) e 0,1443 mPa.sⁿ (d21) para as bebidas lácteas com triptofano.

Os estudos realizados por Gomes e Penna (2009) e Moreira *et al.* (2010), avaliando o comportamento reológico de bebidas lácteas, sugerem um padrão onde há um decréscimo do índice de consistência a medida em que há adição de soro ao produto.

A viscosidade aparente das bebidas lácteas é apresentada nas Figuras 10 e 11. As bebidas lácteas adicionadas de triptofano (ME2) apresentaram maior viscosidade,

variando de 4,69 a 9,67 mPa.sⁿ nos ensaios 1 e 7, respectivamente. Para os mesmos ensaios, as bebidas sem triptofano (ME1) apresentaram valores de viscosidade aparente de 4,33 e 6,32 mPa.sⁿ, tendo a bebida adicionada da mistura binária da polpa de morango e pitanga (ensaio 5) mostrado maior viscosidade, 6,89 mPa.sⁿ.

Em ambas as matrizes experimentais (ME1 e ME2), foi possível observar que adição do preparado de polpa de frutas proporcionou um aumento da consistência e da viscosidade das bebidas lácteas quando comparadas ao controle. Isso pode ser considerado um efeito positivo e uma melhora na qualidade dos produtos lácteos, pois a consistência e a viscosidade representam fatores de impacto na avaliação de qualidade de produtos como iogurtes e outros derivados lácteos (LEE e LUCEY, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011; MATHIAS *et al.*, 2013).

Um dos motivos para o preparado de polpa de fruta ter exercido influência nas características reológicas dos iogurtes aos quais foi incorporado é a presença da inulina em sua composição, como Paseephol *et al.* (2008), que em seu estudo, observou que a fibra alterou as características reológicas e de textura dos iogurtes aos quais foi adicionada.

A inulina é uma fibra alimentar e o seu uso pela indústria alimentícia está relacionado tanto com a sua ação prebiótica no organismo humano, proporcionando efeitos benéficos para a microbiota humana como a proliferação seletiva das bifidobactérias e lactobacilos, quanto pela sua capacidade de formar géis em meio aquoso, o que pode conferir alterações das características reológicas nos produtos que se assemelham à adição de gordura (PASEEPHOL *et al.*, 2008; ROBERFROID, 2010).

Figura 8. Reogramas das bebidas lácteas sem triptofano (ME1) após 36 h (d2) e 21 dias de armazenamento refrigerado. Curvas médias (N=2).

Proporções de polpas de morango, framboesa e “pitanga”:

a) Controle: (0,0,0); b) E1: (1, 0, 0); c) E2: (0, 1, 0); d) E3: (0, 0, 1); e) E4: ($\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, 0$); f) E5: ($\frac{1}{2}, 0, \frac{1}{2}$); g) E6: (0, $\frac{1}{2}, \frac{1}{2}$); h) E7: ($\frac{1}{3}, \frac{1}{3}, \frac{1}{3}$)

Figura 9. Reogramas das bebidas lácteas com triptofano (ME2) após 36 h (d2) e 21 dias de armazenamento refrigerado. Curvas médias (N=2).

Proporções de polpas de morango, framboesa e “pitanga”:

a) Controle: (0,0,0); b) E1: (1, 0, 0); c) E2: (0, 1, 0); d) E3: (0, 0, 1); e) E4: ($\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, 0$); f) E5: ($\frac{1}{2}, 0, \frac{1}{2}$); g) E6: ($0, \frac{1}{2}, \frac{1}{2}$); h) E7: ($\frac{1}{3}, \frac{1}{3}, \frac{1}{3}$)

Tabela 6. Características reológicas de bebidas lácteas sem triptofano (ME1) a 5°C ajustadas pelo modelo de Ostwald-de Waele ($\tau = k \dot{\gamma}^n$).

Bebida láctea	d2			d21		
	K ⁽¹⁾ (mPa.s ⁿ)	n ⁽²⁾	R ⁽³⁾	K ⁽¹⁾ (mPa.s ⁿ)	n ⁽²⁾	R ⁽³⁾
Up						
Controle	NA ^a	NA ^a	NA	NA ^a	NA ^a	NA
1	0,2855 ^c	0,9852 ⁱ	0,8747	0,277 ^b	0,9987 ^k	0,8826
2	0,7684 ^k	0,7472 ^b	0,9847	0,6251 ^j	0,8315 ^c	0,9783
3	0,5767 ⁱ	0,8646 ^d	0,9762	0,4802 ^f	0,9453 ^g	0,9761
4	2,0522 ^l	0,9449 ^f	0,9676	0,3672 ^d	0,9989 ^l	0,9450
5	6,1084 ⁿ	0,9154 ^e	0,984	0,4985 ^g	0,9983 ^k	0,9652
6	0,5278 ^h	1,0885 ⁿ	1,0913	NA ^a	NA ^a	NA
7	5,0796 ^m	0,9572 ^h	0,9825	0,3882 ^e	1,0585 ^m	0,9591
Down						
Controle	NA ^a	NA ^a	NA	NA ^a	NA ^a	NA
1	0,1791 ^e	1,1194 ^e	0,9714	0,1552 ^d	1,0324 ^d	0,9565
2	0,2256 ^g	1,1604 ^g	0,9931	0,1857 ^f	1,1553 ^f	0,6960
3	1,7153 ^j	1,2642 ^h	0,9801	0,1210 ^c	1,3510 ^k	0,9569
4	0,7138 ^h	1,2747 ^j	0,9745	NA ^a	NA ^a	NA
5	3,2970 ^l	1,0256 ^c	0,9761	0,0976 ^b	1,4264 ^l	0,9566
6	3,2203 ^k	0,9707 ^b	0,9958	NA ^a	NA ^a	NA
7	1,6340 ⁱ	1,2732 ⁱ	0,9744	NA ^a	NA ^a	NA

⁽¹⁾ Índice de consistência; ⁽²⁾ índice de comportamento de fluxo; ⁽³⁾ coeficiente de determinação; ⁽⁴⁾ *yield stress*; NA: não ajustado

Médias (N=3) com letras iguais em resultados de uma mesma coluna não diferem significativamente entre si.

Tabela 7. Características reológicas de bebidas lácteas com triptofano (ME2) a 5°C ajustadas pelo modelo de Ostwald-de Waele ($\tau = k \dot{\gamma}^n$).

Bebida láctea	d2			d21		
	$K^{(1)}$ (mPa.s ⁿ)	$n^{(2)}$	$R^{(3)}$	$K^{(1)}$ (mPa.s ⁿ)	$n^{(2)}$	$R^{(3)}$
Up						
Controle	0,1443 ^a	1,1019 ^p	0,7990	0,2923 ^b	1,0515 ^o	0,9864
1	0,5328 ^e	0,7507 ^e	0,9566	0,4569 ^d	0,8766 ^m	0,9513
2	1,1296 ⁿ	0,7057 ^b	0,9933	1,2268 ^p	0,6971 ^a	0,9922
3	0,7897 ^h	0,7564 ^f	0,9889	0,6648 ^g	0,8354 ^k	0,9816
4	1,0117 ^m	0,7291 ^c	0,9897	0,8034 ⁱ	0,8048 ⁱ	0,9862
5	0,8622 ^k	0,7780 ^g	0,9899	0,8258 ^j	0,8100 ^j	0,9889
6	0,6074 ^f	0,8029 ^h	0,9694	0,3383 ^c	1,0282 ⁿ	0,9119
7	1,1642 ^o	0,7398 ^d	0,9883	0,9101 ^l	0,8423 ^l	0,9862
Down						
Controle	NA ^a	NA ^a	NA	NA ^a	NA ^a	NA
1	0,1662 ^b	1,1313 ^h	0,9697	NA ^a	NA ^a	NA
2	0,3612 ^l	1,0212 ^c	0,9951	0,2295 ^g	1,1647 ^j	0,9877
3	0,2722 ⁱ	1,0751 ^g	0,9919	0,1883 ^d	1,2043 ^l	0,9766
4	0,3561 ^k	1,0170 ^b	0,9934	0,1705 ^c	1,2430 ^m	0,9766
5	0,3449 ^j	1,0232 ^d	0,9952	0,2240 ^f	1,1466 ⁱ	0,9797
6	0,2615 ^h	1,0462 ^f	0,9899	NA ^a	NA ^a	NA
7	0,3757 ^m	1,0286 ^e	0,9963	0,2142 ^e	1,181 ^k	0,9825

⁽¹⁾ Índice de consistência; ⁽²⁾ índice de comportamento de fluxo; ⁽³⁾ coeficiente de determinação; ⁽⁴⁾ *yield stress*; NA: não ajustado

Médias (N=3) com letras iguais em resultados de uma mesma coluna não diferem significativamente entre si.

Figura 10. Viscosidade aparente em bebidas lácteas fermentadas após 36 h (d2) e 21 dias (d21) a 4°C. Médias (N=3) com letras diferentes são significativamente diferentes: $P \leq 0.05$. Matriz de Ensaio 1 (bebida láctea sem triptofano).

Figura 11. Viscosidade aparente em bebidas lácteas fermentadas após 36 h (d2) e 21 dias (d21) a 4°C. Médias (N=3) com letras diferentes são significativamente diferentes; $P \leq 0.05$. Matriz de Ensaio 2 (bebida láctea com triptofano).

5.7. Perfil de ácido elágico e otimização

O conteúdo total de ácido elágico (AE) nas preparações de frutas, isto é, após a mistura das polpas de frutas como os demais ingredientes – inulina, sacarose, sucralose, acessulfame K e maltodextrina, no preparado de frutas podem ser vistas na Tabela 8. O teor de AE foi menor no preparado contendo pitanga ($8,584 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Contrariamente, o maior valor obtido foi no preparado contendo polpa de morango ($30,142 \mu\text{g.mL}^{-1}$), 3,5 vezes maior que no de pitanga. A mistura de polpas de frutas resultou num teor de AE variando de $11,357 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (framboesa + pitanga) a $24,058 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (morango + framboesa). Os resultados obtidos foram significativamente distintos ($P \leq 0,05$) (Tabela 8).

Tabela 8. Teor de ácido elágico total em preparados de frutas vermelhas.

Fruta	Ácido elágico ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Morango	$30,142^g \pm 0,389$
Framboesa	$9,160^b \pm 0,093$
Pitanga	$8,584^a \pm 0,021$
Morango + Framboesa	$24,058^f \pm 0,111$
Morango + Pitanga	$21,479^d \pm 0,065$
Framboesa + Pitanga	$11,357^c \pm 0,119$
Morango + Framboesa + Pitanga	$21,925^e \pm 0,208$

Médias (N=2) com as letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Existem poucos dados na literatura sobre concentração de livre ácido elágico na fruta original e, segundo Pinto (2008), são influenciados diretamente pelos solventes utilizados e as condições de extração e hidrólises das amostras.

O total de ácido elágico nas bebidas lácteas simbióticas contendo frutas vermelhas foi significativamente diferente ($P \leq 0,05$) (Figura 12). Após 36h da

preparação das bebidas lácteas simbióticas sem triptofano (ME2) o teor de ácido elágico variou de 6,094 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 14,990 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Após 21 dias de armazenamento, os valores foram 5,737 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 19,486 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Nas bebidas com triptofano (ME4) após 36h da preparação detectou-se uma variação de 5,737 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 19,486 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ácido elágico. Após armazenamento de 21 dias, os valores foram de 5,186 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 25,739 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Em todos os casos os menores valores foram obtidos nas bebidas preparadas com a mistura das polpas de morango e framboesa. As bebidas lácteas simbióticas com maiores teores de ácido elágico foram àquelas preparadas com polpa de morango com exceção à bebida sem triptofano após 36h da preparação. Observou-se um aumento significativo no teor de ácido elágico com o armazenamento ($P \leq 0,05$) mostrado na Figura 12 ($P \leq 0,05$).

As bebidas lácteas que continham triptofano mostraram maiores variações do teor de AE, apresentando acréscimos mais expressivos durante o período de 36h (d2) e 21 dias (d21) de armazenamento refrigerado. As mesmas bebidas lácteas apresentaram aumento significativo da viabilidade do probiótico *Lactobacillus acidophilus* no mesmo período analisado, indicando que a bactéria continuou o seu processo fermentativo durante o armazenamento refrigerado do produto.

Estudos relatam que a biodisponibilidade de compostos, como isoflavonas, é maior em produtos fermentados do que em produtos não fermentados (Pinto, 2008). Segundo Clifford e Scalbert (2000), é evidenciado tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo* que os elagitaninos sofrem hidrólise no organismo. No entanto, existem dúvidas se o fator responsável por essa hidrólise seria o pH do estômago ou a fermentação da microbiota intestinal (CLIFFORD e SCALBERT, 2000).

a)

b)

Figura 12. Teor de ácido elágico em bebidas lácteas simbióticas sem (a) e com (b) triptofano preparadas com polpas de frutas vermelhas 36h após a preparação (d2) e após 21 dias (d21) de armazenamento a 4°C. Médias (N= 2) com as letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Proporções de polpas de morango, framboesa e “pitanga”:

E1: (1, 0, 0); E2: (0, 1, 0); E3: (0, 0, 1); E4: ($\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, 0$); E5: ($\frac{1}{2}, 0, \frac{1}{2}$); E6: ($0, \frac{1}{2}, \frac{1}{2}$); E7: ($\frac{1}{3}, \frac{1}{3}, \frac{1}{3}$)

Foi possível estimar o conteúdo ótimo de ácido elágico nas bebidas lácteas simbióticas pela metodologia de superfície de resposta. Os valores e os sinais dos coeficientes lineares obtidos para cada fator evidenciam, com exceção para a mistura morango e pitanga, que as demais misturas de polpas de frutas contribuíram para o aumento do conteúdo de ácido elágico (β_1 , β_2 e β_3 positivos em d2 e d21) (Tabela 19). Entretanto, diferentes efeitos foram observados quando combinando as polpas de morango e pitanga. Interações significativas e negativas das três polpas foram

observadas (β_{123}) para os resultados ajustados do teor de ácido elágico nas bebidas lácteas simbióticas sem triptofano.

Tabela 9. Coeficientes dos modelos polinomiais ajustados para o teor de ácido elágico em bebidas lácteas simbióticas preparadas com misturas de polpas de frutas vermelhas.

Fatores	Sem triptofano		Com triptofano	
	d2	d21	d2	d21
Morango (β_1)	13,24	19,48	15,72	25,74
Framboesa (β_2)	6,76	6,33	6,03	7,57
Pitanga (β_3)	6,25	7,89	7,42	8,16
Morango + Framboesa (β_{12})	19,95	10,34	13,43	-9,43
Morango + Pitanga (β_{13})	-14,62	-31,80	-31,79	-47,05
Framboesa + Pitanga (β_{23})	12,77	31,46	6,28	30,95
Morango + Framboesa + Pitanga (β_{123})	-62,10	-49,44	Ns	274,86
P (modelo)	$\leq 0,05$	$\leq 0,05$	$\leq 0,05$	$\leq 0,05$
R^2 ajustado	0,999	0,997	0,996	0,998

Ns: não significativo;

d2: 36 h após a preparação; d21: após 21 dias de armazenamento refrigerado

Gráficos de contorno obtidos com os resultados do conteúdo ácido elágico reforça a influência significativa da adição de polpa de frutas para as bebidas lácteas simbióticas (Figuras 13, 14, 15 e 16). Pode-se notar que o centro dos triângulos representa as composições da mistura ótima das três polpas de frutas que aumentam conteúdo de ácido elágico. Qualquer desvio deste ponto permitiria uma composição de mistura, resultando numa diminuição de teor de ácido elágico, para ambos os tempos de armazenagem.

Os resultados deste estudo indicaram que a adição de polpas de frutas vermelhas aumenta o teor de ácido elágico em bebidas lácteas simbióticas, o que poderia potencialmente aumentar o seu efeito benéfico para o hospedeiro. Dado o baixo número de estudos em humanos relativo ao ácido elágico (LANDETE, 2011; LARROSA *et al.*,

2010), bem como a controvérsia observada em alguns dos resultados atuais, *in vitro* e *in vivo* um número significativo de voluntários são essenciais para avaliar a biodisponibilidade e o efeito de variabilidade interindividual sobre os níveis de metabólitos de ácido elágico no plasma.

Figura 13. Contorno mostrando o efeito da adição de polpa de morango, polpa de framboesa e de polpa de pitanga nas bebidas lácteas simbióticas sem triptofano no teor de ácido elágico ajustado por um modelo cúbico especial pelos dados experimentais do ME2 36 horas (d2).

Figura 14. Contorno mostrando o efeito da adição de polpa de morango, polpa de framboesa e de polpa de pitanga nas bebidas lácteas simbióticas sem triptofano no teor de ácido elágico ajustado por um modelo cúbico especial pelos dados experimentais do ME2 21 dias (d21).

Figura 15. Contorno mostrando o efeito da adição de polpa de morango, polpa de framboesa e de polpa de pitanga nas bebidas lácteas simbióticas com triptofano no teor de ácido elágico ajustado por um modelo cúbico especial pelos dados experimentais do ME4 36 horas (d2).

Figura 16. Contorno mostrando o efeito da adição de polpa de morango, polpa de framboesa e de polpa de pitanga nas bebidas lácteas simbióticas com triptofano no teor de ácido elágico ajustado por um modelo cúbico especial pelos dados experimentais do ME4 21 dias (d21).

5.8. Microestrutura eletrônica de varredura (MEV)

A finalidade da análise de microscopia eletrônica de varredura, nesse atual trabalho, foi de observar, comparar e avaliar a interação de todos os componentes da matriz do produto de uma forma geral. Como a presença de triptofano não resultou em diferenças significativas nas microestruturas das bebidas lácteas, apenas os resultados da microestrutura de bebidas lácteas simbióticas adicionadas com polpas de frutas vermelhas sem triptofano estão sendo apresentadas (Figura 17).

É possível observar a porosidade da estrutura em todas as amostras analisadas resultante da presença do soro nas suas composições, sendo mais bem observado na figura 17c (ii). Segundo Lee e Lucey (2003), a maior presença de poros pode significar uma estrutura mais frágil, com interações mais fracas entre as caseínas. Isso indicaria um produto mais fluído com menor consistência, caracterizando as bebidas lácteas.

Um perfil de porosidade diferente foi observado por Marafon (2011), onde ao avaliar a microestrutura de iogurtes, estes apresentaram uma compactação maior da sua estrutura resultando em tamanhos menores de poros.

As culturas microbianas utilizadas para a fermentação da base do leite de base estão presentes em todas as imagens obtidas, sendo melhor identificadas na Figura 17a (i, ii e iii), referente a bebida láctea simbiótica controle, sem adição de polpa de fruta.

A micrografia correspondente à bebida láctea com polpa de morango (Figura 17b) enquanto as estruturas das polpas de fruta não são detectadas, a produção de estruturas extracelulares, isto é, de polissacarídeos produzidos pela bactéria *Streptococcus thermophilus* é eminente. De acordo com Tamime *et al.* (2007), a produção de exopolissacarídeos por culturas utilizadas na produção de leites fermentados diretamente afeta as propriedades físicas do produto, contribuindo assim para uma maior consistência.

a)

b)

c)

Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura de bebidas lácteas fermentadas por *Streptococcus thermophilus* (TA040), *Lactobacillus bulgaricus* (LB340) e *Lactobacillus acidophilus* (L104) 36h após a fermentação a 42°C até pH 4,7, sem adição de triptofano (ME1).

a) Bebida láctea controle sem adição de polpa de frutas; b) Bebida láctea simbiótica adicionado de polpa de morango; c) Bebida láctea simbiótica adicionada de proporções semelhantes de polpas de morango, framboesa e “pitanga”.

a) (i) *Lactobacillus acidophilus*; (ii) *Streptococcus thermophilus*; (iii) *Lactobacillus bulgaricus*; (iv) Inulina. b) (i) *Streptococcus thermophilus*; (ii) Estrutura de exopolissacarídeo c) (i) Bactérias ácido lácticas; (ii) porosidade da matriz.

VI - CONCLUSÕES

As bebidas lácteas com adição de triptofano, com exceção do produto adicionado de polpa de morango, não apresentaram decréscimos significativos de pH ao longo do período de armazenamento, diferente do perfil de pós acidificação referente as bebidas sem a presença do aminoácido.

O *S. thermophilus* se mostrou estável em ambas as matrizes estudadas, sendo encontrada na ordem de 10^8 e 10^9 UFC/mL. As bebidas lácteas sem adição de triptofano apresentaram melhor viabilidade do *L. bulgaricus*. Resultado inverso foi observado quanto a viabilidade da bactéria probiótica *L. acidophilus* que apresentou aumento significativo no número de células viáveis ao longo do período de armazenamento a 4°C.

Houve diferenças significativas nos parâmetros de cor, L*, a*, b* entre o controle e as bebidas lácteas, não havendo alterações destes durante o armazenamento refrigerado, o que mostra a cor dos produtos não sofre alterações no decorrer da sua vida de prateleira.

As bebidas lácteas apresentaram comportamento reológico semelhante entre si e típico ao observado para outros produtos lácteos como iogurte. Foi observado aumento na consistência e na viscosidade das bebidas lácteas com polpa de frutas quando comparadas ao controle, podendo ser considerado um efeito positivo.

Foi possível estimar o conteúdo ótimo de ácido elágico nas bebidas lácteas simbióticas pela metodologia de superfície de resposta. A adição de polpas de frutas vermelhas contribuiu para o aumento do teor de ácido elágico nas bebidas lácteas. As bebidas contendo triptofano também mostraram as maiores variações da quantidade de ácido elágico durante o período analisado. Os maiores valores de ácido elágico foram encontrados nas bebidas lácteas preparadas com polpa de morango, principalmente com a polpa pura, caracterizando a formulação ótima.

A análise de microscopia eletrônica de varredura possibilitou observar, comparar e avaliar a interação de todos os componentes da matriz do produto, caracterizando a sua estrutura.

VII - PERSPECTIVAS

- Usar mistura de polpas de frutas vermelhas em outras bases alimentícias como, por exemplo, sorvetes, sobremesas lácteas, etc;
- Avaliar a biodisponibilidade do ácido elágico durante a digestão gástrica através de estudos *in vitro*;
- Realizar estudos *in vitro* e *in vivo* a fim de avaliar o efeito benéfico do ácido elágico na saúde do hospedeiro.

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, L.T.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Comparison of phenol content and antioxidant capacity of nuts. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.1, p.254-259, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n.2, de 07 de janeiro de 2002**. Aprova o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. Brasília: 2002.

ALMEIDA, K.E.; TAMIME, A.Y.; OLIVEIRA, M.N. Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, n.2, p.672-678, 2009.

ANTUNES, A.E.C.; SILVA, E.R.A.; MARASCA, E.T.G.; MORENO, I., LERAYER, A.L.S. Probióticos: agentes promotores de saúde. **Nutrire**, v.32, n.3, p.113-132, 2007. [Review].

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: UNICAMP, 2001. 401p.

BATE-SMITH, E.C. Detection and determination of ellagitannins. **Phytochemistry**, v.11, n.3, p.1153-1156, 1972.

BENEZECH, T.; MAINGONNAT, J.F. Characterization of the rheological properties of yoghurt: a review. **Journal of Food Engineering**, v.21, n.4, p.447-472, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Instrução Normativa n.16, 23 de agosto de 2005**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas.

BRIOSCHI, E.F.C.; BRIOSCHI, M.L.; YENG, L.T.; TEIXEIRA, M.J. Nutrição funcional no paciente com dor crônica. **Revista Dor**, v.10, n.3, p.276-285, 2009.

CALDEIRA, L.; FERRAO, S.; FERNANDES, S.; MAGNAVITA, A.; SANTOS, T. Development of strawberry-flavored milk drink using different yoghurt levels and whey obtained from buffalo's milk. **Ciência Rural**, 40, n.10, p.2193-2198, 2010.

CANI, P.D.; DELZENNE, N.M. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. **Current Pharmaceutical Design**, v.15, n.13, p.1546-1558, 2009.

CLIFORD, M.N.; SCALBERT, A. Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, n.7, p.1118-1125, 2000. [Review].

CORDENUNSI, B.R.; GENOVESE, M.I.; NASCIMENTO, J.R.O.; HASSIMOTTO, N.M.A.; SANTOS, R.J.; LAJOLO, F.M. Effects of temperature on the chemical

composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. **Food Chemistry**, v.91, n.1, p.113-121, 2005.

COSTA, A.V.S.; NICOLAU, E.S.; TORRES, M.C.L.; FERNANDES, P.R.; ROSA, S.I.R.; NASCIMENTO, R.C. Desenvolvimento e caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de bebida láctea fermentada elaborada com diferentes estabilizantes/espessantes. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.1, p.209-226, 2013.

CRUZ, A.; FARIA, J.; VAN DENDER, A. Packaging system and probiotic dairy foods. **Food Research International**, v.40, n.8, p.951-956, 2007.

CUNHA, T.M.; CASTRO, F.P.; BARRETO, P.L.M.; BENEDET, H.D.; PRUDÊNCIO, E.S. Physico-chemical, microbiological and rheological evaluation of dairy beverage and fermented milk added of probiotics. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.1, p.103-116, 2008.

DAMIN, M.; ALCANTARA, M.; NUNES, A.; OLIVEIRA, M. Effects of milk supplementation with skim milk powder, whey protein concentrate and sodium caseinate on acidification kinetics, rheological properties and structure of nonfat stirred yogurt. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, n.10, p.1744-1750, 2009.

DAMIN, M.R.; MINOWA, E.; ALCÂNTARA, M.R.; OLIVEIRA, M.N. Effect of cold storage on culture viability and some rheological properties of fermented milk prepared with yogurt and probiotic bacteria. **Journal of Texture Studies**, v.39, n.1, p.40-55, 2008.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.9, p.1529-1536, 1996.

DIAS, M.L.L.A. **bebida fermentada simbiótica: características físico-químicas, sensoriais e viabilidade de *Lactobacillus acidophilus***. Recife, 2012. 73p. Dissertação de Mestrado - Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco.

DONKOR, O.N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v.16, n.10, p.1181-1189, 2006.

DOUGLAS, L.; SANDERS, M. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. **Journal of the American Dietetic Association**, v.108, n.3, p.510-521, 2008.

FAO/WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food: report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food**. London: FAO/WHO, 2002.

FULLER, R. Probiotics in human medicine. **Gut**, v.32, n.4, p.439-442, 1991.

GOMES, R.G.; PENNA, A.L.B. Características reológicas e sensoriais de bebidas lácteas funcionais. **Semina: Ciências Agrárias**, v.30, n.3, p.629-646, 2009.

HANNUM, S.M. Potential impact of strawberries on human health: a review of science. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.44, n.1, p.1-17, 2004.

HARE, L. Mixture designs applied to food formulation. **Food Technology**, v.28, n.3, p.50-62, 1974.

HASSIMOTTO, N.; MOTA, R.V.; CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. Physico-chemical characterization and bioactive compounds of blackberry fruits (*Rubus* sp.) grown in Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.3, p.702-708, 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, 1985. 533p.

KEMPKA, A.P.; KRÜGER, R.L.; VALDUCA, E.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R.; OLIVEIRA, D. Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego utilizando substratos alternativos e cultura probiótica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, suppl., p.170-177, 2008.

KOLIDA, S.; GIBSON, G.R. Synbiotics in health and disease. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.2, p.373-393, 2011.

KOMORSKY-LOVRIC, S.; NOVAK, I. Determination of ellagic acid in strawberries, raspberries and blackberries by square-wave voltammetry. **International Journal of Electrochemical Science**, v.6, n.10, p.4638-4647, 2011.

KUBOTA, M; ISHIKAWA, C.; SUGIYAMA, Y.; FUKUMOTO, S.; MIYAGI, T.; KUMAZAWA, S. Anthocyanins from fruits of *Rubus croce acanthus* and *Rubus sieboldii*, wild berry from Okinawa, Japan. **Journal of Food Compositions and Analysis**, San Diego, v.28, p.179-182, 2012.

LABRECQUE, L.; LAMY, S.; CHAPUS, A.; MOHOUBI, S.; DUROCHER, Y.; CASS, B.; BOJANOWSKI, M.W.; GINGRAS, D.; BÉLIVEAU, R. Combined inhibition of PDGF and VEGF receptors by ellagic acid, a dietary-derived phenolic compound. **Carcinogenesis**, v.26, n.4, p.821-826, 2005.

LANDETE, J. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health. **Food Research International**, v.44, n.5, p.1150-1160, 2011.

LEE, W.J., and J.A. LUCEY. Rheological properties, whey separation, and microstructure in set-style yogurt: Effects of heating temperature and incubation temperature. **Journal of Texture Studies**, v.34, p.515-536, 2003.

LEE, W.J.; LUCEY, J.A. Formation and physical properties of yogurt. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.23, n.9, p.1127-1136, 2010.

LEMOES, A.C.G. **Efeito da suplementação de frutooligossacarídeos (FOS) sobre o sistema imunológico**: estudo em ratos. Campinas, 2012. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos - Universidade Estadual de Campinas.

LIMA, V.L.A.G.; MÉLO, E.A., LIMA, E.S. Fenólicos e carotenoides totais em pitanga. **Scientia Agrícola**, v.59, p.447-450, 2002.

MARAFON, A.P. **Otimização das propriedades reológicas e sensoriais de iogurtes probióticos enriquecidos com proteínas lácteas**. São Paulo, 2010. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

MARAFON, A.P.; SUMI, A.; ALCÂNTARA, M. R., TAMIME, A. Y.; OLIVEIRA, M. N. Effects of partially replacing skimmed milk powder with dairy ingredients on rheology, sensory profiling, and microstructure of probiotic stirred-type yogurt during cold storage. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.5330-5340, 2011.

MARQUES, A.P. **Desenvolvimento de bebida láctea fermentada à base de soro lácteo e café solúvel com atividade probiótica**. Lavras, 2012. 110p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos - Universidade Federal de Lavras.

MARTINS, A.C.C.L. **Determinação de precursores da serotonina - triptofano e 5-hidroxitriptofano - em café por CLAE-PAR iônico**. Belo Horizonte, 2012. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos - Faculdade Federal de Minas Gerais.

MATHIAS, T.R.S.; ANDRADE, K.C.S.; ROSA, C.L.S.; SILVA, B.A. Avaliação do comportamento reológico de diferentes iogurtes comerciais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.16, n.1, p.12-20, 2013.

MOROTI, C.; MAGRI, L.F.S.; SOUZA, J.C.B.; MATOS, D.B.S.; COSTA, M.R.; SIVIERI, K. Potencial da utilização de alimentos probióticos, prebióticos e simbióticos na redução de colesterol sanguíneo e glicemia. **UNOPAR Científica, Ciências Biológicas e da Saúde**, v.11, n.4, p.63-67, 2009.

MURPHY, M.M., BARRAI, L. M.; HERMAN, D.; BI, X.; CHEATHAM, R.; RANDOLPH, R. K. Phytonutrient intake by adults in the united states in relation to fruit and vegetable consumption. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v.112, n.2, p.222-229, 2012.

OLIVEIRA, M.N. Probióticos: seus benefícios à saúde humana. **Nutrição em Pauta**, v.7, n.87, p.18-22, 2007.

OLIVEIRA, M.N., ed. **Tecnologia de produtos lácteos funcionais**. São Paulo: Atheneu, 2009. cap.10, p.321–343.

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

OLIVEIRA, M.N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; CORRIEU, G. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, n.11/12, p.935-942, 2001.

OLIVEIRA, R.P.S.; PEREGO, P.; OLIVEIRA, M.N.; CONVERTI, A. Effect of inulin as prebiotic and synbiotic interactions between probiotics to improve fermented milk firmness. **Journal of Food Engineering**, v.107, n.1, p.36-40, 2011.

PANICHAYUPAKARANANT, P.; ITSURIYA, A.; SIRIKATITHAM, A. Preparation method and stability of ellagic acid-rich pomegranate fruit peel extract. **Pharmaceutical Biology**, v.48, n.2, p.201-205, 2010.

PASEEPHOL, T.; SMALL, D.M.; SHERKAT, F. Rheology and texture of set yogurt as affected by inulin addition. **Journal of Texture Studies**, v.39, n.6, p.617-634, 2008.

PATEL, S.; GOYAL, A. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. **3 Biotech**, v.2, n.2, p.115–125, 2012.

PFLANZER, S. B.; CRUZ, A. G.; HATANAKA, C. L.; MAMEDE, P. L.; CADENA, R.; FARIA, J. A. F.; SILVA, M. A. A. P. Perfil sensorial e aceitação de bebida láctea achocolatada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.2, p.391-398, 2010.

PINTO, M.S. **Compostos bioativos de cultivares brasileiras de morango (*Fragaria x ananassa* Duch.)**: caracterização e estudo da biodisponibilidade dos derivados de ácido elágico. São Paulo 2008. 117p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

PINTO, M.S.; CARVALHO, J.E.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I.; SHETTY, K. Evaluation of Antiproliferative, Anti-Type 2 diabetes, and Antihypertension potentials of ellagitannins from strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) using *in vitro* models. **Journal of Medicinal Food**, v.13, n.5, p.1027-1035, 2010.

RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPER, A.M.; REIS FILHO, A.D. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Ciência & Saúde**, v.4, n.2, p.66-74, 2011.

RAMOS, A.C.S.M; STAMFORD, T.L.M.; MACHADO, E.C.L.; LIMA, F.R.B.; GARCIA, E.F.; ANDRADE, S.A. C.; SILVA, C.G.M. Elaboração de bebidas lácteas fermentadas: aceitabilidade e viabilidade de culturas probióticas. **Ciências Agrárias**, Londrina, v.34, n.6, p.2817-2828, 2013.

ROBERFROID, M. Inulin-type fructans: functional food ingredients. **Journal of Nutrition**, v.137, n.11, p.2493S-2502S, 2007.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G.R.; HOYLES, L.; MCCARTNEY, A.L.; RASTALL, R.; ROWLAND, I.; WOLVERS, D.; WATZL, B.; SZAJEWSKA, H.; STAHL, B.; GUARNER, F.; RESPONDEK, F.; WHELAN, K.; COXAM, V.; DAVICCO, M.J.; LÉOTOING, L.; WITTRANT, Y.; DELZENNE, N.M.; CANI, P.D.; NEYRINCK, A.M.; MAHEUST, A. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v.104, p.S1-S63, 2010.

ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z. Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.8, n.3, p.347-352, 2007.

SACCARO, D.M.; HIROTA, C.Y.; TAMIME, A.Y.; OLIVEIRA, M.N. Evaluation of different selective media for enumeration of probiotic micro-organisms in combination with yogurt starter cultures in fermented milk. **African Journal of Microbiology Research**, v.5 n.23, p.3901-3906, 2011.

SAMEC, D.; ZEGARAC, J. P. Postharvest stability of antioxidant compounds in hawthorn and cornelian cherries at room and refrigerator temperatures: comparison with blackberries, white and red grapes. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.131, p.15-21, 2011.

SANTO, A.P.E. **Desenvolvimento de bebida láctea probiótica contendo polpa de frutos nativos do Brasil e fibras de cascas de frutas processadas em São Paulo**. São Paulo, 2012. Dissertação de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

SERRA, A.T.; DUARTE, R.O.; BRONZE, M.R.; DUARTE, C.M.M. Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal. **Food Chemistry**, Barking, v.125, n.2, p.318-325, 2011.

SHAKER, R.R.; JUMAH, R.Y.; ABU-JDAYIL, B. Rheological properties of plain yogurt during coagulation process: impact of fat content and preheat treatment of milk. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 44, n. 3, p. 175-180, 2000.

SHOBHARANI, P.; AGRAWAL, R. Supplementation of adjuvants for increasing the nutritive value and cell viability of probiotic fermented milk beverage. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.60, suppl.6, p.70-83, 2009.

SILVA, F.B. **Efeitos da inulina nas propriedades físico-químicas, sensoriais e de textura de embutido de peito de peru defumado**. Florianópolis, 2010. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina.

SIMEONI, C.P.; ETCHEPARE, M.A.; MENEZES, C.R.; FRIES, L.M.; MENEZES, F.C.; STEFANELLO, F.S. Microencapsulação de probióticos: inovação tecnológica na indústria de alimentos. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.18, p. 66-75, 2014.

SIQUEIRA, A.M.O.; MACHADO, E.C.L. STAMFORD, T.L.M. Bebidas lácteas com soro de queijo e frutas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.9, p.1693-1700, 2013.

SODINI, I.; LUCAS, A.; OLIVEIRA, M.N.; REMEUF, F.; CORRIEU, G. Effect of milk base and starter culture on acidification, texture, and probiotic cell counts in fermented milk processing. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.10, p.2479-2488, 2002.

SOUZA, F.S.; COCCO, R.R.; SARNI, R.O.S.; MALLOZI, M.C.; SOLÉ, D. Prebióticos, probióticos e simbióticos na prevenção e tratamentos de doenças alérgicas. **Revista Paulista de Pediatria**, v.28, n.1, p.86-97, 2010.

SOUZA, V.R. **Compostos bioativos e processamento de pequenas frutas vermelhas cultivadas em clima subtropical**. Lavras, 2013. Tese de Doutorado - Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos - Universidade Federal de Lavras.

TAMIME, A., A. HASSAN, E. FARNWORTH, AND T.T. Structure of fermented milks. In: TAMIME, A., ed. **Structure of dairy products**. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. p.134-169. (Society of Dairy Technology series).

THAMER, K.G.; PENNA, A.L.B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.589-595, 2006.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics – from metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v.18, n.7, p.714–728, 2008.

VATTEM, D.A.; SHETTY, K. Biological functionality of ellagic acid: a review. **Journal of Food Biochemistry**, v.29, n.3, p.234–266, 2005.

ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e pós-acidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.4, p.674-679, 2004.

ZAPPELLINI, E.M.S. **Aspectos relevantes para formação do estudante de nutrição: a diretoria na neurotransmissão**. Florianópolis, 2002. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção – Universidade Federal de Santa Catarina.