

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MANOELLA MOURA MONTEIRO DE JESUS

**AVALIAÇÃO DOS FATORES QUE AFETAM A ESTABILIDADE DE
Lactobacillus acidophilus EM IOGURTE SIMBIÓTICO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

MEDIANEIRA
2017

MANOELLA MOURA MONTEIRO DE JESUS

**AVALIAÇÃO DOS FATORES QUE AFETAM A ESTABILIDADE DE
Lactobacillus acidophilus EM IOGURTE SIMBIÓTICO**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado a disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2, do curso de Engenharia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Medianeira, como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a.Dr^a. Deisy A. Drunkler

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Colla

MEDIANEIRA
2017



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Medianeira
Diretoria de Graduação e Educação Profissional
Coordenação do Curso de Engenharia de Alimentos

Manoella Moura Monteiro de Jesus

Avaliação dos fatores que afetam a estabilidade de *Lactobacillus acidophilus* em iogurte simbiótico

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado como requisito parcial para obtenção de grau de Engenheiro de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Câmpus Medianeira, avaliado pela banca formada pelos professores:

Prof^a.Dr^a. Deisy Alessandra Drunkler
Orientadora

Prof^a.Dr^a. Eliane Colla
Co-orientadora

Prof^a.Dr^a. Denise Pastore de Lima
Membro da Banca

Prof. Dr. Valdemar Padilha Feltrin
Membro da Banca

Manoella Moura Monteiro de Jesus
Aluna

“A folha de aprovação assinada encontra-se na coordenação do curso”

Medianeira, 23 de Novembro de 2017

À Ana Célia Alves de Moura, minha forte e determinada mãe que sempre depositou incentivo, confiança e credibilidade nos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Certamente estes parágrafos não irão atender a todas as pessoas que fizeram parte dessa importante fase de minha vida. Portanto, gostaria de expressar minha imensa gratidão a todos que caminharam comigo durante algum período de minha graduação.

Em especial a minha família Ana, Isabelle, Antonio e Tinks, que mais do que entender as minhas ausências e estresses, me incentivaram a não se conformar com o que já é certo e buscar, com humildade e muito esforço, sempre o que está além dos meus sonhos.

Ao meu namorado e fiel parceiro Denner, que adentrou em minha vida em uma fase tão especial, gostaria de agradecer por toda paciência, incentivo e ajuda durante a elaboração deste trabalho e dizer que sem o seu apoio, tudo teria sido mais difícil.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Deisy A. Drunkler e co-orientadora Prof^a. Dr^a. Eliane Colla, agradeço por todo o conhecimento compartilhado e pela enorme paciência frente às dificuldades encontradas ao decorrer da execução deste trabalho. Agradeço pela disponibilidade e pelo prazer de ser orientada por profissionais como vocês, muito obrigada por tudo! Um agradecimento em especial a Bianca Peron que não mediu esforços para corrigir e fornecer críticas construtivas para a execução deste trabalho, muito obrigada Bia!!!

Aos meus amigos, que se tornaram família com o decorrer dos anos, Jessica Tan, Marcelo Gava e Rafaela Prata, o meu muito obrigado por toda contribuição e momentos vividos que também fizeram parte da construção do meu caráter e do meu desenvolvimento pessoal. Agradeço a imensa ajuda e dedicação de Adriano Lima, Tatiane Oliveira, Luana Nascimento, Felipe Veloso e Karina Carvalho durante a execução deste trabalho. Prova de amizade maior não há, do que se doar pelo outro, muito obrigada!

Por fim, mas não menos importante, agradeço a Deus por me permitir viver e desfrutar com saúde e sabedoria de tantas experiências no decorrer de minha graduação. Serei eternamente grata por todas as graças alcançadas e pelas batalhas vencidas em Seu nome. Entendo hoje que a vida só tem sentido se for vivida ao Seu lado.

RESUMO

JESUS, Manoella Moura Monteiro de. **Avaliação dos fatores que afetam a estabilidade de *Lactobacillus acidophilus* em iogurte simbiótico**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2017.

Os alimentos funcionais têm tido grande atenção e procura por parte dos consumidores devido à preocupação com a saúde e bem-estar. Divididos em várias categorias, os produtos lácteos têm se destacado como alimentos que veiculam inúmeros agentes funcionais, dentre eles os probióticos e prebióticos. Os probióticos são micro-organismos vivos e ativos que conferem benefícios à microbiota intestinal. Por sua vez, os prebióticos são componentes não digeríveis pelo trato digestório, mas fermentáveis por bactérias probióticas estimulando a atividade destas no cólon intestinal. A presença de culturas probióticas adicionadas de ingredientes prebióticos caracteriza um alimento simbiótico. Para que o efeito benéfico seja conferido através da ingestão desse alimento, torna-se necessário que o probiótico encontre-se viável e ativo durante a vida útil do produto, e isto dependerá, dentre outros fatores, do pH, da acidez, da concentração de substrato, do teor de sólidos totais, bem como do tempo e da temperatura de armazenamento. A fim de caracterizar e controlar os fatores e condições ambientais que afetam diretamente o crescimento e a viabilidade das bactérias no iogurte, a modelagem matemática preditiva se apresenta como uma técnica viável e útil. Este trabalho avaliou os efeitos do teor de sólidos totais (10, 12,5 e 15 g.100mL⁻¹), das concentrações do prebiótico inulina (1,5, 2,3 e 3,0 g.100mL⁻¹) e da concentração de sacarose (10, 12,5 e 15 g.100mL⁻¹), sobre a estabilidade do probiótico *Lactobacillus acidophilus* em iogurte durante o prazo de validade de 45 dias, utilizando um Planejamento Fatorial Completo 2³. No período de 15 dias, constatou-se que apenas a sacarose teve efeito negativo estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$), sobre o crescimento do *L. acidophilus*, efeito explicado pelo fenômeno de inibição pelo substrato, causado por quantidades excessivas de substrato no meio. No 30º dia, as interações de sólidos totais com as outras duas variáveis apresentou efeito positivo e no último dia observado, a sacarose bem como sua interação com os sólidos totais influenciaram negativamente o crescimento. Dos 11 ensaios obtidos, os 4 primeiros tratamentos foram considerados ideais por apresentarem as maiores contagens ao longo do tempo de armazenamento. Nestes ensaios a concentração de sacarose estava no nível inferior (10 g.100mL⁻¹) enquanto que a inulina e sólidos totais variaram de 1,5 a 3,0 g.100mL⁻¹ e de 10 a 15 g.100mL⁻¹, respectivamente. Conclui-se que somente um substrato é necessário para aumentar a estabilidade do probiótico sendo este a inulina. Os iogurtes apresentaram contagens de bactérias lácticas superiores a 10⁸ UFC.mL⁻¹. Os ensaios também atenderam ao regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados quanto aos padrões de pH, acidez e teor protéico. Os resultados obtidos demonstraram que a partir das condições de elaboração empregadas foi possível obter um iogurte funcional, com características probióticas e prebióticas, de qualidade e com maior prazo de validade.

Palavras-chave: Leite fermentado. Probióticos. Prebióticos. Alimentos funcionais.

ABSTRACT

JESUS, Manoella Moura Monteiro de. **Evaluation of factors affecting the stability of *Lactobacillus acidophilus* in symbiotic yogurt**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2017.

Functional foods have been given great attention and demand from consumers because of concern for health and well-being. Divided into several categories, dairy products have stood out as foods that carry numerous functional agents, including probiotics and prebiotics. Probiotics are living and active microorganisms that confer benefits to the intestinal microbiota. On the other hand, prebiotics are nondigestible components by the digestive tract, but fermentable by probiotic bacteria stimulating their activity in the intestinal colon. The presence of probiotic cultures added to probiotic ingredients characterizes a symbiotic food. For the beneficial effect to be conferred by ingestion of this food, it is necessary that the probiotic remains viable and active during the product's shelf life, and this will depend, among other factors, on the pH, product's acidity, the substrate concentration, the total solids content, as well as storage time and temperature. In order to characterize and control environmental factors and conditions that directly affect the growth and viability of bacteria in fermented milk, predictive mathematical modeling has been presented as a viable and useful technique. This work evaluated the effects of the total solids content (10, 12.5 and 15 g.100mL⁻¹), prebiotic inulin concentrations (1.5, 2.3 and 3.0 g.100mL⁻¹) and concentration of sucrose (10, 12.5 and 15 g.100mL⁻¹), on the stability of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt during the shelf life of 45 days, through predictive mathematical modeling. In the 15-day period, it was found that only sucrose had a negative statistically significant effect ($p \leq 0,05$) on the growth of *L. acidophilus*, this effect being explained by the substrate inhibition phenomenon caused by excessive amounts of substrate in the medium. On the 30th day, the total solids interactions with the other two variables had a positive effect and on the last day observed, sucrose as well as its interaction with total solids had a negative influence on growth. From the 11 tests obtained, the first 4 treatments were considered ideal because they presented the highest counts over the storage time. In these tests the sucrose concentration was at the lower level (10 g.100mL⁻¹) while inulin and total solids ranged from 1.5 to 3.0 g.100mL⁻¹ and from 10 to 15 g.100mL⁻¹ respectively. It is concluded that only a substrate is needed to increase the stability of the probiotic being this the inulin. Yoghurts presented lactic acid counts higher than 10⁸CFU.mL⁻¹. The tests also met the technical regulation of identity and quality of fermented milks regarding pH, acidity and protein content. The results showed that from the elaboration conditions employed it was possible to obtain a functional yogurt, with probiotic and prebiotic characteristics, of quality and with a longer shelf life.

Key words: Fermented milk. Probiotics. Prebiotics. Functional foods.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DE ELABORAÇÃO DE IOGURTE PROBIÓTICO COM ADIÇÃO DE INULINA..... | 21 |
| FIGURA 2–SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO CRESCIMENTO DE <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA SACAROSE E DE INULINA (%) NO TEMPO DE 15 DIAS DE ARMAZENAMENTO. | 34 |
| FIGURA 3– SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO CRESCIMENTO DE <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA SACAROSE E DE SÓLIDOS TOTAIS (%) NO TEMPO DE 15 DIAS DE ARMAZENAMENTO. | 35 |
| FIGURA 4-SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO CRESCIMENTO DE <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS TOTAIS E CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NO TEMPO DE 45 DIAS DE ARMAZENAMENTO. | 38 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1– MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO (2 ³) COM NÍVEIS REAIS (ENTRE PARÊNTESES) E CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS A SEREM ESTUDADAS..... | 20 |
| TABELA 2– RESULTADOS DE ACIDEZ E PH PARA O PROCESSO FERMENTATIVO | 27 |
| TABELA 3– RESULTADOS DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS IOGURTES ELABORADOS..... | 28 |
| TABELA 4– MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ³ (VALORES REAIS E CODIFICADOS) COM AS RESPOSTAS DE LOG ₁₀ DE UFC.ML ⁻¹ PARA O PROBIÓTICO <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> NOS TEMPOS OBSERVADOS.. | 30 |
| TABELA 5- EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ³ SOBRE A ESTABILIDADE DO PROBIÓTICO <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> DURANTE 45 DIAS. | 32 |
| TABELA 6– COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA A RESPOSTA DE ESTABILIDADE DO PROBIÓTICO <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> APÓS 15 DIAS DE ELABORAÇÃO. | 33 |
| TABELA 7– ANOVA DO MODELO LINEAR PARA PREDIÇÃO DA ESTABILIDADE DE <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> APÓS 15 DIAS DA ELABORAÇÃO. | 34 |
| TABELA 8- COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA A RESPOSTA DE ESTABILIDADE DO PROBIÓTICO <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> APÓS 30 DIAS DE ELABORAÇÃO. | 36 |
| TABELA 9- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA PREDIÇÃO DA ESTABILIDADE DE <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> APÓS 30 DIAS DA ELABORAÇÃO. | 36 |
| TABELA 10- COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA A RESPOSTA DE ESTABILIDADE DO PROBIÓTICO <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> APÓS 45 DIAS DE ELABORAÇÃO. | 37 |
| TABELA 11- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA PREDIÇÃO DA ESTABILIDADE DE <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> APÓS 45 DIAS DA ELABORAÇÃO. | 38 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 9 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 11 |
| 3 | OBJETIVOS | 12 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL..... | 12 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 12 |
| 4 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 13 |
| 4.1 | ALIMENTOS FUNCIONAIS..... | 13 |
| 4.2 | PROBIÓTICOS..... | 14 |
| 4.2.1 | O probiótico <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 15 |
| 4.3 | PREBIÓTICOS | 16 |
| 4.4 | LEITE FERMENTADO..... | 17 |
| 4.5 | MODELAGEM MATEMÁTICA COMO FERRAMENTA NA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS | 18 |
| 5 | MATERIAL E MÉTODOS | 19 |
| 5.1 | MATÉRIAS-PRIMAS E CULTURAS..... | 19 |
| 5.2 | Elaboração do iogurte..... | 19 |
| 5.2.1 | Controle do tempo de fermentação | 21 |
| 5.2.2 | Enumeração dos probióticos viáveis nas diferentes formulações de iogurte | 22 |
| 5.2.3 | Propriedades químicas e físico-químicas dos iogurtes obtidos | 22 |
| 5.2.3.1 | pH..... | 22 |
| 5.2.3.2 | Acidez..... | 23 |
| 5.2.3.3 | Teor de proteína | 24 |
| 5.2.4 | Análise Estatística | 24 |
| 6 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 26 |
| 7 | CONCLUSÃO | 41 |
| 8 | SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS | 42 |
| | REFERÊNCIAS | 43 |

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com a saúde tem gerado uma constante busca por alternativas dentro da alimentação, a fim de equilibrar a necessidade de consumir os nutrientes indispensáveis ao corpo junto aos efeitos proporcionados por estes alimentos. Uma dessas alternativas são os denominados alimentos funcionais que tem o propósito de prevenir ou retardar desconfortos ou doenças por meio de uma alimentação equilibrada. Os principais ingredientes responsáveis pela funcionalidade destes alimentos são as fibras, óleo de peixe, esteróis de plantas, minerais, vitaminas, probióticos e prebióticos (GIANETTI THAMER; LÚCIA; PENNA, 2006).

Alimentos probióticos são aqueles em que há presença de culturas vivas e ativas na sua composição, conferindo benefícios por meio de sua capacidade de resistir ao suco gástrico do estômago, aos sais biliares e as enzimas digestivas, além da capacidade de aderir à mucosa intestinal e produzir substâncias que inibem o crescimento de patógenos, inativação das toxinas, bem como estimulação das respostas imunológicas específicas ou inespecíficas contra agentes patogênicos (VARAVALLO; THOMÉ; TESHIMA, 2008; GALLINA et al., 2011).

Os prebióticos são conhecidos por não serem ingredientes digeríveis pelo trato digestório humano. A inulina, beta-glucana e polidextrose são consideradas prebióticos, pois contribuem para o equilíbrio intestinal. Estes não alteram o valor calórico do alimento, não aumentam o nível de açúcar no sangue e contribuem para com o aumento da absorção de cálcio (GALLINA et al., 2011; BITENCOURT, 2007; GUIMARÃES et al., 2012). Além disso, os prebióticos também podem atuar como substrato para a fermentação realizada por micro-organismos específicos, tais como bifidobactérias e lactobacilos, fornecendo energia para que as bactérias probióticas se multipliquem, bem como evitar a multiplicação de bactérias patogênicas (MOROTI et al., 2009; COSTA et al., 2013). Os prebióticos ainda podem ser utilizados na substituição de gordura em alimentos, pelo fato de possuírem alta capacidade de formação de géis que conferem corpo ao alimento contribuindo para sua viscosidade e cremosidade (COSTA et al., 2013).

Para a efetiva atividade das células presentes nos alimentos probióticos, estas devem se encontrar em condições ideais que as mantenham ativas, viáveis e abundantes no produto durante a vida útil. Durante o armazenamento dos alimentos

probióticos é importante avaliar o meio de interação, ao qual envolve pH, acidez, teor de sólidos totais, tempo e temperatura de armazenamento, bem como características que influenciam na estabilidade das bactérias lácticas probióticas durante este período (GALLINA et al., 2011).

O grau de influência dos fatores avaliados na estabilidade do probiótico pode ser previsto através de estudos sobre o tempo de crescimento, inativação e sobrevivência do *Lactobacillus acidophilus*, bem como as condições de armazenamento sob a ação destes fatores. A modelagem preditiva permite a avaliação da estabilidade e, conseqüentemente, da viabilidade, dentro do prazo de validade do produto correlacionando todos os fatores influentes na sobrevivência do micro-organismo utilizado (NIKMARAM et al., 2016). Para atender aos benefícios propostos e as condições anteriores ao vencimento, entende-se como necessário identificar os fatores e otimizar a estabilidade do micro-organismo utilizado, permitindo então que sua contagem permaneça viável neste período.

2 JUSTIFICATIVA

Para manter a viabilidade, atividade e abundância das culturas utilizadas no produto final, que são influenciadas por fatores como o teor de sólidos totais, presença do prebiótico inulina e concentração de açúcar, é necessário que modelos sejam elaborados visando otimizar a viabilidade destes em função destas variáveis.

A fim de caracterizar os fatores e condições ambientais que afetam diretamente o crescimento, sobrevivência e inativação das bactérias no leite fermentado, a modelagem matemática preditiva se apresenta como uma técnica aplicável (NIKMARAM et al., 2016). O estudo da estabilidade de bactérias probióticas também permite a promoção de informações úteis ao consumidor que determinam fatores como, temperatura ideal de armazenamento e possíveis ações benéficas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar fatores relacionados a formulação do iogurte que influenciam na estabilidade de *Lactobacillus acidophilus* durante o período de armazenamento.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o efeito do teor de sólidos totais, concentração de inulina e concentração de sacarose sobre a estabilidade de *Lactobacillus acidophilus* em iogurte utilizando um Planejamento Fatorial Completo do tipo 2^3 (11 ensaios com 3 pontos centrais).
- Caracterizar as propriedades físico-químicas através do pH, acidez e teor de proteína dos iogurtes obtidos.
- Quantificar o número de células probióticas viáveis no leite fermentado durante sua vida útil.
- Construir e validar um modelo matemático que descreva a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* em iogurte em função das variáveis estudadas.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

O termo “Alimentos Funcionais” surgiu primariamente no Japão, por volta dos anos 80, referindo-se àqueles alimentos que além de seu valor nutritivo auxiliavam em funções específicas do corpo devido alguma substância presente nos mesmos (GALLINA et al., 2011). A legislação brasileira não define alimento funcional, mas sim a alegação de propriedade funcional, como “aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano” (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 1999).

Visando o equilíbrio na alimentação que promove os nutrientes necessários ao corpo humano, a indústria de alimentos compreendeu a necessidade de menos açúcar, gorduras saturadas, carboidratos e sal, e mais fibras (WILKINSON, 2002). Alguns dos componentes que caracterizam o alimento como funcional são as fibras dietéticas, os probióticos, os prebióticos, os compostos funcionais, as vitaminas e os minerais essenciais (COSTA et al., 2013).

Segundo o Instituto Internacional de Pesquisa de Mercado (*Euromonitor International*), em 2015, bebidas funcionais e fortificadas no Brasil registraram uma taxa de crescimento de 11% nas vendas em valor, ligeiramente mais baixo do que no ano anterior, que atingiu R\$ 8,2 bilhões. É esperado para o mercado de bebidas funcionais alcançar um valor de 7% a preços constantes de 2015 durante o período de previsão, e chegar a R\$ 11,6 bilhões em 2020. Estes produtos provavelmente continuarão a atrair a atenção dos consumidores devido à crescente busca de um estilo de vida mais saudável. Além disso, o aumento da disponibilidade de produtos que promovem benefícios tais como controle de peso e propriedades digestivas, por exemplo, os produtos de desintoxicação, irá contribuir para impulsionar as vendas maiores nesta categoria do que as versões de açúcar reduzidos. (EUROMONITOR INTERNATIONAL, 2016). Os alimentos funcionais representam grande área de estudo em todo o mundo. De acordo com estimativas, o mercado brasileiro de

produtos funcionais cresce cerca de 20% ao ano, no qual os iogurtes em geral representam 80% do setor de refrigerados (GALLINA et al., 2011).

4.2 PROBIÓTICOS

O termo probiótico foi apresentado por Richard Parker em 1960, a partir do conhecimento de que os micro-organismos eram favoráveis à saúde humana, ele definiu os probióticos como “a favor da vida” (BARBOSA et al., 2011). Atualmente, a Organização Mundial de Saúde junto com a Organização de Agricultura e Alimentos definem probióticos como: “micro-organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002).

Os efeitos provocados pelos probióticos são o fortalecimento do sistema imunológico, a disposição de uma barreira de proteção no intestino que atua na prevenção de patógenos na microbiota, o auxílio na digestão da lactose, efeito anticarcinogênico e a redução do nível de colesterol (VARAVALLO et al., 2008; STEFE; ALVES; RIBEIRO, 2008). Além destes efeitos, estudos indicam ação descontaminante do leite (OLIVEIRA, 2006).

Os gêneros mais utilizados como agentes probióticos em alimentos são *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, em menor escala, a espécie *Enterococcus faecium*. No Brasil, as espécies aprovadas para uso como probióticos são as espécies *L. acidophilus*, *L. casei shirota*, *L. casei variedade rhamnosus*, *L. casei variedade defensis*, *L. paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *B. longum* e *Enterococcus faecium* (SAAD, 2006; BRASIL, 2007).

O gênero *Lactobacillus* geralmente impede a multiplicação e inibe a ação de agentes patógenos na microbiota, auxilia no tratamento e prevenção de diarreia, facilita a digestão da lactose e inibe o crescimento de *Helicobacter pylori*. O gênero *Bifidobacterium* é responsável pelo fortalecimento do sistema imunológico, atividade anticarcinogênica e pela produção de vitaminas, que é estimulada pela presença de prebióticos, tais como B1, B2, B6, B12 e ácidos nicotínico e fólico (STEFE et al., 2008).

A presença destas bactérias faz com que haja um aumento no valor nutritivo e terapêutico dos alimentos, por meio do aumento dos níveis de vitaminas do complexo B e aminoácidos. Os micro-organismos probióticos devem se manter vivos e viáveis promovendo uma contagem final de bactérias lácticas de, no mínimo, 10^6 Unidades Formadoras de Colônias/grama (UFC.g⁻¹) durante o tempo de vida de prateleira do alimento para que seus benefícios sejam garantidos e eficazes (DOROTA et al., 2014).

A viabilidade dos probióticos depende de fatores como o pH, temperatura de armazenamento, nível de oxigênio e presença de micro-organismos competidores e inibidores (MATTILA-SANDHOM et al., 2002). Os valores de pH e acidez são importantes pois podem promover alterações visíveis no produto final, tais como a separação de fase o que provoca uma rejeição sensorial. A redução do pH diminui a contagem de micro-organismos probióticos viáveis em leites fermentados (COSTA et al., 2013). O teor de sólidos totais influencia na acidez titulável e no tempo de coagulação (BARBOSA et al., 2011; GIANETTI THAMER et al., 2006). O uso de ingredientes prebióticos pode auxiliar na estabilidade dos probióticos, pois eles podem servir como substrato para micro-organismos benéficos como os probióticos.

Alguns fatores podem interferir nos benefícios propostos pela presença de bactérias probióticas e a partir do conhecimento e controle destes fatores é possível concluir que com a utilização do probiótico adequado, administrado da maneira correta e no tempo e temperatura indicada, pode-se obter os efeitos benéficos desejados (LEITE, 2015).

4.2.1 O probiótico *Lactobacillus acidophilus*

As bactérias lácticas constituem um grupo de micro-organismos que são conhecidos por promoverem efeitos benéficos à saúde humana, sendo bastante utilizada com este propósito pela indústria de alimentos. Dentro do gênero *Lactobacillus*, pertencente ao grupo de bactérias lácticas, o *Lactobacillus acidophilus*, caracterizado como um micro-organismo probiótico, se destaca por ser uma das espécies que possui propriedades aderentes facilitando a colonização do trato digestório (BRZOZOWSKI; BEDNARSKI; DZIUBA, 2009).

Estes micro-organismos habitam o trato digestório de humanos e animais e se apresentam em forma de bastonetes isolados ou em cadeias curtas, com crescimento ótimo que ocorre entre 37°C e 41°C e em pH entre 6 e 7. Micro-organismos deste gênero são homofermentativos, ou seja, realizam a fermentação e produzem ácido láctico a partir da lactose (OLIVEIRA, 2006).

Dentre os benefícios impostos pelos probióticos, o *Lactobacillus acidophilus*, quando em quantidades suficientes, atua diretamente na promoção de barreiras que agem contra micro-organismos patogênicos, auxilia na digestão da lactose através da produção da enzima β -galactosidase que degrada este açúcar tornando-o digerível, reduz os níveis de colesterol, inibi o crescimento de *Helicobacter pylori*, melhora o estímulo do sistema imunológico e aumenta a qualidade nutricional do alimento (ZHAO et al., 2007; STEFE et al., 2008). As substâncias antagônistas produzidas por bactérias lácticas probióticas correspondem a metabólitos como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, radicais livres, diacetileno, acetaldeído, isômeros D de aminoácidos e especialmente bacteriocinas; que constituem proteínas e peptídeos com atividade antibacteriana (DUARTE et al., 2016).

4.3 PREBIÓTICOS

Segundo Quigley (2010), os prebióticos são componentes não digeríveis, mas fermentescíveis que estimulam a atividade de bactérias benéficas já existentes no cólon do hospedeiro. Os prebióticos interagem principalmente com a microbiota do cólon, mas também são conhecidos por modularem a função imune em outros sistemas como na cavidade oral, trato urogenital e intestino delgado. Os tipos mais comuns de prebióticos são os fruto-oligossacarídeos (FOS), inulina, beta-glucana galacto-oligossacarídeos (GOS), lactulose e polidextrose (ZACARCHENCO et al., 2013).

Fruto-oligossacarídeos (FOS), oligômeros de frutose, são fibras alimentares solúveis prebióticas, devido à sua configuração química são resistentes as enzimas digestivas, o que permite que cheguem intactos ao intestino grosso onde são fermentados por bactérias benéficas exercendo seu efeito prebiótico (SANTOS et al., 2013). A inulina, encontrada naturalmente em vegetais, é considerada uma fibra

alimentar solúvel e prebiótica devido a sua função exercida no organismo, que consiste no aumento da população microbiana a partir da fermentação realizada por bactérias como bifidobactérias e lactobacilos (ZACARCHENCO et al., 2013). A inulina e os FOS sofrem pouca hidrólise no estômago e no intestino delgado, ou seja, sua glicose não é totalmente absorvida pelo organismo, o que faz desse nutriente um tipo de açúcar que pode ser usado por diabéticos, pois não altera o índice glicêmico (GAZELOTO et al., 2015).

Os prebióticos possuem como principais efeitos o aumento da absorção de cálcio, efeito fibra, incentivo a produção de vitaminas e o efeito bifidogênico, que consiste no estímulo do crescimento intestinal das bifidobactérias (STEFE et al., 2008).

Os alimentos simbióticos resultam da combinação de ingredientes prebióticos em culturas probióticas, o que facilita a sobrevivência da bactéria probiótica no alimento e nas condições do meio gástrico, permitindo que o alimento confira os efeitos funcionais propostos (STEFE et al., 2008).

4.4 LEITE FERMENTADO

Segundo a Instrução Normativa (IN) número 46 de 2007 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que apresenta o regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados, “leite fermentado é o produto obtido por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica através da ação de micro-organismos específicos, onde estes micro-organismos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade” (BRASIL, 2007). Incluso neste padrão existe uma classificação que os separa em iogurte, leite fermentado ou cultivado, leite acidófilo ou acidofilado, *kefir*, *kumys* e coalhada ou *cuajada*, diferenciando em cultura utilizada e processamento.

A partir desta classificação, o iogurte é elaborado a partir da fermentação realizada pelas bactérias *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, podendo ser acrescido ou não de outras bactérias ácido-lácticas. Para se caracterizar como um produto probiótico e,

conseqüentemente funcional, o iogurte deve conter além das culturas características, um ou vários dos seguintes cultivos dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (BRASIL, 2007).

O leite fermentado mais conhecido e consumido no Brasil é o iogurte, onde uso de probióticos, como agentes “biotecnológicos” vêm sendo estudado, pois estes agentes melhoram as características do produto tradicional, como reduzir a pós-acidificação do iogurte, fato evidenciado pela ação de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* ssp. ou como “agentes terapêuticos”, promovendo efeitos benéficos nos indivíduos que os ingerem (GALLINA et al., 2011).

4.5 MODELAGEM MATEMÁTICA COMO FERRAMENTA NA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS

O estudo da viabilidade e estabilidade de bactérias probióticas permite a promoção de informações úteis ao consumidor que determinam fatores como a temperatura de armazenamento ideal e possíveis ações benéficas. A investigação desses fatores permite prever o tempo e as causas que influenciam ou reduzem a ação dos micro-organismos que conferem os efeitos funcionais ao alimento.

A tolerância dos probióticos as condições de pH ácido, presença de sais biliares e oxigênio influenciam na sobrevivência destes micro-organismos tendo que ser controlados para garantir a estabilidade desta cultura até o final do prazo de validade do alimento (OLIVEIRA, 2006). A fim de caracterizar e controlar os fatores e condições ambientais que afetam diretamente o crescimento, sobrevivência e inativação das bactérias no leite fermentado, a modelagem matemática preditiva se apresenta como uma técnica aplicável (NIKMARAM et al., 2016).

A modelagem se baseia na hipótese de que o efeito das propriedades dos leites fermentados, como pH, acidez, contagem de micro-organismos, teor de sólidos totais, temperatura de armazenamento, entre outras, influenciam na viabilidade probiótica dessas bebidas o que pode ser previsto através de modelos matemáticos derivados de estudos quantitativos dos micro-organismos (DALCANTON, 2010).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATÉRIAS-PRIMAS E CULTURAS

As matérias-primas utilizadas, água mineral sem gás (Fontana Oro[®], Pirâmide, Cascavel, Paraná, Brasil), leite em pó desnatado (Elegê[®], Lactalis do Brasil – Comércio, Importação e Exportação de Laticínios Ltda., Teutônia, Rio Grande do Sul, Brasil) e o açúcar refinado (Alto Alegre[®], Usina Alto Alegre S.A. Açúcar e Álcool, Colorado, Paraná, Brasil) foram adquiridos no comércio local. As culturas probiótica *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (FERMENTO FD-DVS NUTRISH LA-5, CHR Hansen) e *starter* para a elaboração do iogurte (FERMENTO DVS YF L812, CHR Hansen) foram adquiridas da empresa LC Bolonha Ingredientes, o prebiótico Inulina (Orafti[®], BENEIO) foi gentilmente cedido pela empresa SweetMix. Os meios de cultura utilizados nas análises microbiológicas foram adquiridos da empresa Induslab da marca Kasvi[®].

5.2 ELABORAÇÃO DO IOGURTE

Para avaliar o efeito das variáveis teor de sólidos totais, concentração do prebiótico inulina e concentração de sacarose sobre a estabilidade de *Lactobacillus acidophilus* em iogurte simbiótico foi realizado um Planejamento Fatorial Completo 2³ (11 ensaios com 3 pontos centrais). A variável resposta avaliada foi a enumeração do *Lactobacillus acidophilus* La-5 nos tempos de armazenamento de 15 dias, 30 dias e 45 dias, a temperatura de 4°C. Na Tabela 1 está apresentada a matriz do planejamento com os níveis reais e codificados das variáveis estudadas.

Tabela 1– Matriz do Planejamento Fatorial Completo (2³) com Níveis Reais (entre parênteses) e Codificados das Variáveis a serem Estudadas.

| Ensaio | x ₁ ^a | x ₂ ^b | x ₃ ^c |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 | -1 (10) | -1 (1,5) | -1 (10) |
| 2 | +1 (15) | -1 (1,5) | -1 (10) |
| 3 | -1 (10) | +1 (3,0) | -1 (10) |
| 4 | +1 (15) | +1 (3,0) | -1 (10) |
| 5 | -1 (10) | -1 (1,5) | +1 (15) |
| 6 | +1 (15) | -1 (1,5) | +1 (15) |
| 7 | -1 (10) | +1 (3,0) | +1 (15) |
| 8 | +1 (15) | +1 (3,0) | +1 (15) |
| 9 | 0 (12,5) | 0 (2,3) | 0 (12,5) |
| 10 | 0 (12,5) | 0 (2,3) | 0 (12,5) |
| 11 | 0 (12,5) | 0 (2,3) | 0 (12,5) |

Fonte: Autoria própria (2017).

Notas:^aconcentração de sólidos totais (g.100 mL⁻¹); ^bconcentração de prebiótico (inulina) (g.100 mL⁻¹); ^cconcentração de açúcar (g.100 mL⁻¹). x₁, x₂ e x₃ são variáveis codificadas.

Os ensaios foram conduzidos em frascos Schott de 1000 mL com 700 mL de água mineral adicionados de leite em pó desnatado, inulina e açúcar refinado nas concentrações definidas pelo planejamento (tabela 1). A elaboração seguiu a metodologia proposta por Capitani et al. (2014), conforme o fluxograma apresentado na Figura 1.

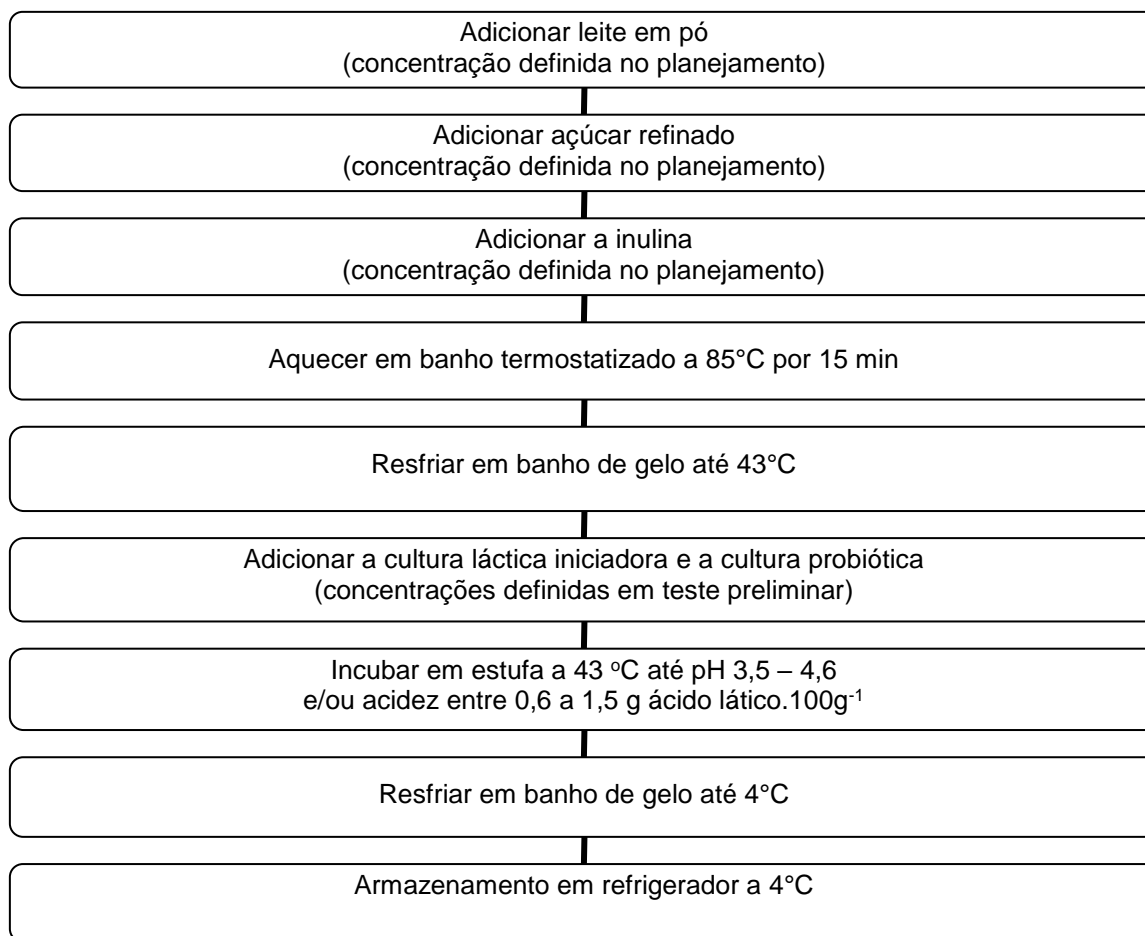


Figura 1 – Fluxograma das Etapas de Elaboração de logurte Probiótico com Adição de Inulina.
Fonte: Adaptado de Capitani et al. (2014).

5.2.1 Controle do tempo de fermentação

O controle do tempo de fermentação foi realizado de acordo com as medidas de pH e acidez titulável em ácido láctico dos diferentes tratamentos, realizadas em intervalos de uma hora. O término do processo fermentativo foi determinado pela legislação ao atingir de 0,6 a 1,5 g de ácido láctico.100g⁻¹ e/ou pH entre 3,5 e 4,6 (NORMA FIL 150:1991; BRASIL, 2007).

5.2.2 Enumeração dos probióticos viáveis nas diferentes formulações de iogurte

A enumeração de *L. acidophilus* foi com base no método proposto por Duarte et al. (2016), onde a contagem foi realizada em ágar Man Rugosa Sharpe (MRS) por semeadura em profundidade. Os ensaios foram plaqueados com três diluições definidas em teste preliminar (10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}) em duplicata, cujas placas foram incubadas em jarra de anaerobiose em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas.

Após incubação das placas, as que apresentaram colônias brancas e leitosas, circulares e com bordas bem definidas foram selecionadas para o teste de confirmação. Esfregaços em lâminas de vidro corados pelo método de Gram foram confeccionados para observação em microscopia das características morfológicas das colônias, assim como foi realizada a prova da catalase com adição de peróxido de hidrogênio 3% às lâminas. Os cultivos que apresentaram prova da catalase negativa e presença de bastonetes Gram positivos foram confirmados como *Lactobacillus acidophilus*.

5.2.3 Propriedades químicas e físico-químicas dos iogurtes obtidos

As análises das propriedades químicas e físico-químicas nos iogurtes foram realizadas avaliando pH, acidez e conteúdo proteico.

5.2.3.1 pH

Os valores de pH foram determinados utilizando o método potenciométrico com leitura direta em pHmetro digital de bancada (pH 21; pHmV meter 21, HANNA, Amorim, Portugal), de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008). A aferição do pH foi realizada com o auxílio de um phmêtro que realiza suas leituras com faixa de 0 a 14. As leituras dos 11 ensaios foram conduzidas em

intervalos de uma hora durante o período de 6 horas, que determinou o término da fermentação.

5.2.3.2 Acidez

A acidez foi determinada por titulação de acordo com o método descrito pela AOAC, 925.21 (2016). A acidez de cada ensaio foi medida a cada uma hora durante o período de fermentação. Amostras de 10 mL de cada ensaio foram dispostas em béqueres de 50 mL e após a adição de 4 gotas de fenolftaleína 1%, os béqueres foram dispostos na saída da bureta preenchida com a solução alcalina padronizada. A solução alcalina utilizada foi o NaOH 0,1 N com fator de correção igual a 0,9091. A amostra foi titulada até adquirir coloração levemente rosa. O volume de NaOH gasto na titulação foi anotado e convertido para gramas de ácido láctico.100 g⁻¹ pela equação (1).

$$\textit{Acidez em ácido láctico } \% = \frac{V \cdot fc \cdot 0,9}{A} \quad (1)$$

Sendo,

V= n° de mL da solução de hidróxido de sódio 0,1 N gasto na titulação

Fc = fator de correção do NaOH 0,1 N

A = n° de mL da amostra

0,9 = fator de conversão para ácido láctico

5.2.3.3 Teor de proteína

O teor de proteína foi determinado segundo o método de micro-Kjeldahl e convertido em proteína bruta pelo fator 6,38, segundo descrito pela AOAC, 991.20 e 991.23 (2016).

Após pesados 1,5 gramas de amostra para cada ensaio, o mesmo foi inserido nos tubos de digestão juntamente com um catalisador e alocados no bloco digestor, onde ocorreu o aquecimento da amostra, chegando até a 420°C a partir da adição de ácido sulfúrico 0,1 N até a observação da oxidação do carbono e do hidrogênio, que se dá pela aparição de uma cor verde límpida nos tubos.

Posterior a digestão, as amostras foram destiladas no aparelho de destilação de micro-Kjeldahl com a adição de NaOH a 50% e contaram com um erlenmeyer com ácido bórico a 4% acoplado a este equipamento, formando o borato de amônio que foi então titulado com solução de ácido sulfúrico padronizada. O volume gasto nesta titulação foi anotado e convertido para % proteica conforme a equação (2).

$$\% \textit{Proteína} = \frac{K.V. \cdot 6,38}{P} \quad (2)$$

Sendo,

$K = Fc \cdot 0,0014 \cdot 100$

$Fc =$ fator de correção da solução de ácido sulfúrico 0,1 N = 0,9619

$V =$ volume de ácido gasto na titulação

$P =$ massa da amostra em gramas = 1,5 gramas

5.2.4 Análise Estatística

Os resultados foram tratados com o programa STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc. 2325 East 13th Street, Tulsa, OK, 74104, USA), onde uma análise de regressão

múltipla foi aplicada para ajustar o modelo matemático aos dados experimentais e a adequacidade do modelo foi avaliada por análise de variância (ANOVA).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. CONTROLE DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO

O término do processo fermentativo foi observado ao atingir a acidez média para todos os ensaios de 0,80 g de ácido lácteo.100 g⁻¹ e pH médio para todos os ensaios de 3,92, que foi atingido após 6 horas de fermentação, a qual se encontra dentro da faixa preconizada pela legislação brasileira (NORMA FIL 150:1991; BRASIL, 2007). Os valores encontrados para o final da fermentação (tabela 3) podem ser comparados aos obtidos por Capitani et al. (2014) que foram pH variando de 4,42 a 4,83 e acidez variando de 0,60 a 0,86 g de ácido lácteo.100g⁻¹, que estudou a caracterização de iogurtes adicionados de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium spp.* como agentes probióticos e polidextrose, utilizada como prebiótico. As diferenças encontradas se devem as diferenças de prebióticos e probióticos utilizados em cada trabalho. Leite (2015), encontrou em sua tese a partir da elaboração de iogurtes simbióticos pH variando de 4,45 a 4,55 e acidez de 0,70 a 0,75 g de ácido láctico.100g⁻¹. É possível concluir que além de estar de acordo com a legislação, os iogurtes elaborados neste trabalho apresentaram acidez e pH aceitáveis conforme os encontrados pelos autores citados.

Tabela 2– Resultados de Acidez e pH para o Processo Fermentativo

| Ensaio | x ₁ ^a | x ₂ ^b | x ₃ ^c | Acidez ^d | pH | Tempo de fermentação ^e |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------|-------------|-----------------------------------|
| 1 | -1 (10) | -1 (1,5) | -1 (10) | 0,43 ± 0,16 | 5,55 ± 0,84 | 6 |
| 2 | +1 (15) | -1 (1,5) | -1 (10) | 0,63 ± 0,23 | 4,87 ± 0,95 | 5 |
| 3 | -1 (10) | +1 (3,0) | -1 (10) | 0,46 ± 0,17 | 5,43± 0,91 | 6 |
| 4 | +1 (15) | +1 (3,0) | -1 (10) | 0,62 ± 0,24 | 4,81± 1,01 | 5 |
| 5 | -1 (10) | -1 (1,5) | +1 (15) | 0,46 ± 0,16 | 5,49± 0,87 | 6 |
| 6 | +1 (15) | -1 (1,5) | +1 (15) | 0,56 ± 0,18 | 4,93± 0,93 | 5 |
| 7 | -1 (10) | +1 (3,0) | +1 (15) | 0,43 ± 0,14 | 5,70± 0,68 | 6 |
| 8 | +1 (15) | +1 (3,0) | +1 (15) | 0,50 ± 0,15 | 5,04± 0,86 | 6 |
| 9 | 0 (12,5) | 0 (2,3) | 0 (12,5) | 0,52 ± 0,16 | 5,22± 0,94 | 6 |
| 10 | 0 (12,5) | 0 (2,3) | 0 (12,5) | 0,56 ± 0,19 | 5,19± 0,94 | 6 |
| 11 | 0 (12,5) | 0 (2,3) | 0 (12,5) | 0,55 ± 0,25 | 4,98 ± 0,99 | 6 |
| 12 | 0 (12,5) | 0 (2,3) | 0 (12,5) | 0,54 ± 0,21 | 4,97 ± 0,96 | 6 |

Fonte: Autoria própria (2017).

Notas:^aconcentração de sólidos totais (g. 100 mL⁻¹); ^bconcentração de prebiótico (inulina) (g.100 mL⁻¹); ^cconcentração de açúcar (g. 100 mL⁻¹);^dacidez média da fermentação(g de ácido láctico. 100 mL⁻¹); ^etempo de fermentação (horas).

6.2. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS IOGURTES

Todos os ensaios tiveram acompanhamento de pH e acidez titulável realizado hora a hora durante o processo de elaboração, devido ao fato destas análises confirmarem o final da fermentação, quando atingem os valores estabelecidos pela legislação. No dia seguinte a elaboração dos ensaios, realizou-se a determinação do teor de proteína total e os resultados desta e das outras análises estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3– Resultados das Análises Físico-químicas dos Iogurtes Elaborados.

| Ensaio | x ₁ ^a | x ₂ ^b | x ₃ ^c | Proteínas (%) | pH* | Acidez (g ác. Lático.100 ⁻¹)* |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------|------------|---|
| 1 | -1 (10) | -1 (1,5) | -1 (10) | 2,89 ± 0,48 | 4,49± 0,04 | 0,67± 0,01 |
| 2 | +1 (15) | -1 (1,5) | -1 (10) | 4,95± 0,44 | 3,78± 0,02 | 1,00± 0,03 |
| 3 | -1 (10) | +1 (3,0) | -1 (10) | 3,71± 0,05 | 4,22± 0,04 | 0,69± 0,02 |
| 4 | +1 (15) | +1 (3,0) | -1 (10) | 6,19± 0,04 | 3,63± 0,04 | 1,03± 0,04 |
| 5 | -1 (10) | -1 (1,5) | +1 (15) | 2,99± 0,02 | 4,31± 0,03 | 0,68± 0,01 |
| 6 | +1 (15) | -1 (1,5) | +1 (15) | 5,19± 0,22 | 3,96± 0,01 | 0,83± 0,02 |
| 7 | -1 (10) | +1 (3,0) | +1 (15) | 3,16± 0,29 | 4,75± 0,03 | 0,64± 0,03 |
| 8 | +1 (15) | +1 (3,0) | +1 (15) | 3,06± 0,22 | 4,16± 0,04 | 0,73± 0,03 |
| 9 | 0 (12,5) | 0 (2,3) | 0 (12,5) | 3,68± 0,07 | 4,13± 0,01 | 0,73± 0,01 |
| 10 | 0 (12,5) | 0 (2,3) | 0 (12,5) | 3,64± 0,09 | 4,01± 0,01 | 0,81± 0,01 |
| 11 | 0 (12,5) | 0 (2,3) | 0 (12,5) | 3,78± 0,05 | 3,72± 0,02 | 1,01± 0,01 |

Fonte: Autoria própria (2017).

Nota: ^aconcentração de sólidos totais (g. 100 mL⁻¹); ^bconcentração de prebiótico (inulina) (g.100 mL⁻¹); ^cconcentração de açúcar (g. 100 mL⁻¹);*Respostas obtidas após 6 horas de fermentação ± erro padrão.

Observa-se que após 6 horas sob a temperatura de 43°C, a fermentação foi concluída para todos os ensaios e os parâmetros de pH e acidez se encontraram dentro da faixa determinada pela legislação (BRASIL, 2007).

Os resultados físico-químicos encontrados neste trabalho foram semelhantes aos resultados de Capitani et al. (2014) que desenvolveram um iogurte simbiótico, com *Lactobacillus acidophilus* e polidextrose, com diferença no prebiótico utilizado, o que possivelmente justifica as divergências nas respostas das análises. Para os autores, os teores de proteína variaram de 2,9 a 5,1% no dia da elaboração, onde o maior teor encontrado foi no ensaio que recebeu a maior quantidade de leite em pó, o que contribuiu para o aumento do conteúdo proteico. Equiparando os resultados deste trabalho ao encontrado por Leite (2015), que teve variação de teor proteico de 2,9 a 4,07%, tem-se que os resultados encontrados neste trabalho são semelhantes exceto pelo menor conteúdo proteico encontrado nos iogurtes simbióticos elaborados, explicados pelo aumento do teor de polpa de açaí.

Os teores de proteína encontrados um dia após a elaboração tiveram variação de 2,89 a 6,19%, os maiores níveis proteicos encontrados também foram nos ensaios que receberam as maiores concentrações de sólidos, os ensaios 2, 4, 6 e 8 que tiveram variação de 3,06 a 6,19%, resultados que confirmam que quanto

maior teor de sólidos totais houver, maior conteúdo proteico (CAPITANI et al., 2014). Conforme a resolução nº46 do MAPA que dispõe sobre o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados, o iogurte deve apresentar no mínimo 2,9 g/100g de proteína láctea, ao observar a Tabela 2, percebe-se que todos os ensaios atenderam os requisitos da resolução do nº46 MAPA e que o iogurte desenvolvido pode ser aceito como alimento funcional (BRASIL, 2007).

6.3. ANÁLISE DOS FATORES QUE AFETAM A ESTABILIDADE DE *Lactobacillus acidophilus*

Para a avaliação do crescimento celular utilizou-se um meio prebiótico que recebeu o probiótico avaliado a fim de entender quais condições contribuem para sua estabilidade durante o maior período de tempo observado, igual a 45 dias. A viabilidade dos probióticos depende de fatores como o pH, temperatura de armazenamento, nível de oxigênio e presença de micro-organismos competidores e inibidores (MATTILA-SANDHOM et al., 2002). O uso de leite desnatado reconstituído foi escolhido pela influência observada por Barbosa et al. (2011) e Gianetti et al. (2006) sobre a acidez titulável e no tempo de coagulação. Segundo Costa et al. (2013), a redução do pH diminui a contagem de micro-organismos probióticos e por auxiliar na estabilidade destes micro-organismos, optou-se por adicionar um ingrediente prebiótico (inulina) para servir como substrato para o *Lactobacillus acidophilus*.

A análise dos resultados das contagens foi feita de forma particular para cada tempo de armazenamento, onde o tempo de elaboração serviu apenas como base de comparação com os demais tempos para que o comportamento das colônias pudesse ser observado. Os tempos que atingiram contagens dentro dos parâmetros de crescimento estabelecidos foram o tempo de elaboração, de 15 dias, 30 dias e o de 45 dias após elaboração, cujos resultados estão apresentados na Tabela 4.

Comparando-se as respostas dos pontos centrais do planejamento com os resultados obtidos para os demais ensaios, verifica-se que houve uma redução considerável na presença de colônias de *L. acidophilus* conforme o tempo

observado. Na elaboração, o menor valor observado entre as respostas do planejamento foi de 8,95 \log_{10} de UFC.mL⁻¹, no ensaio 7, e o maior valor foi de 10,09 \log_{10} de UFC.mL⁻¹, no ensaio 2. Após 15 dias da elaboração, o menor valor observado foi de 8,37 \log_{10} de UFC.mL⁻¹, no ensaio 5, e o maior valor foi de 9,71 \log_{10} de UFC.mL⁻¹, no ensaio 1. No tempo de 30 dias de elaboração, a maior contagem foi observada no ensaio 1 que foi igual a 8,58 \log_{10} de UFC.mL⁻¹, e a menor contagem foi do ensaio 2, que foi igual a 7,41 \log_{10} de UFC.mL⁻¹. Por fim, no último tempo observado, após 45 dias da elaboração o maior crescimento foi no ensaio 7, igual a 7,59 \log_{10} de UFC.mL⁻¹, e o menor crescimento foi no ensaio 6, igual a 6,30 \log_{10} de UFC.mL⁻¹.

Com exceção do tempo de 30 dias após a elaboração, todos os outros tempos observados tiveram menor crescimento nos ensaios 6, 7 e 8, que são os ensaios que receberam a maior concentração de sacarose, fator este que pode ser identificado como um potencial inibidor de crescimento. Ao considerar a segunda menor contagem observada para 30 dias, se tem o ensaio 7 com 7,81 \log_{10} de UFC.mL⁻¹, que também faz parte dos ensaios com maior concentração de sacarose, reforçando a hipótese de inibição por este substrato.

Tabela 4– Matriz do Planejamento Fatorial Completo 2³ (valores reais e codificados) com as respostas de \log_{10} de UFC.mL⁻¹ para o probiótico *Lactobacillus acidophilus* nos tempos observados.

| Ensaio | x ₁ ^a | x ₂ ^b | x ₃ ^c | y ₁ ^d | y ₁ ^e | y ₂ ^f | y ₃ ^g |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 | -1 (10) | -1 (1,5) | -1 (10) | 9,82 | 9,71 | 8,58 | 7,30 |
| 2 | +1 (15) | -1 (1,5) | -1 (10) | 10,09 | 9,35 | 7,41 | 7,54 |
| 3 | -1 (10) | +1 (3,0) | -1 (10) | 9,29 | 9,23 | 8,24 | 7,48 |
| 4 | +1 (15) | +1 (3,0) | -1 (10) | 9,49 | 9,26 | 8,48 | 7,56 |
| 5 | -1 (10) | -1 (1,5) | +1 (15) | 9,91 | 8,37 | 8,21 | 7,28 |
| 6 | +1 (15) | -1 (1,5) | +1 (15) | 9,22 | 9,11 | 8,37 | 6,30 |
| 7 | -1 (10) | +1 (3,0) | +1 (15) | 8,95 | 8,58 | 7,81 | 7,59 |
| 8 | +1 (15) | +1 (3,0) | +1 (15) | 8,99 | 8,54 | 8,37 | 6,60 |
| 9 | 0 (12,5) | 0 (2,3) | 0 (12,5) | 9,39 | 9,08 | 8,28 | 7,53 |
| 10 | 0 (12,5) | 0 (2,3) | 0 (12,5) | 9,63 | 9,04 | 8,32 | 7,51 |
| 11 | 0 (12,5) | 0 (2,3) | 0 (12,5) | 9,38 | 9,03 | 8,25 | 7,58 |

Fonte: Autoria própria (2017).

Notas: ^aconcentração de sólidos totais (g. 100 mL⁻¹); ^bconcentração de prebiótico (inulina) (g.100 mL⁻¹); ^cconcentração de açúcar (g. 100 mL⁻¹); ^d \log_{10} de UFC.mL⁻¹ no dia da elaboração; ^e \log_{10} de UFC.mL⁻¹ de 15 dias; ^f \log_{10} de UFC.mL⁻¹ de 30 dias; ^g \log_{10} de UFC.mL⁻¹ de 45 dias.

Analisando-se os resultados da Tabela 4 foi possível calcular os efeitos das três variáveis estudadas, os quais estão apresentados na Tabela 5.

Observa-se na Tabela 5 que no tempo de 15 dias após a elaboração do iogurte, a única variável que apresentou efeito estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) foi a concentração de açúcar. Esse efeito foi negativo, indicando que ao passar a concentração de açúcar do nível inferior ($10 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) para o superior ($15 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$), ocorre uma diminuição na contagem do micro-organismo.

Ao pesquisar a respeito dos efeitos inibitórios sobre o crescimento, hidrofobicidade e produção de ácido de três diferentes cepas, Somanah et al. (2013) descobriram que à medida que o teor de carboidrato era aumentado, a dextrose influenciou negativamente o crescimento bacteriano através da desidratação osmótica das células. Valero-Cases e Frutos (2017) destacaram a influência da inulina como substrato para a cepa de *L. acidophilus*, onde confirmaram que uma baixa concentração de monossacarídeos levou ao melhor consumo de inulina pelo micro-organismo, por ser a principal fonte de energia durante a fermentação.

Influência essa também observada neste trabalho no qual o maior crescimento celular foi observado com a diminuição da sacarose, dentro da faixa estudada (70 a 105 gramas). A concentração de inulina não exerceu efeito significativo sobre o crescimento de 15 dias. Entretanto, é possível dizer que as concentrações de inulina adicionadas possivelmente tiveram influência sobre o outro fator avaliado, a concentração de sacarose, atuando como uma fonte de substrato competitiva. Seguindo a linha de pensamento das autoras Valero-Cases e Frutos (2017), o meio ideal para a otimização do crescimento celular de *L. acidophilus* seria composto por uma menor concentração de sacarose e maior concentração de prebiótico, pois conforme comprovado em seu estudo, o uso de inulina como fonte de substrato primária aumenta a sobrevivência desta cepa. Para Lopes (2008), alguns parâmetros devem ser considerados para melhorar a fermentação, tais como a alta ou baixa concentração de substratos, excesso de subprodutos formados e alta concentração celular (biomassa), que podem induzir a inibição da atividade biossintética.

Tabela 5- Efeito dos Fatores Estudados no Planejamento Fatorial Completo 2³ sobre a Estabilidade do Probiótico *Lactobacillus acidophilus* durante 45 dias.

| Fatores | 15 dias após a elaboração | | | | 30 dias após a elaboração | | | | 45 dias após a elaboração | | | |
|----------------------------------|---------------------------|-------------|--------|-----------|---------------------------|-------------|--------|-----------|---------------------------|-------------|-------|-----------|
| | Efeito | Erro Padrão | t (4) | p - valor | Efeito | Erro padrão | t (4) | p - valor | Efeito | Erro padrão | t (4) | p - valor |
| Média | 9,03 | 0,06 | 143,29 | 0,0000* | 8,21 | 0,06 | 139,88 | 0,0000* | 7,30 | 0,08 | 97,11 | 0,0000* |
| x₁^a | 0,09 | 0,15 | 0,63 | 0,5652 | -0,05 | 0,14 | -0,38 | 0,7223 | -0,41 | 0,18 | -2,34 | 0,0793 |
| x₂^b | -0,23 | 0,15 | -1,57 | 0,1907 | 0,08 | 0,14 | 0,60 | 0,5813 | 0,20 | 0,18 | 1,15 | 0,3146 |
| x₃^c | -0,74 | 0,15 | -4,99 | 0,0075* | 0,01 | 0,14 | 0,09 | 0,9320 | -0,53 | 0,18 | -2,99 | 0,0402* |
| x ₁ . x ₂ | -0,10 | 0,15 | -0,66 | 0,5454 | 0,45 | 0,14 | 3,29 | 0,0303* | -0,04 | 0,18 | -0,24 | 0,8213 |
| x ₁ ,x ₃ | 0,26 | 0,15 | 1,74 | 0,1563 | 0,41 | 0,14 | 3,00 | 0,0401* | -0,57 | 0,18 | -3,25 | 0,0314* |
| x ₂ ,x ₃ | 0,05 | 0,15 | 0,36 | 0,7403 | -0,28 | 0,14 | -2,05 | 0,1094 | 0,10 | 0,18 | 0,58 | 0,5920 |

Fonte: Autoria própria (2017).

Nota:^aconcentração de sólidos totais (g. 100 mL⁻¹); ^bconcentração de prebiótico (inulina) (g.100 mL⁻¹); ^cconcentração de açúcar (g. 100 mL⁻¹); *fatores significantes p≤0,05.

Silva (2007) concluiu que a presença de carboidratos na mistura base pode inibir o crescimento dos micro-organismos do iogurte e que a inibição do crescimento das culturas do iogurte com um extrato seco total de 14 - 16% adicionado de açúcar (10 - 12%), se deve principalmente ao efeito osmótico adverso dos solutos do leite, assim como a baixa atividade de água (A_w).

A concentração de sólidos totais não exerceu efeito significativo sobre o crescimento de 15 dias (tabela 5). Assim, o uso de qualquer valor dentro da faixa estudada (70 a 105 gramas) resulta em concentrações celulares estatisticamente semelhantes. Os coeficientes de regressão para o tempo de 15 dias após elaboração estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6– Coeficientes de Regressão para a Resposta de Estabilidade do Probiótico *Lactobacillus acidophilus* após 15 dias de Elaboração.

| Fatores | Coeficientes de Regressão | Erro Padrão | t (4) | p – valor |
|---------------------------------|---------------------------|-------------|--------|-----------|
| Média | 9,03 | 0,06 | 143,29 | 0,0000* |
| x ₁ ^a | 0,09 | 0,15 | 0,63 | 0,5652 |
| x ₂ ^b | -0,23 | 0,15 | -1,57 | 0,1907 |
| x ₃ ^c | -0,74 | 0,15 | -4,99 | 0,0075* |
| x ₁ . x ₂ | -0,10 | 0,15 | -0,66 | 0,5454 |
| x ₁ ,x ₃ | 0,26 | 0,15 | 1,74 | 0,1563 |
| x ₂ ,x ₃ | 0,05 | 0,15 | 0,36 | 0,7403 |

Fonte: Autoria própria (2017).

Nota:^aconcentração de sólidos totais (g. 100 mL⁻¹); ^bconcentração de prebiótico (inulina) (g.100 mL⁻¹); ^cconcentração de açúcar (g. 100 mL⁻¹); *fatores significantes p≤0,05.

Embora apenas a concentração de açúcar tenha apresentado efeito significativo, desconsiderando-se as interações entre as variáveis, mantendo apenas a concentração de sólidos totais, prebiótico e açúcar, obteve-se o modelo descrito na equação (3), que representa o modelo linear do crescimento de unidades formadoras de colônias em função das variáveis estudadas para o *Lactobacillus acidophilus* no tempo de 15 dias de armazenamento. Os parâmetros não

significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 7.

$$\text{Contagem 15 dias} = 9,03 + 0,05x_1 - 0,12x_2 - 0,37x_3 \quad (3)$$

Tabela 7– ANOVA do Modelo Linear para Predição da Estabilidade de *Lactobacillus acidophilus* após 15 dias da Elaboração.

| Fonte de Variação | SQ | GL | F _{calculado} | F _{tabelado} | p-valor |
|-------------------|------|----|------------------------|-----------------------|---------|
| Regressão | 1,21 | 3 | 8,53 | 4,35 | 0,0098 |
| Resíduos | 0,33 | 7 | | | |
| Total | 1,54 | 10 | | | |

% variação explicada (R^2) = 79

Fonte: Autoria própria (2017).

Como o $F_{\text{calculado}}$ para a regressão foi significativo ($p=0,0098$) e o percentual de variação explicada pelo modelo foi adequado ($R^2 \approx 79\%$), considerando a variabilidade inerente aos bioprocessos, pode-se concluir que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais, sendo possível construir a superfície de resposta (figura 2).

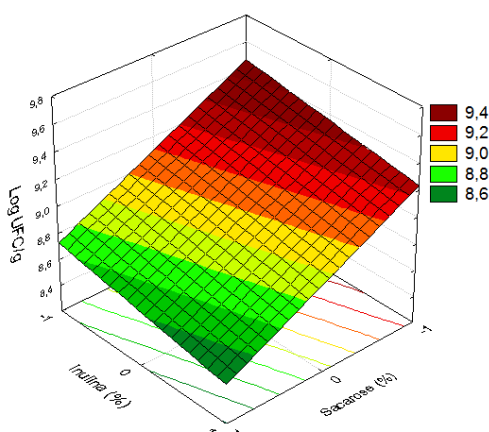


Figura 2–Superfície de Resposta do Crescimento de *Lactobacillus acidophilus* em Função da Concentração da Sacarose e de Inulina (%) no Tempo de 15 dias de Armazenamento.

Fonte: Autoria própria (2017).

Observa-se na superfície de resposta (figura 2) que quando a sacarose e a inulina se encontram no nível inferior estudado, ou seja, em menores concentrações, maior é a contagem do micro-organismo, embora a inulina não tenha apresentado efeito significativo na faixa estudada.

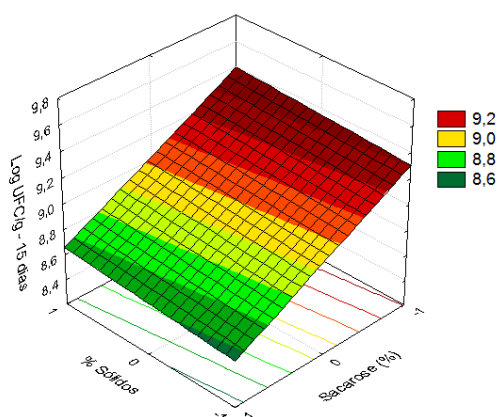


Figura 3– Superfície de Resposta do Crescimento de *Lactobacillus acidophilus* em Função da Concentração da Sacarose e de Sólidos Totais (%) no Tempo de 15 dias de Armazenamento. Fonte: Autoria própria (2017).

Em virtude dos maiores resultados encontrados para o crescimento celular de *Lactobacillus acidophilus*, nas concentrações inferiores de sacarose (figura 3), pode-se dizer que a concentração de sólidos totais não tem influência no crescimento, já que com concentrações tanto no nível inferior quanto no nível superior, a resposta foi positiva. Entretanto, a máxima resposta observada, foi quando a concentração de sólidos totais estava no nível superior e a sacarose no nível inferior, obtendo-se a contagem máxima.

Dando continuidade nas análises estatísticas para encontrar algum modelo que descreva a estabilidade de *L. acidophilus* frente aos fatores estudados, o tempo de 30 dias foi analisado e o resultado dos efeitos está descrito na Tabela 5.

Como é possível observar na Tabela 5 e Tabela 8 as interações da variável concentração de sólidos totais com a concentração de açúcar e com a concentração de prebiótico foram significativas, então mesmo as variáveis isoladas não sendo significativas devido as interações manteve-se as no modelo descrito na equação (4), que representa o modelo linear do crescimento de unidades formadoras de

colônias em função das variáveis estudadas para o *Lactobacillus acidophilus* no tempo de 30 dias de armazenamento.

Tabela 8- Coeficientes de Regressão para a Resposta de Estabilidade do Probiótico *Lactobacillus acidophilus* após 30 dias de Elaboração.

| Fatores | Coeficientes de Regressão | Erro Padrão | t (4) | p – valor |
|---------------------------------|---------------------------|-------------|--------|-----------|
| Média | 8,21 | 0,06 | 139,88 | 0,0000* |
| x ₁ ^a | -0,03 | 0,07 | -0,38 | 0,7223 |
| x ₂ ^b | 0,04 | 0,07 | 0,60 | 0,5813 |
| x ₃ ^c | 0,01 | 0,07 | 0,09 | 0,9320 |
| x ₁ . x ₂ | 0,23 | 0,07 | 3,29 | 0,0303* |
| x ₁ ,x ₃ | 0,21 | 0,07 | 3,00 | 0,0401* |
| x ₂ ,x ₃ | -0,14 | 0,07 | -2,05 | 0,1094 |

Fonte: Autoria própria (2017).

Nota:^aconcentração de sólidos totais (g. 100 mL⁻¹); ^bconcentração de prebiótico (inulina) (g. 100 mL⁻¹); ^cconcentração de açúcar (g. 100 mL⁻¹); *fatores significantes p≤0,05.

$$\text{Contagem 30 dias} = 8,21 - 0,03x_1 + 0,04x_2 + 0,01x_3 + 0,23x_1x_2 + 0,21 x_1x_3 - 0,14x_2x_3 \quad (4)$$

Para verificar a adequacidade do modelo realizou-se a ANOVA (tabela 9).

Tabela 9- Análise de Variância para Predição da Estabilidade de *Lactobacillus acidophilus* após 30 dias da Elaboração.

| Fonte de Variação | SQ | GL | F _{calculado} | F _{tabelado} | p-valor |
|-------------------|------|----|------------------------|-----------------------|---------|
| Regressão | 0,93 | 6 | 4,08 | 6,16 | 0,0972 |
| Resíduos | 0,15 | 4 | | | |
| Total | 1,08 | 10 | | | |

% variação explicada (R²) = 85,97

Fonte: Autoria própria (2017).

Sendo o p-valor maior que 0,05 a ANOVA não foi estatisticamente significativa, portanto o modelo linear não é adequado para descrever o crescimento de unidades formadoras de colônias para o *Lactobacillus acidophilus* no período de 30 dias.

O tempo de 45 dias também foi analisado e o resultado dos seus efeitos, descritos na Tabela 5, podem ser observados na Tabela 10.

Tabela 10- Coeficientes de Regressão para a Resposta de Estabilidade do Probiótico *Lactobacillus acidophilus* após 45 dias de Elaboração.

| Fatores | Coeficientes de Regressão | Erro Padrão | t (4) | p – valor |
|--------------------------------|---------------------------|-------------|-------|-----------|
| Média | 7,30 | 0,08 | 97,11 | 0,0000* |
| x ₁ ^a | -0,21 | 0,09 | -2,34 | 0,0793 |
| x ₂ ^b | 0,10 | 0,09 | 1,15 | 0,3146 |
| x ₃ ^c | -0,26 | 0,09 | -2,99 | 0,0402* |
| x ₁ ,x ₂ | -0,02 | 0,09 | -0,24 | 0,8213 |
| x ₁ ,x ₃ | -0,29 | 0,09 | -3,25 | 0,0314* |
| x ₂ ,x ₃ | 0,05 | 0,09 | 0,58 | 0,5920 |

Fonte: Autoria própria (2017).

Nota:^aconcentração de sólidos totais (g. 100 mL⁻¹); ^bconcentração de prebiótico (inulina) (g.100 mL⁻¹); ^cconcentração de açúcar (g. 100 mL⁻¹); *fatores significantes p≤0,05.

Pode-se observar na Tabela 10 que após 45 dias, tanto a concentração de açúcar quanto a interação entre a concentração de sólidos totais e a concentração de açúcar tiveram efeitos significativos sobre o crescimento celular de *L. acidophilus*. Sendo esses efeitos negativos, indicam que ao passar do nível inferior para o superior dessas variáveis ocorreu um decréscimo na variável resposta, ou seja, diminuiu o crescimento. O modelo linear da contagem após 45 dias da elaboração está descrito na equação (5) que é composto pelas variáveis que apresentaram efeito significativo sobre o crescimento.

$$\text{Contagem 45 dias} = 7,30 - 0,21x_1 - 0,26x_3 - 0,29x_1x_3 \quad (5)$$

A ANOVA (tabela 11) apresentou uma variação explicada de 81,38% e o valor do $F_{\text{calculado}}$ foi significativo ($p=0,00605$) além de ser 2 vezes maior que o F_{tabelado} , pode-se concluir que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais, sendo possível construir a superfície de resposta apresentada na Figura 4.

Tabela 11- Análise de Variância para Predição da Estabilidade de *Lactobacillus acidophilus* após 45 dias da Elaboração.

| Fonte de Variação | SQ | GL | $F_{\text{calculado}}$ | F_{tabelado} | p-valor |
|-------------------|------|----|------------------------|-----------------------|---------|
| Regressão | 1,55 | 3 | 10,20 | 4,35 | 0,0060* |
| Resíduos | 0,36 | 7 | | | |
| Total | 1,91 | 10 | | | |

% variação explicada (R^2) = 81,38; *fatores significantes $p \leq 0,05$.

Fonte: Autoria própria (2017).

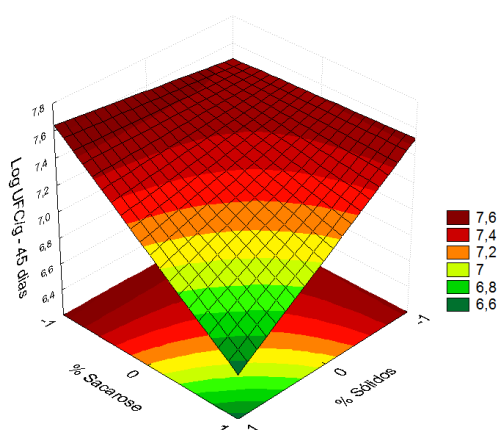


Figura 4-Superfície de Resposta do Crescimento de *Lactobacillus acidophilus* em Função da Concentração de Sólidos Totais e Concentração de Sacarose no Tempo de 45 dias de Armazenamento.

Fonte: Autoria própria (2017).

Por meio da análise da superfície de resposta (figura 4) observa-se que nos níveis inferiores estudados para a concentração de sólidos totais e a sacarose, foram observadas as maiores contagens. Nota-se também, que a interação de sólidos totais com a inulina foi mais bem aceita pelo meio, o que gerou um efeito positivo no crescimento, efeito este esperado em função de sua atividade prebiótica.

Avaliando as respostas obtidas durante o tempo de armazenamento observado, percebe-se que tanto a inulina quanto a sacarose atuaram como fontes de substrato para o crescimento da cepa probiótica, e que na maioria das vezes, estas fontes competem entre si, indicando que se apenas uma das fontes for utilizada como substrato, o maior crescimento microbiano poderá ser atingido.

Para Oliveira e Damin (2003), a presença de sacarose como substrato, na produção de leites fermentados, demonstrou diferenças estatisticamente significativas e negativas nas características químicas, como a redução do pH causando a acidificação do meio inoculado com *L. acidophilus*. As autoras concluíram então que a adição de sacarose e padronização do leite afetam o tempo para atingir pH 4,5, e que os leites fermentados por cultura mista de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus* apresentaram pós acidificação depois de 7 dias de elaborados.

Diante do exposto, é possível concluir que um meio composto pelas faixas de sólidos totais empregadas neste trabalho precisa de somente uma fonte de substrato. Não foi realizado nenhum teste de substratos para saber qual melhor se adequaria ao meio e atingiria maior crescimento, entretanto, foi observado que a inulina não apresentou efeito negativo e que a interação da mesma com a máxima concentração de sólidos totais gerou o ensaio que apresentou maior estabilidade de *L. acidophilus*.

A sacarose interferiu negativamente, nas faixas de concentrações estudadas, na estabilidade do probiótico, ocorrendo um fenômeno denominado de inibição pelo substrato. O mesmo resultado encontrado para Oliveira e Damin (2003), foi o ocorrido neste trabalho, onde através da inibição pela sacarose, ocorreu a acidificação do meio dificultando o crescimento celular. Destaca-se a influência da inulina como fonte de substrato para a fermentação, que ao ser inoculada em menores concentrações possa ter sofrido inibição pela sacarose, ao invés de ser o principal substrato, o que contribuiria para a sobrevivência do *L. acidophilus*.

Entretanto, mesmo com a redução do crescimento microbiano com o passar dos dias, na contagem dos 45 dias após a elaboração, ainda houve um crescimento médio de $7,22 \log_{10}$ de UFC.mL⁻¹, caracterizando o iogurte como um alimento funcional, por se manter células probióticas viáveis durante todo o período estudado.

Dos ensaios obtidos, destaca-se os ensaios 1, 2, 3 e 4 como os tratamentos que obtiveram as maiores contagens ao longo de 45 dias de armazenamento. É

possível observar que estes ensaios tiveram apenas uma variação em comum, nos quatro ensaios, a concentração de sacarose estava em seu nível inferior, ou seja, igual a 10 g.100 mL⁻¹. A inulina variou de 1,5 a 3,0 g.100 mL⁻¹ e os sólidos totais de 10 a 15 g.100 mL⁻¹, o que confirma a boa interação entre inulina e sólidos totais, indicando serem as melhores faixas de concentração para o crescimento da cepa probiótica.

6.4. INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO

Os iogurtes ficaram armazenados durante 45 dias sob a temperatura de 4°C e tiveram crescimento de colônias confirmadas como *Lactobacillus acidophilus* até o último dia avaliado (tabela 4 no item 6.3.1), onde os ensaios que apresentaram as maiores contagens no 45º dia foram os ensaios 7 e o 11, e os que apresentaram menor crescimento foram os ensaios 1, 5, 6 e 8, onde o crescimento só foi observado na menor diluição 10⁻⁶.

Os resultados das contagens demonstraram que mesmo após 45 dias da elaboração, na condição de armazenamento aplicada, todos os iogurtes se encontram com células viáveis do probiótico estudado, caracterizando este produto como um alimento funcional, por apresentarem contagem mínima observada de 2x10⁶ UFC. mL⁻¹. Conforme resultados encontrados por Pimentel et al. (2012) e Leite (2015), a viabilidade dos micro-organismos nos iogurtes simbióticos permaneceu durante 28 dias, sob as mesmas condições de armazenamento. Almeida et al. (2015), definiu como ideal o tempo de vida de prateleira médio de 33,5 dias.

De acordo com os resultados obtidos e a confirmação de células viáveis do probiótico utilizado até 45 dias após a elaboração, entende-se como tempo ideal o prazo de 45 dias, tendo em vista que todos os ensaios apresentaram número de células probióticas viáveis com níveis aceitáveis aos estabelecidos pela legislação. Pode-se concluir que os iogurtes elaborados apresentaram estabilidade probiótica por um maior período de tempo do que os iogurtes dos autores comparados, caracterizando-o como iogurte com caráter funcional de longa duração.

7 CONCLUSÃO

O estudo da viabilidade e estabilidade das bactérias probióticas permite a promoção de informações úteis ao consumidor tal como a alegação de propriedade funcional de um alimento. Sob a temperatura de armazenamento definida como 4°C, os iogurtes apresentaram estabilidade probiótica por 45 dias, além de garantir um produto de nível proteico acima do exigido pela legislação vigente. A investigação desses fatores permitiu identificar e analisar as causas que influenciam ou reduzem a ação dos micro-organismos que conferem os efeitos funcionais ao alimento.

Com um nível de confiança de 95%, pode-se dizer que houve uma competição de substratos pelo meio, o que causou uma inibição no crescimento durante a elaboração dos ensaios. Após 15 dias, o fator que mais influenciou na viabilidade do probiótico *Lactobacillus acidophilus* foi a sacarose, sendo este um efeito negativo. No 30º dia, as interações entre sólidos totais e inulina e sólidos totais e sacarose tiveram efeitos positivos sobre o crescimento, porém não significativos. No último tempo observado, o qual se considera como a data de validade (45 dias), a variável sacarose bem como sua interação com a concentração de sólidos totais apresentou efeito negativo estatisticamente significativo, indicando não ser o melhor substrato a ser utilizado para o cultivo da cepa probiótica.

Conclui-se que, devido a sua atividade prebiótica, e aos seus resultados frente aos encontrados para o outro substrato, a inulina é o melhor substrato para garantir a estabilidade do *L. acidophilus*.

Todos os 12 ensaios de iogurte elaborados apresentaram níveis protéicos aceitáveis e, em alguns ensaios níveis superiores, aos da legislação vigente. A acidez de todas as amostras estavam conforme estabelecidos no regulamento. Os produtos apresentaram contagens de bactérias lácticas superiores a 10^8 UFC.mL⁻¹, onde mesmo no último tempo avaliado, o período de 45 dias após a elaboração, ainda havia o crescimento de 10^6 UFC.mL⁻¹.

Os resultados obtidos demonstraram que a partir das condições de elaboração empregadas é possível obter um iogurte funcional, com características probióticas e prébióticas, de qualidade com um maior prazo de validade. Entretanto, entende-se que deve-se utilizar somente uma fonte de carboidrato para melhorar a otimização do crescimento celular de *L. acidophilus*.

8 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Com este trabalho, entende-se que para se definir os efeitos que cada fator estudado influencia na estabilidade do *Lactobacillus acidophilus* deve-se primeiro definir através de testes práticos, quais os melhores carboidratos a serem utilizados como substrato para esta cepa, bem como suas melhores condições. Um estudo sobre o comportamento do prebiótico inulina deve ser conduzido para se definir qual a melhor concentração a ser utilizada e frente a qual carboidrato a mesma não sofre inibição fermentativa, ou se ela pode ser utilizada unicamente como substrato, ficando livre para ser consumida como substrato durante o processo fermentativo, garantindo a sobrevivência do *L. acidophilus*.

Uma vez que estes fatores estejam bem definidos e fundamentados, propõem-se um planejamento fatorial completo com os melhores níveis observados, no qual vai encontrar a melhor condição para a maior estabilidade do probiótico estudado. Recomenda-se também, realizar uma caracterização físico-química e sensorial completa a fim de conhecer a composição nutricional deste iogurte funcional.

REFERÊNCIAS

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). *Official Methods of Analysis*. 16. ed. Arlington: AOAC, 1995. AOAC - Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. Washington, 20th ed.; 2016.

ALMEIDA, D. M.; PRESTES, R. A.; RIBEIRO, M. C. O.; PIETROWSKI, G. A. M. **Determinação do tempo de vida de prateleira de iogurte com polpa de fruta por meio da população de bactérias lácticas totais**. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. v. 9, n. 1, p. 1671-1681, 2015.

BARBOSA, F. H. F.; BARBOSA, L. P. J. L.; BAMBIRRA, L. H. S.; ABURJAILE, F. F. Probióticos- micro-organismos a favor da vida. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Paraíba, v. 11, n. 1, p. 11-21, 2011.

BITENCOURT, B. Aveia-Descobrimos suas propriedades (2007). *Departamento de Nutrociência*. Universidade de São Paulo. SP. Online. Disponível em: <<http://www.nutrociencia.com.br>>. Acesso em: 4 de jun de 2016.

BRASIL. Portaria nº46, de 23 de novembro de 2007. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

BRASIL. Portaria nº46, de 23 de novembro de 2007. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). NORMA FIL 150:1991. Yogur. Acidez.

BRASIL. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de Propriedades Funcionais e/ou Saúde alegadas em rotulagem de alimentos**. Ministério da Saúde, Brasília.

BRZOZOWSKI, B.; BEDNARSKI, W.; DZIUBA, B. Functional properties of *Lactobacillus acidophilus* metabolites. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 89, p. 2467-2476, jul 2009.

CAPITANI, C.; HAUSCHILD, A. D.; FRIEDRICH, C. J.; LEHN, D. N.; SOUZA, C. F. V. de. Caracterização de iogurtes elaborados com probióticos e fibra solúvel. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v.8, n.2, p. 1285-

1300, 2014.

COSTA, M.; BALTHAZAR, C.; MOREIRA, R.; CRUZ, A.; JUNIOR, C. A. C. Leite fermentado: potencial alimento funcional. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA- Centro Científico Conhecer**. Goiânia ,v.9,n. 16, p. 1387–1408, jul 2013.

DALCANTON, Francieli. **Modelagem matemática do crescimento de bactérias ácido lácticas em condições isotérmicas e não isotérmicas**. 2010. 190 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

DOROTA, Z.; DANUTA, K. K.; ANTONI, G.; MOTYL, I. Predictive modelling of *Lactobacillus casei* KN291 survival in fermented soy beverage. **Journal of Microbiology**. v. 52, n.2, p. 168-178, fev 2014.

DUARTE, M. C. K. H.; CORTEZ, N. M. dos S.; MACEDO, N. C. de; CORTEZ, M. A. S.; FRANCO, R. M. Ação antagonista de *Lactobacillus acidophilus* frente a estirpes patogênicas inoculadas em leite fermentado. **Journal of Bioenergy and Food Science**. Macapá, v. 3, n.1, p. 1-10, mar 2016.

EUROMONITOR INTERNATIONAL. **Fortified/Functional beverages in Brazil**. 2016. Disponível em: <<http://www.euromonitor.com/fortified-functional-beverages-in-brazil/report>>. Acesso em: 17 de mai de 2016.

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Ontario, Canada; 2002. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf>. Acesso em: 1 de jun de 2016.

GALLINA, D.A.; ALVES, A. T. S. e; TRENTO, F. K. H. de S.; CARUSI, J. Caracterização de Leites Fermentados Com e Sem Adição de Probióticos e Prebióticos e Avaliação da Viabilidade de Bactérias Lácticas e Probióticas Durante a Vida-de-Prateleira. **Revista UNOPAR Científica. Ciências biológicas e da saúde**. São Paulo, v. 13, n. 4, p. 239-244, jul 2011.

GAZELOTO, S. A.; BIELI, B. C.; SOARES, L. F. F.; RODRIGUES, L. M.; MADRONA, G. S. Efeito da adição de prebióticos em bebida láctea achocolatada. **GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**. São Cristóvão, v. 5, n. 3, p. 2237-2247, 2015.

GIANETTI THAMER, K.; LÚCIA, A.; PENNA, B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas Por Probióticos e acrescidas de Prebiótico. **Ciência e**

Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.26, n. 3, p. 589–595, set 2006.

GUIMARÃES, I. C. de O.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; PIMENTA, C. J.; TAVARES, L. S.; MENDES, J. F.; FERREIRA, E. B. Doce de leite *light* funcional com café: um estudo de mercado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 67, n. 388, p.53-59, out 2012.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - Normas Analíticas; **métodos químicos e físicos para a análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

LEITE, Sabrina T. **logurte simbiótico de acai (*Euterpe edulis Mart.*) caracterização físico-química e viabilidade de bactérias láticas e probióticas**. 2015. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2015.

LOPES, Angela. R. **Produção de ácido láctico por lactobacilos em diferentes meios de cultivos**. 2008. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas área de concentração em Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

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

MOROTI, C.; MAGRI, L. F. S.; SOUZA, J. C. B. de; MATOS, D. B. de S.; COSTA, M. de R.; SIVIERI, K. Potencial da Utilização de Alimentos Probióticos, Prebióticos e Simbióticos na Redução de Colesterol Sanguíneo e Glicemia. **Revista UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 11, n. 4, p. 63-67, 2009.

NIKMARAM, P.; MOUSAVI, S. M.; KIANI, H.; EMAMDJOMEH, Z.; RAZAVI, S. H.; MOUSAVI, Z. Modeling the Effect of Inulin , pH and Storage Time on the Viability of Selected Lactobacillus in a Probiotic Fruity Yogurt Drink Using the Monte Carlo Simulation. **Journal of Food Quality**. v. 1, n. 1, p. 1-8, 2016.

OLIVEIRA, A. C. **Viabilidade de Lactobacillus acidophilus e Bifidobacterium lactis, microencapsulados por coacervação, seguida de secagem por spray drying e leite de jorro**. 2006. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

OLIVEIRA, M. N.; DAMIN, M. R. **Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e**

probióticas em leite fermentado. 2003. 5 f. Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos. 23 (Supl.): 172-176, 2003.

PIMENTEL, T. C.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H. **Iogurte probiótico com frutanos tipo inulina de diferentes graus de polimerização: características físico-químicas e microbiológicas e estabilidade ao armazenamento.** Seminário Ciências Agrárias, v. 33, n. 3, p. 1059-1070, jun 2012.

QUIGLEY, E. M. M. Prebiotics and probiotics: modifying and mining the microbiota. **Pharmacological Research.** v. 61, n. 3, p. 213-18, mar 2010.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** São Paulo, vol. 42, n. 1, p. 1-16, mar 2006.

SANTOS, D. A. dos; MANTOVAN, J.; PAN, N. C.; BORSATO, D.; CELLIGOI, M. A. P. C. Produção de Fruto-oligossacarídeos por *Bacillus subtilis* natto CCT7712: Efeitos de Parâmetros Fermentativos. **Biochemistry and Biotechnology Reports.** v. 2, n. 3, p. 62-66, 2013.

SANTOS, K. A.; SANTOS, E. F.; MANHANI, M. R.; SANCHES, F. L. F. Z.; BALLARD, C. R.; NOVELLO, D. **Avaliação das características sensoriais e físico-químicas de iogurte adicionado de inulina.** Revista UNIABEU, v. 7, n.15, p. 50-65, abr 2014.

SILVA, V. S. **Desenvolvimento de iogurte probiótico com prebiótico.** 2007. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

SOMANAH, J.; BOURDON, E.; BAHORUN, T.; ARUOMA, O. I. The inhibitory effect of a fermented papaya preparation on growth, hydrophobicity, and acid production of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, and *Lactobacillus acidophilus*: its implications in oral health improvement of diabetics. **Food Science and Nutrition.** v. 1, issue 6, p. 416-421, nov 2013.

STEFÉ, C. A.; ALVES, M. A. R.; RIBEIRO, R. L. Probióticos, Prebióticos e Simbióticos - Artigo de Revisão. **Saúde & Ambiente em Revista.** Duque de Caxias, v. 3, n. 1, p. 16-33, jun 2008.

VALERO-CASES, E.; FRUTOS, M. J. Development of prebiotic nectars and juices as potential substrates for *Lactobacillus acidophilus*: Special reference to physicochemical characterization and consumer acceptability during storage. **LWT** -

Food Science and Technology. v. 81, p. 136-143, ago 2017.

VARAVALLO, M. A.; THOMÉ, J. N.; TESHIMA, E. Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.29, n. 1,p. 83–104, 2008.

WILKINSON, J. **Os gigantes da indústria alimentar entre a grande distribuição e os novos clusters a montante.** *Estudos, Sociedade e Agricultura*, Rio de Janeiro, n. 18, 147-174, 2002.

ZACARCHENCO, P. B.; GALLINA, D. A.; VAN DENDER, A. G. F.; MORENO, I. Prebóticos em produtos lácteos - Artigo técnico. **Revista Leite & Derivados.**Campinas, n. 139, p.36-44, abr 2013.

ZHAO, R.; SUN, J.; MO, H.; ZHU, Y. Analysis of functional properties of *Lactobacillus acidophilus*.**World Journal of Microbiology Biotechnology.** v.23, p.195–200, 2007.