

## 1 INTRODUÇÃO

A preocupação com a alimentação vem mudando nas últimas décadas, uma vez que há um aumento crescente do interesse dos consumidores por alimentos que assegurem não só o bem-estar e a saúde, mas que possam, também, reduzir o risco de doenças ao longo da vida (ROBERFROID, 2002). A dieta tem sido reconhecida como a primeira linha de defesa na prevenção de diversas doenças crônicas não transmissíveis, como câncer, doenças cardiovasculares, osteoporose, artrite e degeneração muscular relacionada à idade (COSTA, 2010).

Os alimentos funcionais possuem potencial para promover a saúde por meio de mecanismos não previstos na nutrição convencional, devendo ser salientado que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura ou prevenção de doenças (ROBERFROID, 2007). A crescente demanda por este tipo de alimento pode advir do aumento nos custos de saúde, da crescente expectativa de vida e, também, do desejo das pessoas melhorarem a sua qualidade de vida (SIRÓ et al., 2008).

O conhecimento da microbiota intestinal e suas interações levaram ao desenvolvimento de estratégias alimentares, objetivando a manutenção e o estímulo das bactérias normais ali presentes (GIBSON & FULLER, 2000). Atualmente diversos micro-organismos vêm sendo utilizados com finalidade probiótica, como os *Lactobacillus* e *Bifidobactérias*.

A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando no aumento da resistência contra patógenos. Assim, a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (PUUPPONEN-PIMIA et al., 2002).

Diversas definições de probióticos já foram publicadas ao longo dos anos (SANDERS, 2003). Entretanto, a definição aceita internacionalmente é a de micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION

OF UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; SANDERS, 2003). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define probióticos como micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002).

A recomendação brasileira mais recente para alimentos probióticos é com base na porção diária de micro-organismos viáveis que devem ser ingeridos para efeitos funcionais, sendo o mínimo estipulado de  $10^8$  a  $10^9$  UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA (UFC)  $\text{dia}^{-1}$  (BRASIL, 2008).

A tendência em se estudar o efeito dos alimentos probióticos, ao invés de apenas as bactérias probióticas, é necessária para aumentar a confiança do consumidor e dará maior credibilidade aos benefícios à saúde dos produtos probióticos (MÄTTÖ et al., 2006). Desta forma a fixação de padrões de identidade para produtos alimentícios contendo culturas probióticas será útil para acelerar o desenvolvimento e a disponibilidade desses produtos (PARVEZ et al., 2006).

O trato gastrintestinal humano é um microecossistema cinético, o que possibilita o desempenho normal das funções fisiológicas do hospedeiro, a menos que micro-organismos prejudiciais e potencialmente patogênicos dominem. Manter um equilíbrio apropriado da microbiota pode ser assegurado por uma suplementação sistemática da dieta com probióticos, prebióticos e simbióticos (BIELECKA et al., 2002).

Estima-se que a microbiota humana contém  $10^{14}$  células bacterianas, número 10 vezes maior do que o número de células presentes no corpo humano. O órgão mais colonizado é o trato gastrointestinal (TGI), sendo que o cólon pode conter mais de 70% de todos os micro-organismos no corpo humano (LEY et al., 2006).

A microbiota saudável é definida como a microbiota normal que conserva e promove o bem estar e a ausência de doenças, especialmente do TGI. A correção das propriedades da microbiota autóctone desbalanceada constitui a racionalidade da terapia por probióticos. Uma microbiota intestinal desbalanceada causa alterações como a diarreia associada a infecções ou ao tratamento por antibióticos, a alergia alimentar, o eczema atópico, doenças inflamatórias intestinais e artrite (ISOLAURI et al., 2004).

A introdução bem sucedida de um produto no mercado estará diretamente relacionada com o seu aroma, sabor e textura (CHAMPAGNE & GARDNER, 2005). Desta forma a fixação de padrões de identidade para produtos alimentícios contendo culturas probióticas será útil para acelerar o desenvolvimento e a disponibilidade desses produtos (PARVEZ et al., 2006).

Apesar das leveduras não estarem no grupo dos micro-organismos reconhecidos como probióticos pela ANVISA, diversos trabalhos relatam o efeito de algumas linhagens de leveduras como um agente preventivo e terapêutico para o tratamento de uma variedade de doenças diarreicas, a exemplo a *Saccharomyces boulardii*. (MCFARLAND & BERNASCONI, 1993).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a estabilidade dos micro-organismos *Lactobacillus acidophilus* e *Saccharomyces boulardii* em barras de cereais durante o tempo de armazenamento (*shelf life*).

### 2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver formulações de barras de cereais com os probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Saccharomyces boulardii*;
- Determinar a melhor forma de incorporação de *Lactobacillus acidophilus* e *Saccharomyces boulardii* à barra de cereais;
- Avaliar a viabilidade dos micro-organismos probióticos durante o período de estocagem e a manutenção destes em níveis desejáveis;
- Avaliar a aceitabilidade do produto por meio do teste de avaliação sensorial e intenção de consumo.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Alimentos funcionais

A preocupação com a alimentação vem mudando nas últimas décadas, uma vez que há um aumento crescente do interesse dos consumidores por alimentos que assegurem não só o bem-estar e a saúde, mas que possam, também, reduzir o risco de doenças ao longo da vida (ROBERFROID, 2002). A dieta tem sido reconhecida como a primeira linha de defesa na prevenção de diversas doenças crônicas não transmissíveis, como câncer, doenças cardiovasculares, osteoporose, artrite e degeneração muscular relacionada à idade (COSTA, 2010).

Esses alimentos que geram efeitos benéficos à saúde humana, aliados à ação nutricional são denominados funcionais. Seu efeito deve-se à adição de ingredientes ativos, remoção ou substituição de substâncias indesejáveis em sua composição (ERKKILÄ et al., 2001).

Atraídos pela possibilidade de optar por benefícios adicionais à saúde, os consumidores tendem a escolher produtos funcionais, em substituição aos tradicionais (ARES et al., 2009).

Os alimentos funcionais possuem potencial para promover a saúde por mecanismos não previstos na nutrição convencional, devendo ser salientado que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura ou prevenção de doenças (ROBERFROID, 2007).

O termo “alimentos funcionais” foi inicialmente introduzido pelo governo do Japão em meados dos anos 80, como resultado de esforços para desenvolver alimentos que possibilitassem a redução dos gastos com saúde pública, considerando a elevada expectativa de vida naquele país (ARAYA e LUTZ, 2003).

O Japão foi o pioneiro na formulação do processo de regulamentação específica para os alimentos funcionais, referindo-se a eles como alimentos processados que contêm ingredientes que auxiliam nas funções corporais específicas, além de serem nutritivos. Conhecidos como Alimentos para Uso Específico em Saúde – Foods for

Specified Health Use (FOSHU), estes alimentos são qualificados e trazem um selo de aprovação do Ministério da Saúde e Bem-estar japonês (HASLER, 1998).

Os alimentos integrais não modificados, como as frutas e os vegetais, representam a forma mais simples de um alimento funcional. Por exemplo, brócolis, cenoura ou tomate são considerados alimentos funcionais por serem ricos em componentes fisiologicamente ativos, tais como sulforafano, beta caroteno e licopeno, respectivamente. Os alimentos modificados com nutrientes ou realçados com fitoquímicos ou com compostos fisiologicamente ativos de origem vegetal, também podem ser considerados como alimentos funcionais (STRINGHETA et al., 2007).

Ainda não existe uma definição mundialmente aceita para os alimentos funcionais. Entretanto, diversas organizações tentaram definir essa categoria emergente de alimentos (ARAYA e LUTZ, 2003).

Lajolo (2001) define Alimento funcional como o alimento semelhante em aparência ao alimento convencional, consumido como parte da dieta usual, capaz de produzir demonstrados efeitos metabólicos ou fisiológicos úteis na manutenção de uma boa saúde física e mental, podendo auxiliar na redução de risco de doenças e agravos não transmissíveis, além de suas funções nutricionais básicas.

### **3.2 Legislação Brasileira**

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde, regulamenta os alimentos funcionais através das seguintes resoluções: RDC nº 16/1999 ANVISA, RDC nº 17/1999 ANVISA, RDC nº 18/1999 ANVISA, RDC nº 19/1999 ANVISA, cujas essências são:

a) Resolução nº 16, de 30 de abril de 1999 - Trata de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes, cuja característica é de não necessitar de um Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) para registrar um alimento, além de permitir o registro de novos produtos sem histórico de consumo no país e também novas formas de comercialização para produtos já consumidos (BRASIL, 1999a);

b) Resolução nº 17, de 30 de abril de 1999 - Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança de Alimentos que prova, baseado em estudos e evidências científicas, se o produto é seguro sob o ponto de risco à saúde ou não (BRASIL, 1999b);

c) Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999 - Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para a Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde, alegadas em rotulagem de alimentos (BRASIL, 1999c);

d) Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999 - Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem (BRASIL, 1999d).

A legislação brasileira não define alimentos funcionais, mas sim as alegações de propriedades funcionais e de saúde de alimentos e ingredientes para consumo humano permitidas para serem veiculadas nos rótulos e nas propagandas de produtos elaborados, embalados e comercializados, prontos para oferta ao consumidor (STRINGHETA et al., 2007; BRASIL, 1999c; BRASIL, 1999d).

De acordo com a resolução da ANVISA, RDC nº 18/1999, alegação de propriedade funcional é 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 e alegação de propriedade de saúde é aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde (BRASIL, 1999c).

As diretrizes para a utilização da alegação de propriedades funcionais e ou de saúde, segundo a RDC nº 18/1999, ANVISA são:

a) A alegação de propriedades funcionais e ou de saúde é permitida em caráter opcional;

b) O alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e ou fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica;

c) São permitidas alegações de função ou conteúdo para nutrientes e não nutrientes, podendo ser aceitas aquelas que descrevem o papel fisiológico do nutriente ou não

nutriente no crescimento, desenvolvimento e funções normais do organismo, mediante demonstração da eficácia. Para os nutrientes com funções plenamente reconhecidas pela comunidade científica não será necessária a demonstração de eficácia ou análise da mesma para alegação funcional na rotulagem;

d) No caso de uma nova propriedade funcional, há necessidade de comprovação científica da alegação de propriedades funcionais e ou de saúde e da segurança de uso, segundo as Diretrizes Básicas para avaliação de Risco e Segurança dos alimentos;

e) As alegações podem fazer referências à manutenção geral da saúde, ao papel fisiológico dos nutrientes e não nutrientes e à redução do risco de doenças. Não são permitidas alegações de saúde que façam referência à cura ou prevenção de doenças (BRASIL, 1999c).

A Resolução RDC n.º 2/2002, aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Os produtos de que trata este regulamento são classificados em: carotenoides, fitoesteróis, flavonoides, fosfolipídeos, organosulfurados, polifenóis e probióticos (BRASIL, 2002).

A ANVISA atualizou, em julho de 2008, a lista que contemplava os Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. A lista apresenta o nome de todos os componentes funcionais reconhecidos pela ANVISA, juntamente com as alegações que podem ser veiculadas no rótulo do produto, desde que atendido os requisitos específicos de cada componente funcional.

A recomendação brasileira mais recente para alimentos probióticos é com base na porção diária de micro-organismos viáveis que devem ser ingeridos para efeitos funcionais, sendo o mínimo estipulado de  $10^8$  a  $10^9$  UFC dia<sup>-1</sup>. (BRASIL, 2008).

No Brasil, somente os alimentos processados podem obter registro como alimento com alegações de propriedade funcional pelo fato de apresentarem composição padronizada e possibilidade de controle (LAJOLO, 2001). O registro de um alimento funcional só pode ser realizado após comprovada a alegação de propriedades funcionais ou de saúde com base no consumo previsto ou recomendado pelo fabricante, na finalidade, condições de uso e valor nutricional, quando for o caso ou

na(s) evidência(s) científica(s): composição química ou caracterização molecular, quando for o caso, e ou formulação do produto; ensaios bioquímicos; ensaios nutricionais e ou fisiológicos e ou toxicológicos em animais de experimentação; estudos epidemiológicos; ensaios clínicos; evidências abrangentes da literatura científica, organismos internacionais de saúde e legislação internacionalmente reconhecidas sob propriedades e características do produto e comprovação de uso tradicional, observado na população, sem associação de danos à saúde (BRASIL, 1999c; BRASIL, 1999d; PIMENTEL et al., 2005).

O conteúdo da informação ou propriedade funcional ou de saúde de um alimento ou ingrediente veiculada, por qualquer meio de comunicação, não poderá ser diferente em seu significado daquela aprovada para constar em sua rotulagem (BRASIL, 1999d).

### **3.3 Probióticos**

Em 1907, Elie Metchnikoff foi o primeiro a propor uma justificativa científica para o papel de lactobacilos na manutenção da saúde e longevidade (CARAMIA, 2004). O termo probiótico data por volta de 1965, quando Lilly e Stillwell foram os primeiros a usar para descrever qualquer substância ou organismo que contribui para o equilíbrio microbiano intestinal, e em 1989 Fuller destacou ainda o seu papel na saúde (LILLY & STILLWELL, 1965; FULLER, 1989).

Diversas definições de probióticos já foram publicadas ao longo dos anos (SANDERS, 2003). Entretanto, a definição atualmente aceita internacionalmente é a de micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; SANDERS, 2003).

Atualmente, 56 espécies são reconhecidas como pertencentes ao gênero *Lactobacillus* e 29 espécies são classificadas como Bifidobactérias, embora poucas cepas apresentem efeito probiótico bem documentado (SHAH, 2007).

Dentre os probióticos mais estudados, tanto experimentalmente quanto clinicamente, destacam-se as bactérias lácticas, particularmente lactobacilos, as bifidobactérias e a levedura *Saccharomyces boulardii* (SAAD et al., 2011; MACFARLAND, 2010). Alguns já são comercializados sob a forma de suplemento alimentar ou preparações farmacêuticas, contendo um ou vários micro-organismos (MARTINS, 2008). A partir de julho de 2008, a ANVISA reconheceu somente como probióticos os seguintes micro-organismos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium*. A ANVISA estabeleceu, ainda, a necessidade da citação nos rótulos de produtos alimentícios contendo estes microrganismos a seguinte alegação: “Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis” Os micro-organismos *Lactobacillus delbrueckii* (subespécie *bulgaricus*) e *Streptococcus salivarius* (subespécie *thermophilus*) foram retirados da lista tendo em vista que além de serem espécies necessárias para produção de iogurte, não possuem efeito probiótico cientificamente comprovado (BRASIL, 2008).

Deve ser salientado que os probióticos devem, necessariamente, resultar em efeitos benéficos mensuráveis sobre a saúde, substanciados por estudos conduzidos no hospedeiro ao qual ele se destina. Em outras palavras, probióticos destinados ao uso em humanos requerem comprovação da eficácia por meio de ensaios em humanos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; SANDERS, 2003).

É importante salientar que a eficácia dos probióticos, sobre o estado de saúde e nutrição do hospedeiro é dependente das mudanças que eles promovem na composição e na atividade metabólica da microbiota residente (BUDDINGTON, 2009).

Atualmente, a grande preocupação é a identificação correta das cepas probióticas (espécie/cepa), sendo este o primeiro pré-requisito para atestar a sua segurança microbiológica. Essa identificação é particularmente importante, em virtude dos efeitos probióticos serem cepa-específicos, sendo recomendada a combinação de técnicas fenotípicas com genéticas (LEE & SALMINEM, 2009).

### 3.4 Atividades terapêuticas de culturas probióticas

A mucosa do trato gastrointestinal é continuamente exposta a um ambiente que é rico em substâncias estranhas, tais como partículas de alimentos e de antígenos de origem microbiana. Alterações específicas no ecossistema intestinal podem contribuir para o desenvolvimento de certas doenças (VYAS e RANGANATHAN, 2012). Uma microbiota intestinal desbalanceada causa alterações, como a diarreia associada a infecções ou ao tratamento por antibióticos, a alergia alimentar, o eczema atópico, doenças inflamatórias intestinais e artrite (ISOLAURI et al., 2004).

O trato gastrointestinal humano é um microecossistema cinético, o que possibilita o desempenho normal das funções fisiológicas do hospedeiro, a menos que microorganismos prejudiciais e potencialmente patogênicos dominem (BIELECKA et al., 2002).

O conhecimento da microbiota intestinal e suas interações levaram ao desenvolvimento de estratégias alimentares, objetivando a manutenção e o estímulo das bactérias normais ali presentes (GIBSON & FULLER, 2000). A correção das propriedades da microbiota autóctone desbalanceada constitui a racionalidade da terapia por probióticos (ISOLAURI et al., 2004).

Os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas que mais se destacam são: controle da microbiota intestinal; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos; diminuição da população de patógenos consequente à produção de ácidos acético e lático, de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos; promoção da fermentação da lactose em indivíduos intolerantes à lactose; estimulação do sistema imune; alívio da constipação; aumento da absorção de minerais; produção de vitaminas (SAAD et al., 2011).

Três possíveis mecanismos de ação são atribuídos aos probióticos: 1) supressão do número de células viáveis, por meio da produção de compostos com atividade antimicrobiana, competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão; 2) alteração do metabolismo microbiano, através do aumento ou da diminuição da atividade enzimática; 3) estímulo da imunidade do hospedeiro, por meio do aumento

dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos (FULLER, 1989).  
Figura 1.

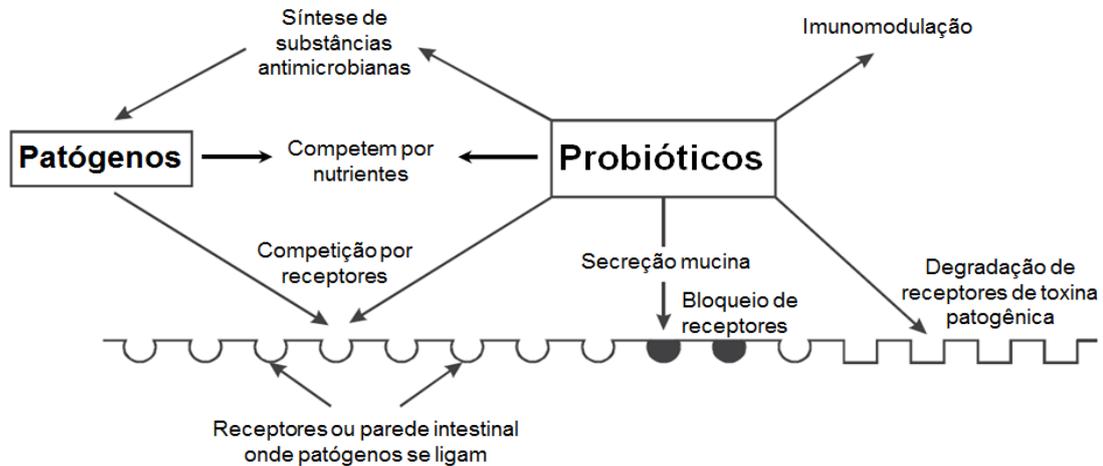


Figura 1 - Mecanismos de ação dos probióticos. (Fonte: Adaptado de KAUR et al., 2009).

Probióticos liberam compostos antimicrobianos, como ácidos orgânicos, ácidos graxos livres, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, que podem induzir uma ação antagonista contra organismos patogênicos (BALCÁZAR et al., 2007).

A ligação dos probióticos com células epiteliais do intestino como, por exemplo, as células de Paneth e enterócitos, estimulam a produção de defensinas e muco, respectivamente, substâncias importantes na proteção das superfícies mucosas contra invasão por patógenos (LEBEER et al., 2010).

A imunomodulação pelos probióticos é resultado da interação de moléculas conservadas da parede celular destes microrganismos (MAMPs) com receptores de reconhecimento do hospedeiro (PRRs), induzindo as vias de sinalização imune, sendo que o tipo de resposta imunológica gerada é diretamente dependente da linhagem probiótica ingerida e do tipo celular ao qual ela se liga (ALVIM, 2011).

A interação do micro-organismo probiótico com as células dendríticas é o fator que promove a produção de citocinas, principais moléculas do complexo de histocompatibilidade principal para apresentação de antígenos, e moléculas co-estimulatórias que polarizam células T em células T regulatórias e auxiliares tipo 1 e 2. Além disso, bactérias probióticas podem atingir o tecido linfóide associado ao intestino atravessando células intestinais especiais (transcitose), chamadas células M, e interagir diretamente com as células dendríticas, modulando a resposta imune (Figura 2) (LEBEER et al., 2010).

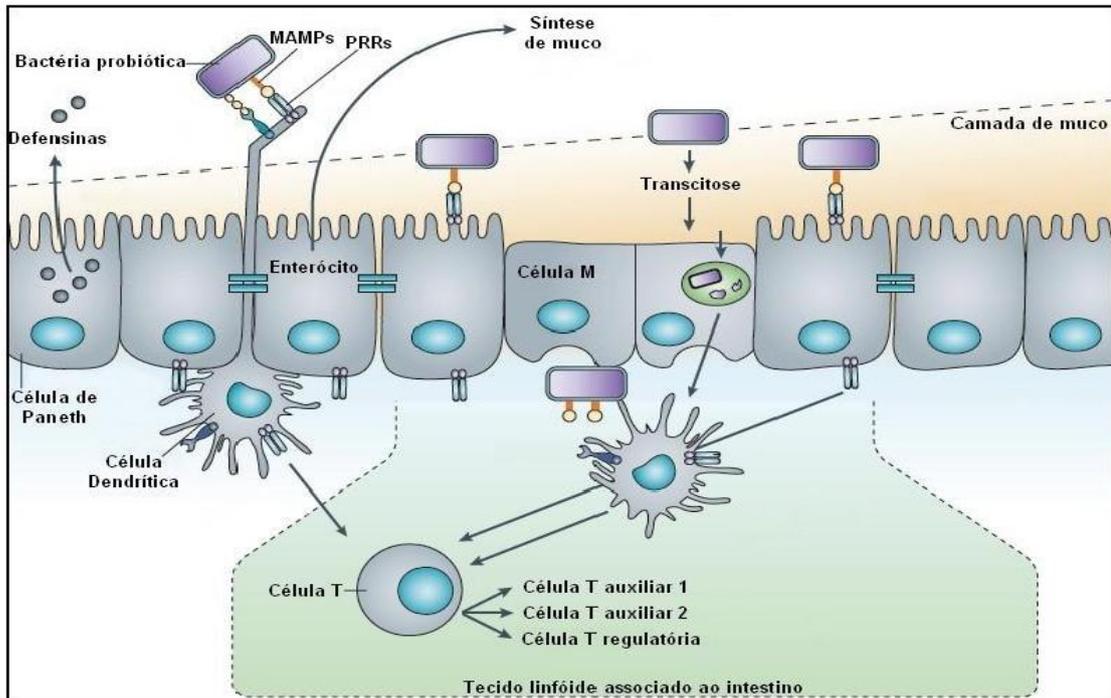


Figura 2 - Principais vias de imunomodulação promovida por um probiótico. (Fonte: Adaptado de LEBEER et al., 2010).

Para garantir um efeito contínuo, os probióticos devem ser ingeridos diariamente. Alterações favoráveis na composição da microbiota intestinal foram observadas com doses de 100 g de produto alimentício contendo  $10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC) de micro-organismos probióticos ( $10^7$  UFC/g de produto). Assim sendo, para serem de importância fisiológica ao consumidor, os probióticos devem alcançar populações acima de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/g ou mL de bioproduto (JELEN & LUTZ, 1998; CHARTERIS et al., 1998; NINESS, 1999; ROBERFROID, 1999).

Salienta-se que a dose diária de probióticos a ser administrada depende de uma série de fatores, entre os quais: tipo de probiótico, frequência diária de administração (1 a 4 vezes), período de administração (antes, durante ou após as refeições), duração da administração (de 1 dia a vários meses), veículo do probiótico (alimento fermentado, bebida, capsula, tablete ou pó) e viabilidade do probiótico (LEE & SALMINEM, 2009).

### 3.5 *Lactobacillus acidophilus*

O gênero *Lactobacillus* é formado, em geral, por micro-organismos gram-positivos, não formadores de esporos e desprovidos de flagelos, possuem forma bacilar ou cocobacilar (HAMMES & VOGEL, 1995). As bactérias lácticas são aerotolerantes ou anaeróbias e estritamente fermentativas. A glicose é fermentada predominantemente em ácido láctico no caso de homofermentação, ou em quantidades equimolares de ácido láctico, etanol e gás carbônico (e/ou de ácido acético) na heterofermentação. Sua tolerância ácida varia entre 0,3% e 1,9% de acidez titulável. O pH ótimo de crescimento está na faixa de 5,5 a 6,0 e temperatura ótima entre 35 e 40°C. Entretanto, crescem em temperaturas mais elevadas até 45°C (GOMES & MALCATA, 1999).

Seu habitat natural varia muito, desde alimentos, plantas, e o trato oral, genital e gastrointestinal de seres humanos e animais (HAMMES & VOGEL, 1995).

O *Lactobacillus acidophilus* não têm a capacidade de sintetizar a maior parte dos aminoácidos, vitaminas e cofatores, entretanto, é capaz de codificar um grande número de peptidases, proteases e os importadores de aminoácidos. Já foi demonstrado que a estirpe é capaz de sintetizar peptídeos com atividade antimicrobiana (KLAENHAMMER, 1993).

A capacidade dos *Lactobacillus* para desconjugar sais biliares é considerada essencial para o trânsito intestinal, e a adesão ao epitélio intestinal promove a colonização ou retenção no trato gastrointestinal de um modo geral. O gene para hidrolase de sais biliares foi identificado, e validado experimentalmente, no genoma de *Lactobacillus acidophilus* (MCAULIFFE et al., 2005).

Adesão de bactérias lácticas às superfícies epiteliais e da mucosa é um processo complexo que envolve diversos fatores. A estreita interação com os tecidos do hospedeiro podem fornecer aos probióticos uma vantagem ao estabelecer residência no TGI ou interagir com células da mucosa intestinal (BUCK et al., 2005).

Uma análise mais aprofundada revelou um locus de utilização da trealose, no qual foi mostrada a capacidade de conferir crioproteção, uma característica importante

para as culturas quando são submetidas à liofilização para a produção comercial (DUONG et al., 2006).

No Brasil, medicamentos contendo o *L. acidophilus* como agente probiótico, estão disponíveis no mercado com diversos nomes comerciais, tais como: Leiba<sup>®</sup> (União Química), Lactipan<sup>®</sup> (Sigma Pharma), Prolive<sup>®</sup> (Ache), com apresentações na forma de cápsulas e suspensão oral, para uso adulto e pediátrico. Seu uso está indicado como normalizador da microbiota intestinal, dificultando o desenvolvimento da microbiota patogênica.

Alimentos contendo Lactobacilos como agente probióticos, estão disponíveis no mercado brasileiro na forma de leites fermentados Actimel (Danone) - *Lactobacillus casei Defensis*, Yakult (Yakult) - *Lactobacillus casei Shirota*, Chamyto (Nestlé) - *Lactobacillus paracasei*, sobremesa láctea fermentada Sofyl (Yakult) - *Lactobacillus casei Shirota*, queijo Minas Frescal (Polenghi) - *Lactobacillus acidophilus*, Iogurte Bio Fibras (Batavo) - *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*.

### **3.6 *Saccharomyces boulardii***

Apesar das leveduras não estarem no grupo dos micro-organismos reconhecidos como probióticos pela ANVISA, diversos trabalhos relatam o efeito de algumas linhagens de leveduras como um agente preventivo e terapêutico para o tratamento de uma variedade de doenças diarreicas (MCFARLAND & BERNASCONI, 1993). A exemplo a *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*).

*S. boulardii* foi descoberto por um microbiologista francês, Henri Boulard em 1920. Pioneiro ao observar a presença de leveduras de *S. boulardii* na casca de frutas silvestres em uma área da Indochina, as quais eram empregadas empiricamente para tratamento dos casos de cólera nessa região (BUTS, 2009).

Atualmente, a taxonomia do gênero *Saccharomyces* é baseada em métodos genotípicos. Vários pesquisadores afirmam que a *S. boulardii* é uma linhagem de *S. cerevisiae*, uma vez que os métodos convencionais não podem ser utilizados para separar linhagens de *S. cerevisiae* (MARTINS, 2008). Entretanto, apesar da semelhança genética entre *S. boulardii* e *S. cerevisiae*, elas apresentam algumas

diferenças metabólicas e fisiológicas, particularmente no que se refere ao crescimento, resistência à temperatura de 37°C e ao estresse ácido, que são importantes características de um microrganismo usado como probiótico (FIETTO et al., 2004).

A patente para esta levedura foi comprada pelo “Laboratoires Biocodex” (Paris, França) em 1947, o qual deu início à pesquisa e fabricação de protocolos (MCFARLAND, 2010). A partir de 1960, iniciou-se a comercialização da levedura liofilizada, pelo “Laboratoires Biocodex” (Paris, França). Assim, seu uso como medicamento para combate às diarreias foi difundido em toda Europa e está disponível no mercado com diversos nomes comerciais, como: Ultra-Levure<sup>®</sup> (França), Florastor<sup>®</sup> (Estados Unidos), Precosa<sup>®</sup> (Dinamarca), Levucell<sup>®</sup> (Lallemand, Canadá), Perenterol<sup>®</sup> (Alemanha), Perenteryl<sup>®</sup> (Chile), Codex<sup>®</sup> (Itália), Floratil<sup>®</sup> (Brasil). Atualmente, a levedura é amplamente comercializada na Europa, Américas do Sul e do Norte, Ásia e África (MCFARLAND & BERNASCONI, 1993).

Os direitos de comercialização para a América do Sul foram adquiridos pelas Indústrias Químicas da MERCK S.A. Além disso, outras preparações contendo *S. boulardii* estão disponíveis no Brasil (MARTINS et al, 2005), como: Florent (Cifarma), Repoflor (Legrand), Lactipan (Sigma Pharma), Flomicin (Neo Química), Florazin (Herald`s).

O medicamento Floratil<sup>®</sup> (Merck) é comercializado no Brasil na forma de cápsulas e pó, para uso adulto e pediátrico, indicado para o tratamento da diarreia produzida por *Clostridium difficile* (*C. difficile*), por antibioticoterapia ou quimioterapia, e na restauração da microbiota intestinal fisiológica. Até o momento não são conhecidas condições que contraindiquem o uso de Floratil<sup>®</sup>, exceto eventuais alergias a qualquer um dos excipientes (estearato de magnésio, lactose e sacarose) (MERCK, 2012).

A partir da década de 60, a levedura começou a ser associada a outros medicamentos como antibióticos (MIGOWSKI & PUGLIESE, 2009).

*Saccharomyces boulardii* é uma levedura não patogênica (MCFARLAND & BERNASCONI, 1993), e tem sido extensamente utilizada para tratar pacientes com reincidência de diarreia associada à *C. difficile* (SURAWICZ et al., 2000). *S. boulardii in vivo* secreta uma protease de massa molecular de 54 KDa, capaz de

degradar toxinas A e B secretadas pelo *C. difficile*, isso leva a uma redução dos efeitos enterotóxicos e citotóxicos da infecção (CASTAGLIUOLO et al, 1999). Seu uso também foi sugerido como tratamento para a diarreia do viajante (KOLLARITSCH et al., 1989) e no tratamento da diarreia crônica de pacientes com HIV (SAINT-MARC et al., 1995).

A levedura exerce seu efeito terapêutico durante sua permanência em trânsito na luz intestinal, já que não é absorvida e também não coloniza a mucosa intestinal de maneira permanente (MIGOWSKI e PUGLIESE, 2009). Desta forma a administração deve ser realizada de maneira repetida e regular, embora seja capaz de atingir rapidamente altas concentrações artificiais no cólon (FULLER, 1992). A grande vantagem da terapia com os probióticos é a ausência de efeitos secundários, como a seleção de bactérias resistentes (MARTINS et al., 2005).

*Saccharomyces boulardii* é uma levedura termotolerante resistente aos ácidos gástricos e a bile (CANANI et al., 2011). O pH ótimo de crescimento está na faixa de 4,5 a 6,5, temperatura ótima de crescimento entre 20 e 30°C, e apresenta resistência à antibióticos (CZERUCKA et al., 2007).

### **3.7 Prebióticos e Simbióticos**

Os prebióticos são definidos como “ingredientes não digeríveis, seletivamente fermentáveis por bactérias intestinais que permitem modificações específicas na composição e/ou na atividade da microbiota gastrintestinal que resultam em benefícios ao bem estar e à saúde do hospedeiro” (ROBERFROID, 2007).

Os principais prebióticos utilizados pela indústria de alimentos mundial são os fruto-oligossacarídeos (FOS), a inulina, os isomalto-oligossacarídeos (IMO), os glico-oligossacarídeos (GOS) e os transgalacto-oligossacarídeos (TOS). Dentre os citados, a inulina e os FOS são os mais estudados (SIRÓ et al., 2008), sendo ainda os únicos para os quais a alegação de efeito sobre a composição da microbiota intestinal é permitida no Brasil (BRASIL, 2008).

De acordo com a lista que contempla os Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos elaborada pela ANVISA, “Os fruto-oligossacarídeos – FOS e a inulina contribuem para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”. Esta alegação pode ser utilizada desde que a porção do produto pronto para consumo forneça no mínimo 3 g de FOS ou inulina se o alimento for sólido ou 1,5 g se o alimento for líquido (BRASIL, 2008).

Os critérios para classificar um ingrediente alimentar como prebiótico são: 1) Resistência à acidez gástrica, hidrólise enzimática e absorção gastrintestinal; 2) Fermentação pela microbiota intestinal; e 3) Estímulo seletivo à multiplicação e/ou atividade dessas bactérias intestinais que contribuem para a saúde e bem-estar (ROBERFROID, 2007).

Alimentos como alcachofra, cebola, banana, aspargo, yacon e chicória contêm, naturalmente, componentes com propriedades prebióticas (NICOLI & VIEIRA, 2000).

A aveia tem recebido grande atenção por parte de médicos, nutricionistas, consumidores e entidades reguladoras devido às suas características nutricionais, e principalmente devido ao seu teor e qualidade das fibras alimentares. A fibra alimentar total da aveia varia entre 7,1 e 12,1%. Esta variação é devida aos métodos de determinação utilizados e às diferenças entre cultivares (GUTKOSKI et al., 2007).

Os simbióticos são a combinação de probióticos e prebióticos (NICOLI & VIEIRA, 2000).

### **3.8 Incorporação do micro-organismo probiótico em um substrato**

Os micro-organismos probióticos podem ser veiculados no substrato na forma livre (geralmente liofilizados) ou encapsulados.

### 3.8.1 Encapsulação

Manter a viabilidade da bactéria probiótica durante o armazenamento representa um desafio tecnológico significativo, uma vez que muitas bactérias probióticas são sensíveis à exposição a oxigênio, calor, meio ácido e compostos antimicrobianos (STANTON et al., 2003; MORTAZAVIAN et al., 2007).

Muitos trabalhos demonstram que é pequena a sobrevivência de bactérias probióticas em produtos na forma de células livres (DE VOS et al., 2010). A microencapsulação tem se mostrado uma alternativa viável para assegurar as propriedades terapêuticas dos probióticos (SAAD et al., 2011).

As vantagens de probióticos microencapsulados em alimentos podem ser discutidas de quatro pontos de vista: aumento da viabilidade dos probióticos nos produtos até o momento do consumo, aquisição de novos métodos de produção de alimentos, melhoria das propriedades sensoriais e imobilização de probióticos nos produtos. (MORTAZAVIAN et al., 2007).

A extrusão é a técnica de microencapsulação ou imobilização de micro-organismos mais popular, porque pode ser muito simples, de baixo custo e não há necessidade de emprego de temperaturas altas (KRASAEKOOPT et al., 2003).

Vários polímeros podem ser empregados para obtenção de cápsulas por este método, mas alginato, carragena, gelana e pectina são os mais utilizados (DOLEYRES & LACROIX, 2005). Dentre estes materiais, o alginato é o mais utilizado para tal propósito (FAVARO-TRINDADE & GROSSO, 2003). O uso do alginato é favorável porque esse reagente é mais barato, mais simples e de maior biocompatibilidade em comparação com outros polímeros (KLEIN et al., 1983; TANAKA et al., 1984; KRASAEKOOPT et al., 2003).

O alginato comercial é um sal, derivado do ácido algínico, obtido da parede celular de várias espécies de algas marinhas marrons. O ácido algínico é um biopolímero linear constituído por duas unidades monoméricas, o ácido  $\beta$ -D-manurônico e ácido  $\alpha$ -L-gulurônico. (FENNEMA, 2010). Esses dois monômeros ocorrem em três tipos de segmentos poliméricos:

- Blocos M constituídos apenas por unidades de ácido  $\beta$ -D-manurônico;

- Blocos G constituídos apenas por unidades de ácido  $\alpha$ -L-gulurônico;
- Blocos MG constituído por ácido  $\beta$ -D-manurônico e ácido  $\alpha$ -L-gulurônico. (FENNEMA, 2010; GACESA, 1988).

A estrutura representativa dos blocos de ácidos algínicos encontra-se demonstrada nas Figuras 3 e 4.

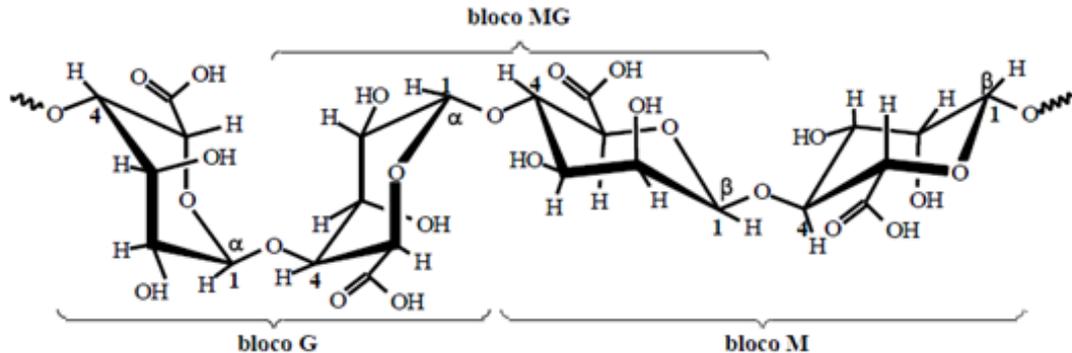


Figura 3 – Fragmento da cadeia polimérica do ácido algínico formada por blocos M, blocos G e blocos MG. (Fonte: LIMA, 2006).

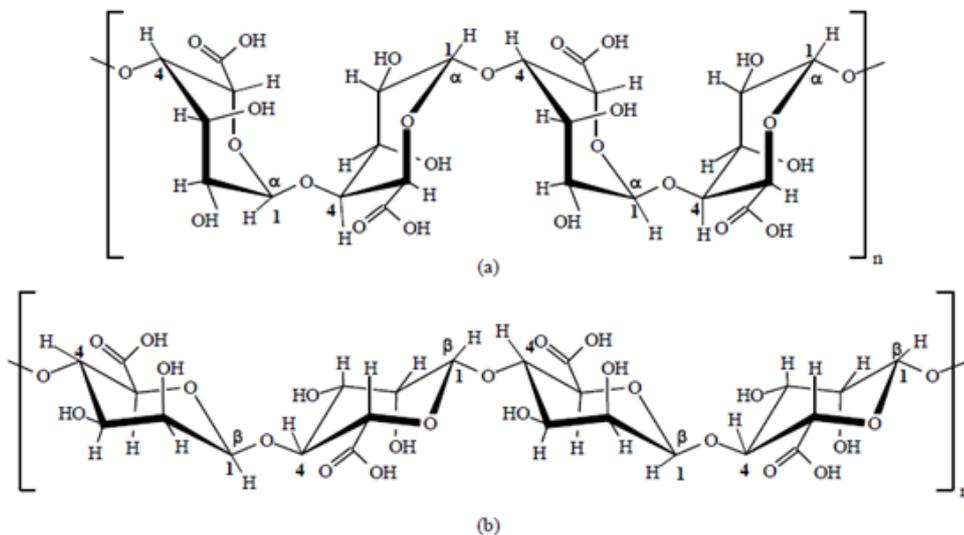


Figura 4 – Conformação dos blocos constituídos de resíduos: a) ácido  $\alpha$ -L-gulurônico e b)  $\beta$ -D-manurônico no ácido algínico. (Fonte: LIMA, 2006).

O ácido algínico é insolúvel em água à temperatura ambiente, tornando-se solúvel em temperaturas elevadas. Portanto, os sais de sódio, cálcio e potássio do ácido algínico, solúveis em água, são preferidos para o emprego na indústria de alimentos. (CRUZ et al., 2008). A Figura 5 mostra o fragmento da estrutura do alginato de sódio como sal de sódio do ácido algínico.

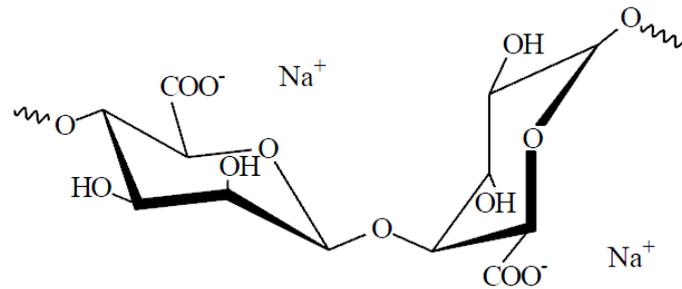


Figura 5 – Estrutura química do alginato de sódio. (Fonte: LIMA, 2006).

A viscosidade é a propriedade fundamental das soluções de alginatos, possibilitando usos diferentes como espessantes, estabilizantes e gelificantes (LARSEN, 2003). A viscosidade de suas soluções é devida às interações do tipo ligação de hidrogênio entre os grupos polares da estrutura polimérica, especialmente hidroxila, com os solventes hidroxilados, como água (MANO, 2001).

O alginato de sódio solúvel torna-se insolúvel por meio da adição de cátions divalentes, geralmente cálcio, resultando em géis ou filmes (CRUZ et al., 2008). (Figura 6).

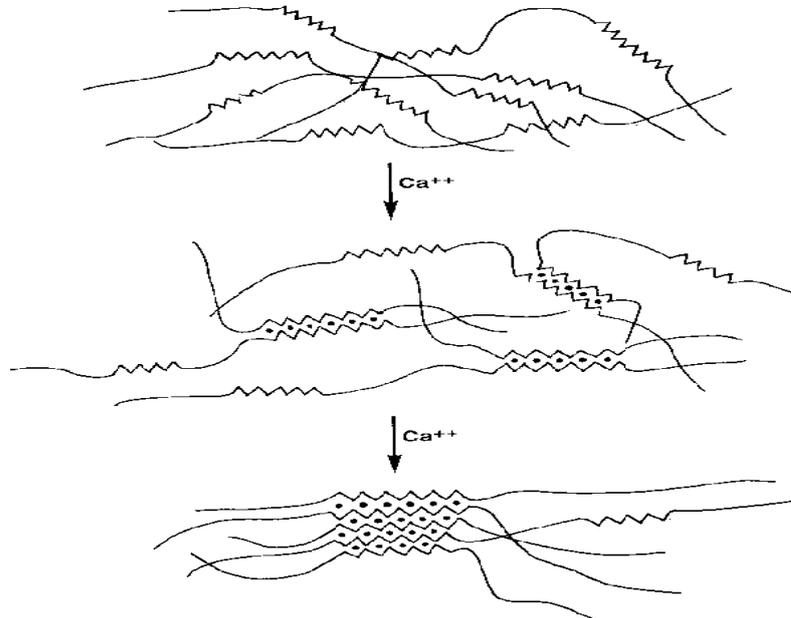


Figura 6 – Formação da rede de gel com cadeias homopoliméricas unidas por meio dos íons cálcio. (Fonte: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 1987).

A insolubilidade do alginato de cálcio é resultado das interações entre os íons cálcio e as regiões de blocos G da cadeia. As aberturas formadas entre duas cadeias de blocos G são cavidades que fixam o cálcio, arranjo também denominado “caixa de

ovo”, (Figura 7). A força do gel depende do conteúdo de blocos G no alginato e da concentração dos íons cálcio (FENNEMA, 2010).

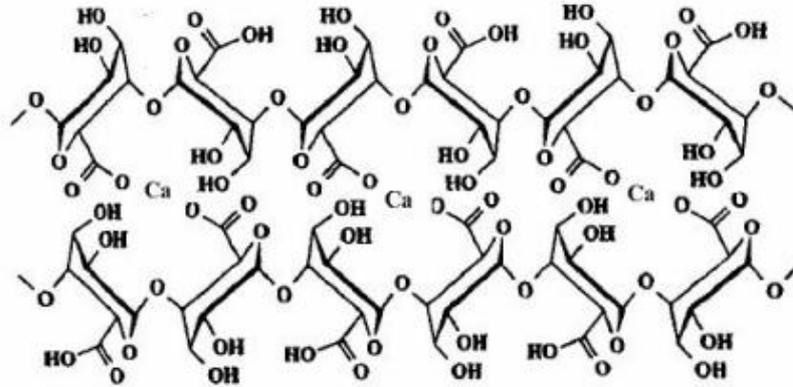


Figura 7 – Ligação entre as cadeias homopoliméricas por meio dos íons cálcio situados entre os grupos com carga negativa. (Fonte: BEDÊ, 2010).

A concentração de alginato usada para formar gel varia de 0,6 a 2% e a concentração da solução de  $\text{CaCl}_2$  de 0,05 a 1,5M (KRASAEKOOPT et al., 2003).

O método de extrusão, também chamado de gelificação ionotrópica, envolve a preparação de uma solução de hidrocolóide, a adição de micro-organismos nesta e a extrusão desta suspensão de células, através de uma seringa ou utilizando um bocal pneumático de alta eficiência, na forma de gotas, em solução de cloreto de cálcio, Figura 8 (KRASAEKOOPT et al., 2003, ALBERTINI et al., 2010).

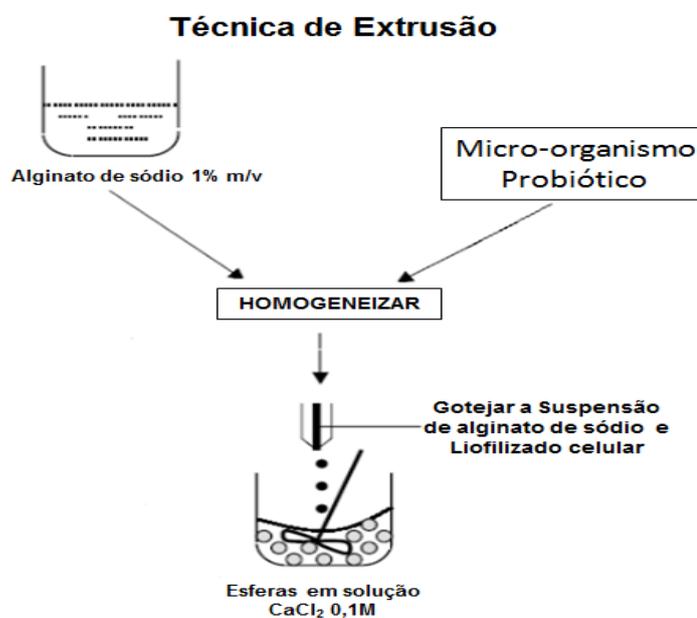


Figura 8 – Técnica de extrusão utilizada para encapsulação de probióticos. (Fonte: Adaptado de KRASAEKOOPT et al., 2003).

### **3.8.2 Liofilização**

Na liofilização ocorre o processo de desidratação por sublimação. O material, previamente congelado, é desidratado por sublimação, utilizando-se baixas temperaturas de secagem a pressões reduzidas. A liofilização é o método de primeira escolha para produtos termolábeis (CARPENTER et al., 1999).

O equipamento liofilizador remove o vapor d'água da amostra, mantendo-se a câmara abaixo da pressão do vapor da superfície do gelo. Desta forma, há desidratação por meio da sublimação do gelo sólido, sem que este passe pelo processo de fusão (FELLOWS, 2006).

A liofilização tem sido usada para preservar micro-organismos durante décadas e é o método preferido para coleções de cultura em todo o mundo. O material liofilizado permite o transporte fácil e de baixo custo e o manuseio. Geralmente, é recomendado liofilizar culturas com concentração acima de  $10^7$  células, no entanto é preciso assegurar que existem células remanescentes suficientes após o processo de liofilização, o armazenamento a longo prazo e a reconstituição, de modo que seja viável a propagação da estirpe (MORGAN et al., 2006).

### **3.9 Mercado de probióticos**

Os produtos probióticos disponíveis no mercado podem ser divididos em: alimentos, suplementos e ingredientes. As vendas globais de ingredientes probióticos, suplementos e alimentos chegaram a US\$ 21,6 bilhões em 2010 e devem chegar a US\$ 31,1 bilhões em 2015 (AGHEYISI, 2011).

Os alimentos probióticos ocupam a maior parte do mercado, correspondendo a 90,1% do total, com um faturamento de US\$ 19,6 bilhões no ano de 2010 e deve chegar a US\$ 28,1 bilhões em 2015 (AGHEYISI, 2011).

No Brasil, as vendas de alimentos funcionais em 2007 atingiram US\$ 500 mil, o que corresponde a cerca de 1% das vendas totais de alimentos. Ainda, cerca de 65%

do total de alimentos funcionais brasileiros são produtos probióticos (CRUZ et al., 2007).

Probióticos representam um dos maiores mercados de alimentos funcionais. A maior parte dos produtos disponíveis é de alguma forma láctea, como leite, sorvete, iogurte, queijo e sobremesas geladas (GRANATO et al., 2010). A indústria de laticínios encontrou nas culturas probióticas uma ferramenta para o desenvolvimento de novos produtos (CHAMPAGNE et al., 2005), uma vez que diversos produtos lácteos contribuem para a sobrevivência dos probióticos ao suco gástrico, particularmente por seu efeito tamponante e protetor (ROSS et al., 2005).

A maioria dos micro-organismos probióticos no mercado são geralmente adicionados aos alimentos com alta atividade de água (iogurte e leites fermentados), com vida útil mais curta, consumidos em dias ou semanas após a fabricação, ou podem ser adicionados em produtos secos, com baixa atividade de água e maior vida de prateleira (fórmula infantil) (MENEZES, 2011).

O Desenvolvimento de Novos Produtos tem adquirido crescente importância nas empresas devido à acirrada concorrência, apertadas margens de lucro, e as demandas dos consumidores no mercado, que têm forçado a elevação dos padrões de excelência nos níveis de qualidade, potencial para a transformação de novas tecnologias em novos produtos, melhores parcerias e menores custos dos produtos desenvolvidos e menor tempo para o desenvolvimento de novos produtos (JUGEND, 2006; SENHORAS et al., 2007). Isto inclui uma grande variedade de produtos, incluindo a conveniência, orgânicos, bem como os alimentos funcionais (GRANATO et al, 2010).

O aumento do número de indivíduos com intolerância à lactose, dislipidemia, além do vegetarianismo crescente, reforçam a importância de se ampliar o leque de opções de produtos que não sejam de base láctea, como produtos funcionais à base de soja, frutas e derivados, cereais, entre outros (VERBEKE, 2005; RENUKA et al., 2008).

Novas categorias de matérias-primas, no que diz respeito à tecnologia de probióticos, são certamente a chave para pesquisa e desenvolvimento na área de alimentos funcionais (FARNWORTH et al., 2007).

O mercado de probióticos é afetado por exigências globais de regulação, que se tornaram mais rigorosas nos últimos anos. De fato, os fabricantes têm de levar em conta a viabilidade celular e a função do probiótico, no momento de fazer uma alegação de saúde (JANKOVIC et al., 2010).

No aspecto tecnológico, o micro-organismo deve apresentar habilidade de ser produzido em condições industriais, ser incorporado ao alimento sem perder viabilidade e não ocasionar alterações sensoriais indesejáveis no produto (COLLINS et al., 1998; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; CHAMPAGNE & GARDNER, 2005).

A introdução bem sucedida de um produto no mercado estará diretamente relacionada com o seu aroma, sabor e textura (CHAMPAGNE & GARDNER, 2005).

Os fatores determinantes fundamentais para a maturidade em alimentos funcionais incluem: nível de apoio do governo e compatibilidade da legislação com o crescimento do mercado, a presença de um mercado maduro para alimentos processados, o nível de demanda dos consumidores por nutrição suplementar, a confiança dos consumidores nos produtos (RESEARCH AND MARKETS, 2008; EUROMONITOR, 2009).

O forte crescimento está ocorrendo em muitas categorias de alimentos funcionais, no qual incluem iogurtes probióticos, barras energéticas, águas funcionais, sucos, sobremesas e queijos (GRANATO et al., 2010).

### **3.10 Barra de cereais**

Barra de cereais é um produto multicomponente à base de ingredientes secos e agentes ligantes, que surgiu-se devido à busca por uma alternativa rápida e prática para satisfazer às necessidades nutricionais e/ou energéticas de diferentes consumidores (FREITAS & MORETTI, 2006). São alimentos que estão inclusos na categoria dos chamados “snacks” ou “snack foods”. Alimentos de tamanho pequeno, fácil de serem consumidos e que necessitam de pouco ou nenhum preparo, podendo ser consumidos entre as refeições principais (MATSUURA, 2005).

A produção de barras tem se direcionado para segmentos de mercado específicos (MATSUURA, 2005), dividindo-se em quatro tipos: 1) as fibrosas, que possuem altos níveis de glicose e de fibras e, por fornecerem um nível considerável de energia, seu consumo é aconselhado após a prática de exercícios físicos; 2) as *diet*, que possuem menos calorias e gorduras, não contêm açúcar e são adequadas para diabéticos e pessoas em dieta de restrição calórica; 3) as barras energéticas, que são mais calóricas e de fácil absorção, devendo ser consumidas durante ou após os exercícios e 4) as barras proteicas, que possuem um menor teor lipídico e muita proteína, por isso são consumidas por pessoas que desejam ganhar massa muscular (DEGÁSPARI et al., 2008).

Podem ser incorporados às barras de cereais diferentes ingredientes, como cereais integrais, frutas desidratadas ou cristalizadas, sementes, castanhas, nozes, amêndoas, açúcares, entre outros (FERREIRA, 2004).

Os principais aspectos considerados na elaboração desse produto incluem a escolha do cereal (aveia, trigo, arroz, cevada, milho), a seleção do carboidrato apropriado de forma a manter o equilíbrio entre o sabor e a vida-de-prateleira, o enriquecimento com vários nutrientes, sua estabilidade no processamento e o uso de fibra alimentar (O`CARROL, 1999).

Dentre os diferentes tipos de ingredientes que podem ser adicionados às barras de cereais, destaca-se a aveia, que é rica em fibra solúvel, responsável por reduzir o risco de doenças cardiovasculares, quando associada a uma dieta equilibrada. Os flocos de arroz, milho ou trigo são usados para compor a barra e conferir textura agradável, além de proporcionar menor densidade final ao produto (SAAD et al., 2011). A combinação desses ingredientes deve ser bem balanceada, de modo que o produto tenha crocância, textura e sabor adequado para agradar diferentes tipos de consumidores (FREITAS & MORETTI, 2006).

As barras de cereais foram introduzidas no Brasil em 1992, pela empresa Nutrimental. De início não foram bem aceitas pelos consumidores. Contudo ganharam espaço alguns anos depois, chegando a um crescimento no mercado de 25% ao ano, atraindo importantes empresas do ramo alimentício (BARBOSA, 2003).

Esta categoria está crescendo significativamente em relação a outros tipos de alimentos (PAIVA, 2008). No Brasil, seu consumo cresce dia a dia, conquistando pessoas de todas as idades e classes sociais (BUENO, 2005).

O catalisador para o crescimento no segmento de barra de cereais nos Estados Unidos, a partir da última década, foram produtos inovadores e um foco em conveniência e saúde (PALAZZOLO, 2003).

A associação entre barra de cereais e alimentos saudáveis é uma tendência no setor de alimentos, o que beneficia o mercado desses produtos (BOUSTANI & MITCHELL, 1990).

### **3.11 Análise sensorial**

Com a expansão das indústrias de alimentos e bebidas, após a segunda guerra mundial, métodos sistemáticos para acusar as reações sensoriais aos alimentos foram muito difundidos. Na atualidade a análise sensorial tem várias aplicações como em controle e garantia de qualidade, desenvolvimento de novos produtos, testes de consumidores, correlação com medidas físicas, químicas e instrumentais (COSTELL & DURAN, 1981).

A análise sensorial é realizada em função das respostas transmitidas pelos indivíduos às várias sensações que se originam de reações fisiológicas e são resultantes de certos estímulos, gerando a interpretação das propriedades intrínsecas aos produtos. Para isto é preciso que haja entre as partes, indivíduos e produtos, contato e interação. O estímulo é medido por processos físicos e químicos e as sensações por efeitos psicológicos. As sensações produzidas podem dimensionar a intensidade, extensão, duração, qualidade, gosto ou desgosto em relação ao produto avaliado. Nesta avaliação, os indivíduos, por meio dos próprios órgãos sensoriais, numa percepção somato-sensorial, utilizam os sentidos da visão, olfato, audição, tato e gosto (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

Dentre os métodos sensoriais disponíveis para se medir a aceitação e preferência dos consumidores com relação a um ou mais produtos, está à escala hedônica de

nove pontos, trata-se, do método afetivo mais utilizado devido à confiabilidade e validade de seus resultados e sua simplicidade em ser utilizada pelos provadores (STONE et al., 2012).

No teste da escala hedônica, o indivíduo expressa o grau de gostar ou de desgostar de um determinado produto, de forma globalizada ou em relação a um atributo específico. As escalas mais utilizadas contêm os termos definidos situados, por exemplo, entre “gostei extremamente” e “desgostei extremamente”, contendo um ponto intermediário com o termo “nem gostei; nem desgostei” (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Ingredientes da barra de cereais

Foram utilizados os seguintes ingredientes para a formulação da barra de cereais: Flocos de arroz (Harald Indústria e Comércio de Alimentos, Santana de Parnaíba, São Paulo - SP), Aveia em flocos longos (Cereal-Life LTDA, Carangola - MG), Nozes, Castanha de caju, Castanha do Brasil, Amêndoa – Fruti Fique, Banana Passas, Uva passas, Açúcar Mascavo – Jasmine, Xarope de glicose de milho (Arcólor, Arco-Íris Brasil LTDA, São Lourenço, São Paulo - SP), Água.

### 4.2 Culturas Probióticas

Foram utilizados dois micro-organismos probióticos para a formulação da barra de cereais. *Lactobacillus acidophilus* LA-14 FloraFIT, liofilizado, com contagem celular de  $2,0 \times 10^{11}$  UFC/g, gentilmente doados pela Danisco Brasil Ltda. e *Saccharomyces boulardii* liofilizado, obtida a partir do medicamento comercial Floratil<sup>®</sup>, Merck. Cada cápsula de 100 mg contém cerca de  $0,5 \times 10^9$  células. Ambas as amostras apresentavam-se dentro do prazo de validade e foram obedecidas as recomendações do fabricante para armazenamento.

### 4.3 Incorporação da cultura de *Saccharomyces boulardii* na barra de cereais

#### 4.3.1 Ativação e obtenção do concentrado celular a partir da cultura liofilizada de *Saccharomyces boulardii*

Inicialmente a cultura liofilizada da *Saccharomyces boulardii* foi ativada em 200mL de caldo YPG, (Extrato de Levedura 1% - HIMEDIA, Peptona 2% - HIMEDIA e

Dextrose 2% - HIMEDIA), esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Foram adicionados 20mg do Liofilizado FLORATIL<sup>®</sup>, MERCK, seguido de homogeneização. O frasco erlenmyer foi incubado, em estufa de incubação tipo B.O.D THELGA TF 34P, a 28°C sob agitação de 150 rpm, por 48 horas. O material foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C (Centrífuga Eppendorf 5804R). O material foi lavado duas vezes com solução tampão fosfato pH 7,2. Figura 9.

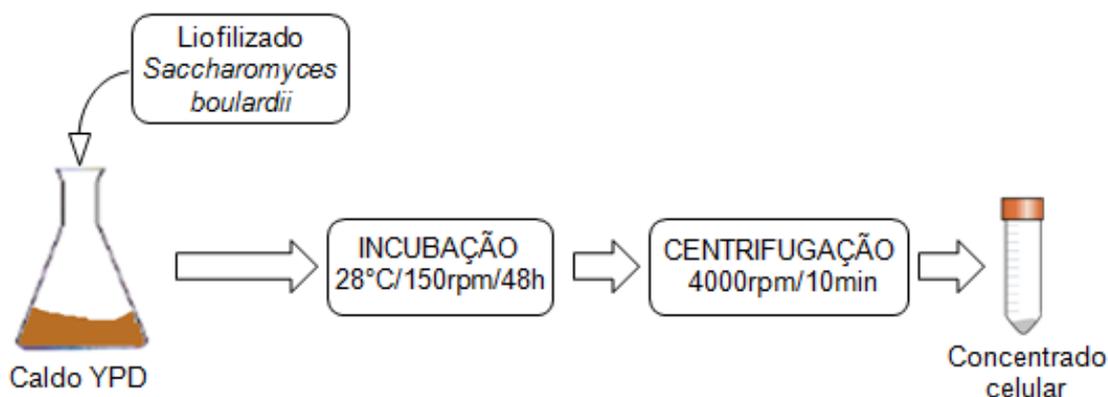


Figura 9 - Esquema para obtenção de concentrado celular de *Saccharomyces boulardii*.

#### 4.3.1.1 Granulação do concentrado celular de *Saccharomyces boulardii* com lactose

Após ativação da cultura liofilizada de *Saccharomyces boulardii* e obtenção do concentrado celular, realizou-se a granulação com lactose. O procedimento para obtenção do concentrado celular foi realizado em triplicata.

Para a obtenção do granulado foi utilizada a lactose como agente coesivo. Para que o produto final apresentasse as características necessárias de um granulado, foram testadas diferentes proporções entre concentrado celular : lactose. Foi estabelecida a proporção de 1:4 (Concentrado Celular : Lactose).

A granulação foi realizada em gral de vidro com pistilo de vidro. Adicionou-se o concentrado celular de *Saccharomyces boulardii* sobre a lactose. A mistura do micro-organismo com a lactose se deu por compactação, até obtenção dos briquetes. Para a calibração foi utilizado um tamis malha 20 mesh. Os granulados

foram acondicionados em embalagens hermeticamente fechadas. Todos os materiais utilizados no procedimento foram autoclavados 121°C durante 15 minutos.

#### **4.3.1.2 Encapsulação da *Saccharomyces boulardii* por extrusão em alginato de cálcio**

Após ativação da cultura liofilizada de *Saccharomyces boulardii* e obtenção do concentrado celular, realizou-se a encapsulação deste micro-organismo em alginato de sódio.

As esferas foram produzidas pela técnica de extrusão, de acordo com o método descrito por Albertini et al. (2010), com algumas modificações. Foi preparada uma solução contendo alginato de sódio 1% (m/v) com água destilada. A solução obtida foi autoclavada a 121°C durante 15 minutos, posteriormente armazenada em geladeira.

O concentrado celular foi suspenso na solução de alginato de sódio, na proporção de 1:4 (Concentrado Celular : Alginato de sódio 1%) e homogeneizada durante 30 minutos. Para o processo de extrusão foi utilizada uma seringa estéril BD SoloMed™ de 5 mL com agulha 25 mm e diâmetro interno 0,7 mm. A suspensão viscosa contendo micro-organismos probióticos, foi gotejada em solução estéril de cloreto de cálcio 0,1 M, sob agitação magnética. Ao término da extrusão, as esferas formadas foram deixadas em repouso por 45 minutos na solução de cloreto de cálcio, posteriormente filtradas a vácuo e lavadas por três vezes com 400 mL de água destilada esterilizada (Figura 10).

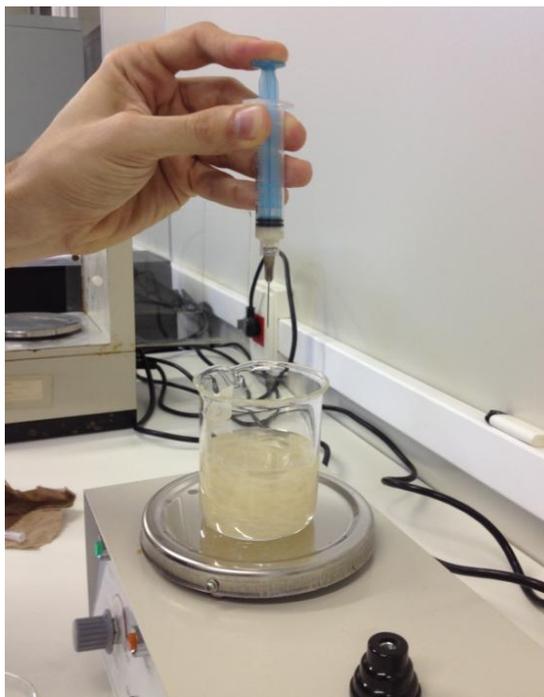


Figura 10 - Aparato montado para encapsulação, por extrusão, em alginato de sódio da levedura *Saccharomyces boulardii* e do *Lactobacillus acidophilus*.

#### **4.4 Incorporação da cultura de *Lactobacillus acidophilus* na barra de cereais**

##### **4.4.1 Encapsulação de *Lactobacillus acidophilus* LA-14 FloraFIT, liofilizado Danisco, por extrusão em alginato de cálcio**

As esferas foram produzidas conforme descrito no item 4.3.1.2. A cultura probiótica liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* LA-14 FloraFIT, Danisco foi suspensa na solução de alginato de sódio 1%, na proporção de 5% (m/m) e homogeneizada durante 30 minutos. O processo de extrusão foi o mesmo descrito no item 4.3.1.2.

#### 4.5 Incorporação do liofilizado da *S. boulardii* e *L. acidophilus* em barra de cereais

O liofilizado da *S. boulardii* proveniente do medicamento comercial Floratil<sup>®</sup>, Merck, e o liofilizado de *L. acidophilus* LA-14 FloraFIT, Danisco, foram incorporados diretamente na mistura dos cereais durante o preparo da barra de cereais. Para a formulação da barra de cereais probiótica adicionada de *S. boulardii* foi utilizada a quantidade de 100 mg, que continha cerca de  $0,5 \times 10^9$  células, e para a formulação da barra de cereais probiótica adicionada de *L. acidophilus* a quantidade de 1 grama, que continha cerca de  $2,0 \times 10^{11}$  células. A abertura das cápsulas e a pesagem do liofilizado foi realizada em condições assépticas.

#### 4.6 Formulação da barra de cereais

A composição da porção seca e do xarope de aglutinação usados na barra de cereais está apresentada na Tabela 1. A proporção de ingredientes secos e xarope de aglutinação foi de 65 : 35.

Tabela 1 - Formulação da barra de cereais probiótica.

<b>Ingredientes secos</b>	<b>(g/100g)</b>	<b>Xarope de aglutinação</b>	<b>(g/100g)</b>
Flocos de arroz (bolinha)	9,5	Xarope de glicose	88
Aveia em flocos (longo)	9,5	Água	12
Nozes	9,5		
Amêndoa	9,5		
Castanha de caju	9,5		
Castanha do Brasil	9,5		
Banana Passas	12		
Uva passas	18		
Açúcar Mascavo	13		

Proporção 65:35 (Cereais : Xarope de aglutinação)

A diferença entre as formulações se dá pela cultura probiótica utilizada, *Lactobacillus acidophilus* ou *Saccharomyces boulardii*, e a quantidade de micro-organismo adicionada em cada formulação, Tabela 2.

Tabela 2 - Quantidade de micro-organismo probióticos utilizado por Barra de cereais.

<b>Barra de Cereais</b>	<b>Quantidade adicionada / barra</b>
<i>Saccharomyces boulardii</i> granulado com lactose	1 grama
<i>Saccharomyces boulardii</i> liofilizado Floratil®, MERCK	100 mg
<i>Saccharomyces boulardii</i> encapsulado em alginato	1 grama
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-14 FloraFIT, Danisco	1 grama
<i>Lactobacillus acidophilus</i> encapsulado em alginato	1 grama

#### **4.7 Processamento da barra de cereais**

A preparação do xarope de aglutinação se deu em recipiente de aço inoxidável, no qual os ingredientes previamente pesados foram adicionados e aquecidos sob agitação. Foi acompanhado o teor de sólidos solúveis totais em refratômetro manual até obtenção de um xarope de 85-89° Brix.

Os ingredientes secos (cereais, frutas desidratadas, sementes), previamente pesados, foram misturados com o micro-organismo probiótico, seja na forma granulada, encapsulada ou liofilizada. Em seguida foram misturados ao xarope de aglutinação a uma temperatura em torno de 40°C, até incorporar homogeneamente o xarope à mistura de cereais. Procedeu-se a enformagem e laminação, em uma forma de aço inoxidável, para obtenção de um tamanho e peso padronizado da barra de cereal.

Realizou-se o resfriamento em geladeira por 10 minutos. Após o resfriamento, as barras de cereais foram cortadas e desenformadas em tamanhos retangulares 10x3x1 cm, e peso aproximadamente 25 gramas cada unidade. As barras foram acondicionadas individualmente em embalagens de filme flexível laminado (Figura 11).

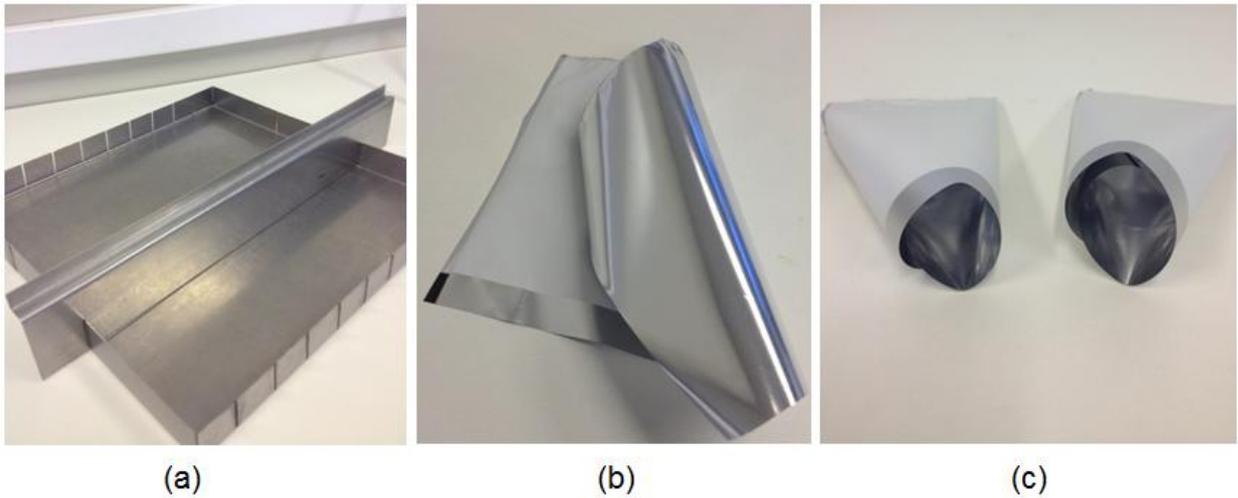


Figura 11 - (a) Forma de aço inoxidável e lâmina para corte; (b) Embalagem de filme flexível laminado; (c) Formato da embalagem de barra de cereais.

O fluxograma do processo de produção das barras de cereais probiótica encontra-se ilustrado na Figura 12.

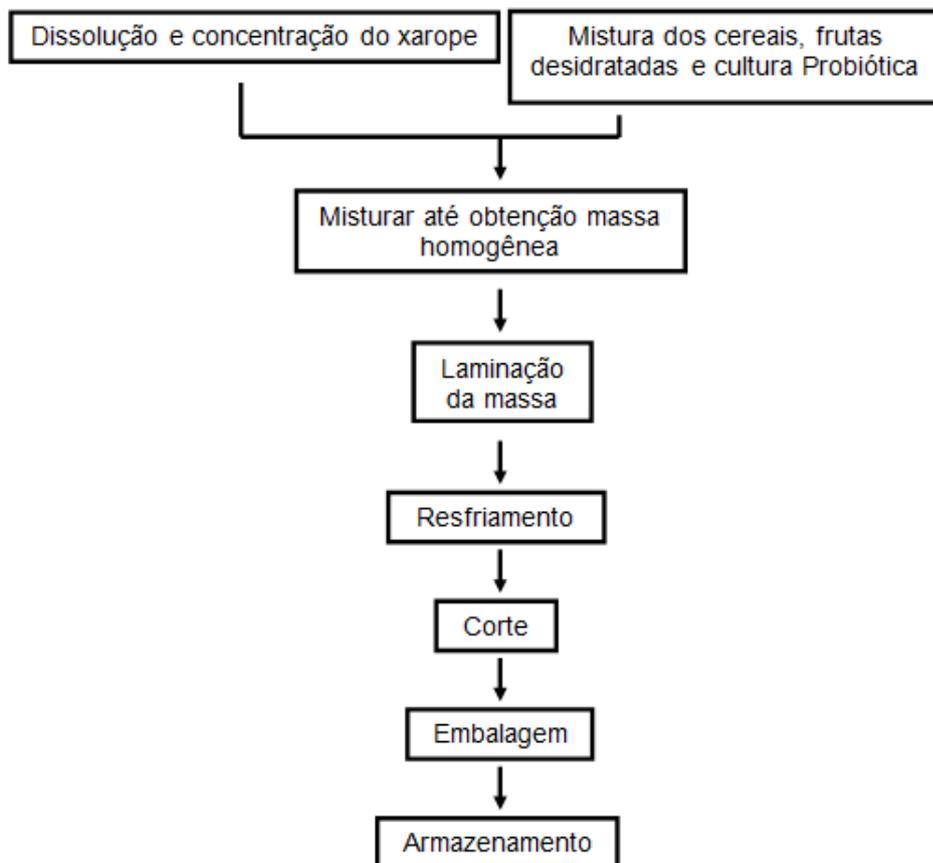


Figura 12 - Fluxograma do processo de produção das barras de cereais probiótica.

#### **4.8 Acompanhamento da viabilidade dos micro-organismos adicionados na barra de cereal durante o período de armazenamento**

Para o acompanhamento da viabilidade dos micro-organismos adicionadas na barra de cereal, foram realizadas, semanalmente, contagens de células destes micro-organismos por um período compreendido entre 8 semanas (*Saccharomyces boulardii*) e 7 semanas (*Lactobacillus acidophilus* LA-14). Para padronização do processo, o tempo zero correspondeu à análise 24 horas após a data de fabricação da barra de cereal.

##### **4.8.1 Acompanhamento da viabilidade de *Saccharomyces boulardii* granulada com lactose**

Antes da abertura da embalagem de cada amostra, higienizou-se a área externa com etanol 70% para diminuição dos contaminantes. Imediatamente pesaram-se em erlenmyer esterilizado 10 g da amostra e adicionaram-se 90 mL de solução tampão fosfato pH 7,2, constituindo a diluição  $10^{-1}$ . A partir desta diluição inicial, prosseguiu-se com outras diluições decimais até  $10^{-9}$ , utilizando como diluente 9,0 mL de solução tampão fosfato pH 7,2. Para a realização da contagem dos micro-organismos utilizou-se a técnica de semeadura por profundidade “pour plate”, em que se inoculou 1,0 mL de cada diluição em placas de Petri esterilizadas e verteram-se em cada placa 20 mL de Agar YPD (1% Extrato de levedura - HIMEDIA, 2% Peptona - HIMEDIA, 2% Glicose, 2% Agar - HIMEDIA), previamente fundido e resfriado a 45°C. Misturou-se o inóculo com o meio de cultura movimentando suavemente as placas, em uma superfície plana e seca, em movimentos circulares (4 vezes em sentido horário e 4 vezes no sentido anti-horário).

Após a semeadura, esperou-se solidificar o meio. As placas foram incubadas em estufa de incubação (B.O.D THELGA TF 34P), a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por 72 horas.

Placas contendo 25 a 250 colônias foram contadas e o resultado expresso como o logaritmo das unidades formadoras de colônias (UFC) / g de amostra (SILVA et al., 2010).

#### **4.8.2 Acompanhamento da viabilidade de *Saccharomyces boulardii* encapsuladas em alginato de cálcio**

Antes da abertura da embalagem de cada amostra, higienizou-se a área externa com etanol 70% para diminuição dos contaminantes. Imediatamente pesaram-se em erlenmyer esterilizado 10 g da amostra e adicionaram-se 90 mL de solução tampão fosfato pH 7,2, constituindo a diluição  $10^{-1}$ .

A amostra foi mantida sob agitação por 2 horas em agitador magnético (LEDERER & AVANCINI). A partir desta diluição inicial prosseguiu-se com outras diluições decimais até  $10^{-9}$ , utilizando como diluente 9,0 mL de solução tampão fosfato pH 7,2. Para a realização da contagem dos micro-organismos utilizou-se a técnica de semeadura por profundidade “pour plate”, em que inoculou-se 1,0 mL de cada diluição em placas de Petri esterilizadas e verteram-se em cada placa inoculada 20 mL de Agar YPD (1% Extrato de levedura - HIMEDIA, 2% Peptona - HIMEDIA, 2% Glicose, 2% Agar - HIMEDIA), previamente fundido e resfriado a 45°C. Misturou-se o inóculo com o meio de cultura movimentando suavemente as placas, em uma superfície plana e seca, em movimentos circulares (4 vezes em sentido horário e 4 vezes no sentido anti-horário).

Após a semeadura, esperou-se solidificar o meio. As placas foram incubadas em estufa de incubação (B.O.D THELGA TF 34P), a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por 72 horas.

Placas contendo 25 a 250 colônias foram contadas e o resultado expresso como o logaritmo das unidades formadoras de colônias (UFC) / g de amostra (SILVA et al., 2010).

#### **4.8.3 Acompanhamento da viabilidade de *Saccharomyces boulardii* liofilizada Floratil<sup>®</sup>, Merck**

Antes da abertura da embalagem de cada amostra, higienizou-se a área externa com etanol 70% para diminuição dos contaminantes. Imediatamente pesaram-se em erlenmyer esterilizado 10 g da amostra e adicionaram-se 90 mL de solução tampão fosfato pH 7,2, constituindo a diluição  $10^{-1}$ . A partir desta diluição inicial prosseguiu-se com outras diluições decimais até  $10^{-9}$ , utilizando como diluente 9,0 mL de solução tampão fosfato pH 7,2. Para a realização da contagem dos micro-organismos utilizou-se a técnica de semeadura por profundidade “pour plate”, em que se inoculou 1,0 mL de cada diluição em placas de Petri esterilizadas e verteram-se em cada placa 20 mL de Agar YPD (1% Extrato de levedura - HIMEDIA, 2% Peptona - HIMEDIA, 2% Glicose, 2% Agar - HIMEDIA), previamente fundido e resfriado a 45°C. Misturou-se o inóculo com o meio de cultura movimentando suavemente as placas, em uma superfície plana e seca, em movimentos circulares (4 vezes em sentido horário e 4 vezes no sentido anti-horário).

Após a semeadura, esperou-se solidificar o meio. As placas foram incubadas em estufa de incubação (B.O.D THELGA TF 34P), a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por 72 horas.

Placas contendo 25 a 250 colônias foram contadas e o resultado expresso como o logaritmo das unidades formadoras de colônias (UFC) / g de amostra (SILVA et al., 2010).

#### **4.8.4 Acompanhamento da viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* LA-14 FloraFIT, Danisco liofilizado**

Antes da abertura da embalagem de cada amostra, higienizou-se a área externa com etanol 70% para diminuição dos contaminantes. Imediatamente pesaram-se em erlenmyer esterilizado 10 g da amostra e adicionaram-se 90 mL de solução tampão fosfato pH 7,2, constituindo a diluição  $10^{-1}$ . A partir desta diluição inicial prosseguiu-

se com outras diluições decimais até  $10^{-9}$ , utilizando como diluente 9,0 mL de solução tampão fosfato pH 7,2. Para a realização da contagem dos micro-organismos utilizou-se a técnica de semeadura por profundidade “pour plate”, em que se inoculou 1,0 mL de cada diluição em placas de Petri esterilizadas e verteram-se em cada placa 20 mL de ágar MRS (HIMEDIA), previamente fundido e resfriado a 45°C. Misturou-se o inóculo com o meio de cultura movimentando suavemente as placas, em uma superfície plana e seca, em movimentos circulares (4 vezes em sentido horário e 4 vezes no sentido anti-horário).

Após a semeadura, esperou-se solidificar o meio, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica, a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  por 72 horas.

Placas contendo 25 a 250 colônias foram contadas e o resultado expresso como o logaritmo das unidades formadoras de colônias (UFC) / g de amostra (SILVA et al., 2010).

#### **4.8.5 Acompanhamento da viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* LA-14 FloraFIT, Danisco encapsulados em alginato de cálcio**

Antes da abertura da embalagem de cada amostra, higienizou-se a área externa com etanol 70% para diminuição dos contaminantes. Imediatamente pesaram-se em erlenmyer esterilizado 10 g da amostra e adicionaram-se em 90 mL de solução tampão fosfato pH 7,2, constituindo a diluição  $10^{-1}$ .

A amostra foi mantida sob agitação por 2 horas em agitador magnético. A partir desta diluição inicial  $10^{-1}$  prosseguiu-se com outras diluições decimais até  $10^{-9}$ , utilizando como diluente 9,0 mL de solução tampão fosfato pH 7,2.

Para a realização da contagem dos micro-organismos utilizou-se a técnica de semeadura por profundidade “pour plate”, em que inoculou-se 1,0 mL de cada diluição em placas de Petri esterilizadas e verteram-se em cada placa inoculada 20 mL de ágar MRS (HIMEDIA), previamente fundido e resfriado a 45°C. Misturou-se o inóculo com o meio de cultura movimentando suavemente as placas, em uma

superfície plana e seca, em movimentos circulares (4 vezes no sentido horário e 4 vezes no sentido anti-horário).

Após a semeadura, esperou-se solidificar o meio, as placas foram incubadas em estufa, Bacteriológica, a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  por 72 horas.

Placas contendo 25 a 250 colônias foram contadas e o resultado expresso como o logaritmo das unidades formadoras de colônias (UFC) / g de amostra (SILVA et al., 2010).

#### **4.9 Avaliação sensorial**

Amostras de 10 g de barras de cereais foram apresentadas aos consumidores à temperatura ambiente em copos plásticos de 50 mL, identificados com códigos de 3 dígitos. A avaliação sensorial foi realizada por uma equipe de 36 indivíduos não treinados: professores, estudantes e funcionários da Universidade federal do Espírito Santo, de ambos os sexos, com média de idade entre 20 e 40 anos. O procedimento se deu em uma sala, sob luz branca equivalente a luz do dia. Foram apresentadas a cada indivíduo quatro amostras de barras de cereais, correspondentes a três diferentes formulações desenvolvidas no presente trabalho (Barra de Cereal sem Probiótico, Barra de Cereal com *Lactobacillus acidophilus* liofilizado, Barra de Cereal com *Saccharomyces boulardii* encapsulado em alginato) e uma amostra comercial sabor banana.

Utilizou-se a escala hedônica não estruturada de nove pontos que contém os termos definidos situados entre “gostei extremamente” e “desgostei extremamente”. Os atributos avaliados foram: aparência, textura, sabor e impressão global. A ficha de avaliação sensorial encontra-se no Anexo A.

O teste sensorial foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa, Anexo B.

#### **4.10 Análise estatística**

Os dados obtidos foram analisados por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5%, utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.00. Foi utilizado o teste de Tukey para comparação das médias.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Ativação da cultura liofilizada de *Saccharomyces boulardii* e obtenção do concentrado celular para granulação com lactose

A massa de concentrado celular obtida após ativação e centrifugação da cultura liofilizada de *Saccharomyces boulardii* está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Massa de concentrado celular obtida após a ativação e centrifugação da cultura liofilizada de *Saccharomyces boulardii* para granulação com lactose.

<b>Repetição</b>	<b>Massa obtida (g/200 mL)</b>
<b>I</b>	4,64
<b>II</b>	4,23
<b>III</b>	3,47
<b>Média</b>	4,12
<b>Desvio Padrão</b>	0,59

Observa-se na Tabela 3, que o processo de ativação utilizado é viável no que diz respeito ao aumento da massa celular de *Saccharomyces boulardii*, visto que inicialmente foram utilizados 20 mg do Liofilizado FLORATIL<sup>®</sup>, MERCK. A média encontrada das três repetições realizadas foi de 4,12 g/200 mL, o que representa um aumento médio de massa celular de 206 vezes.

Observa-se na Figura 13, o frasco após 48 horas sob agitação de 150 rpm em temperatura de 28°C, a turvação do meio de cultura YPD e o granulado do concentrado celular de *Saccharomyces boulardii* com lactose.

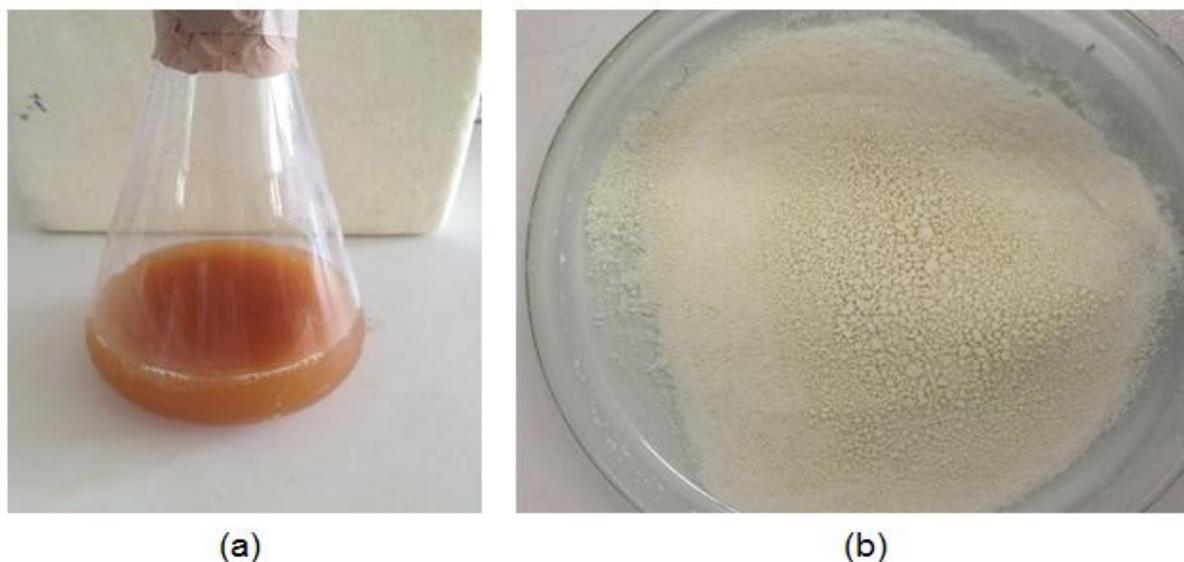


Figura 13 - (a) Frasco após ativação de 20mg de *Saccharomyces boulardii* em estufa a 28°C sob agitação de 150 rpm, por 48 horas; (b) Granulado do concentrado celular de *Saccharomyces boulardii* com lactose.

A proporção de 1:4 (Concentrado Celular: Lactose), resultou em quantidades significativas de granulado, de modo que foi utilizada a quantidade de 1 g de granulado por barra de cereal.

## 5.2 Ativação da cultura liofilizada de *Saccharomyces boulardii* e obtenção concentrado celular para encapsulação por extrusão em alginato de cálcio

A massa de concentrado celular obtida após ativação e centrifugação da cultura liofilizada de *Saccharomyces boulardii* estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Massa de concentrado celular obtida após a ativação e centrifugação da cultura liofilizada de *Saccharomyces boulardii* para encapsulação por extrusão em alginato de cálcio.

Repetição	Massa obtida (g/200 mL)
I	3,86
II	3,61
III	3,08
<b>Média</b>	<b>3,52</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,39</b>

Observa-se na Tabela 4 que a média encontrada das três repetições realizadas foi de 3,52 g/200 mL, representando um aumento médio de massa celular de 176 vezes.

As esferas obtidas após encapsulação em alginato de cálcio pela técnica de extrusão encontram-se ilustradas na Figura 14.

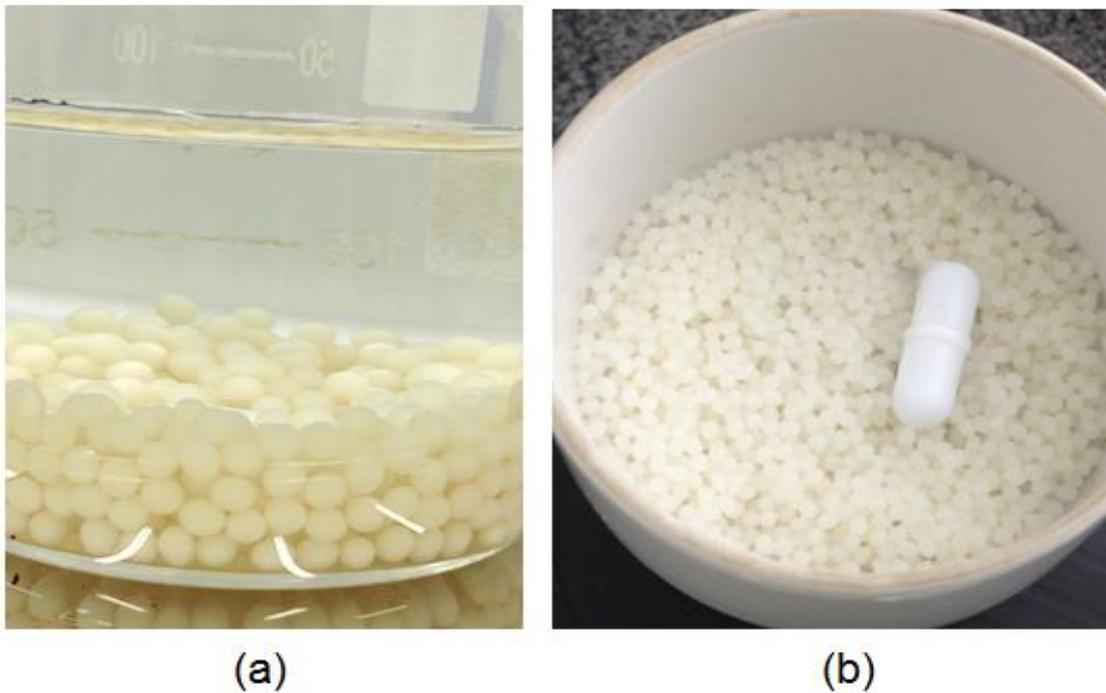


Figura 14 - (a) Esferas de Alginato de Cálcio contendo *S. boulardii* em solução de  $\text{CaCl}_2$ ; (b) Esferas de Alginato de Cálcio contendo *S. boulardii* após filtração.

### 5.3 Encapsulação de *Lactobacillus acidophilus* LA-14 FloraFIT, Danisco por extrusão em alginato de cálcio

As esferas obtidas após encapsulação em alginato de cálcio pela técnica de extrusão encontram-se ilustradas na Figura 15.

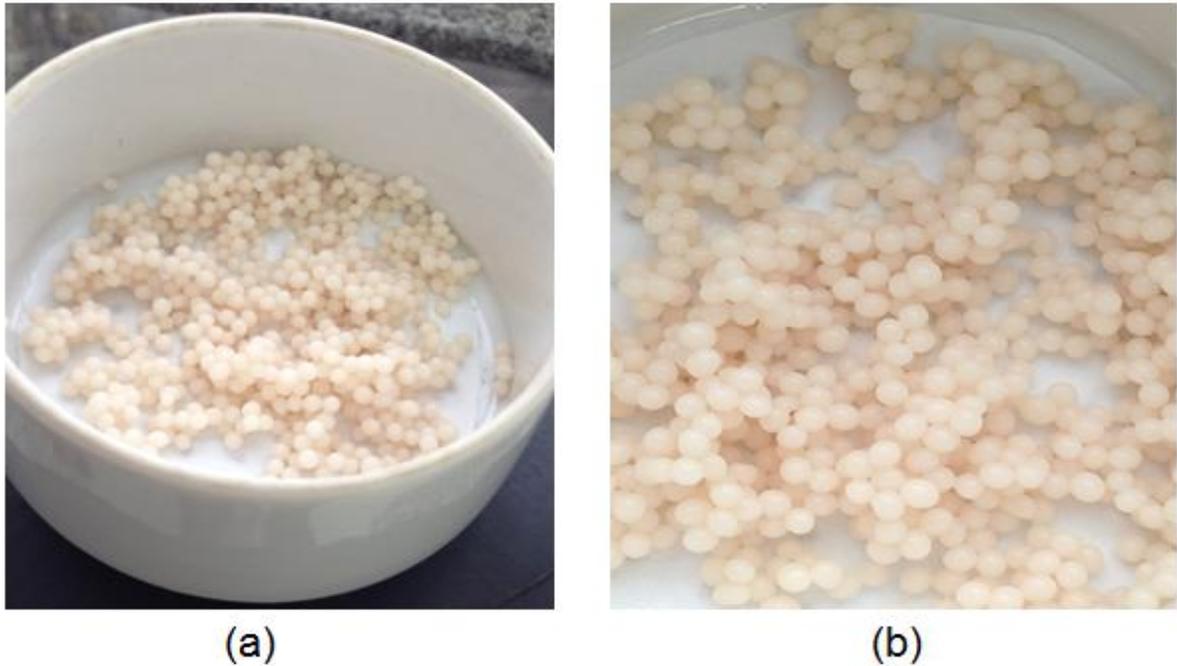


Figura 15 - (a) e (b) Esferas de Alginato de Cálcio contendo *L. acidophilus* após filtração.

#### 5.4 Barra de Cereal produzida

A Figura 16 apresenta a barra de cereais desenvolvida neste trabalho.

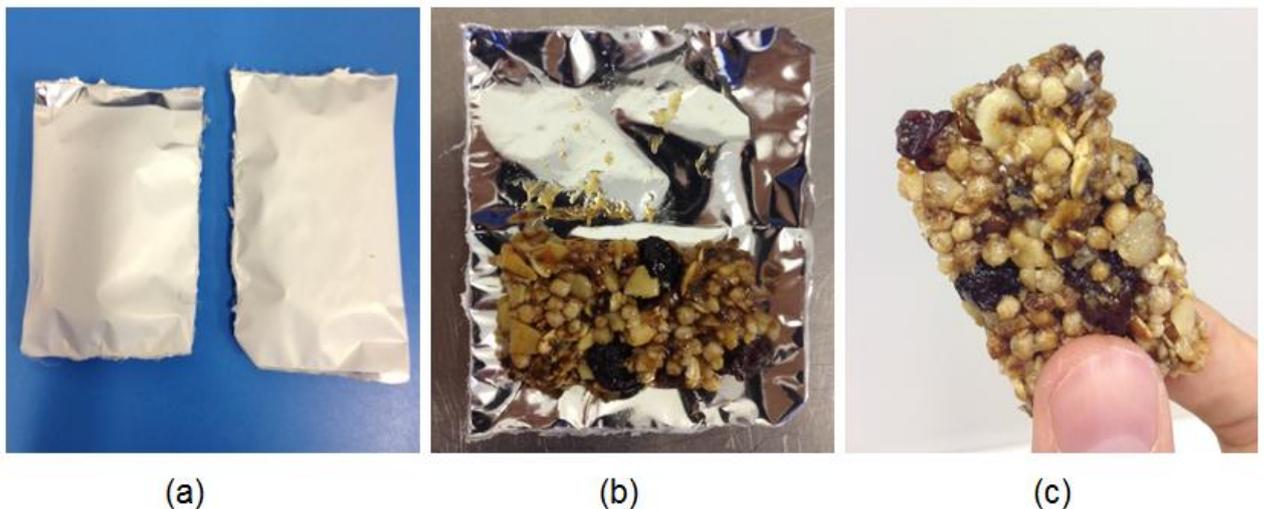


Figura 16 - (a) Barra de cereal embalada em filme flexível laminado; (b) Barra de cereal em embalagem de filme flexível laminado aberta; (c) Aparência da barra de cereais.

Em todas as formulações desenvolvidas neste trabalho, seja com micro-organismos liofilizados, encapsulados ou granulado com lactose, a aparência da barra de cereais

foi a mesma. Os micro-organismos incorporados não interferiram na formulação do produto.

## 5.5 Acompanhamento da viabilidade dos micro-organismos incorporados nas barras de cereais

### 5.5.1 Acompanhamento da viabilidade da *Saccharomyces boulardii* granulada com lactose

Os resultados da população viável de *Saccharomyces boulardii* granulada com lactose durante o tempo de oito semanas estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - População viável de *Saccharomyces boulardii* (Média  $\pm$  DP, n=2) granulada com lactose, em barra de cereais, durante o armazenamento (log UFC/g). Réplica I, II, III.

<b><i>Saccharomyces boulardii</i> (log UFC/g)</b>				
<b>Tempo (Semanas)</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>Média</b>
<b>0</b>	6,95 $\pm$ 0,12	6,61 $\pm$ 0,05	6,50 $\pm$ 0,06	6,69 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>
<b>2</b>	6,28 $\pm$ 0,12	6,11 $\pm$ 0,04	6,16 $\pm$ 0,09	6,18 $\pm$ 0,08 <sup>ab</sup>
<b>3</b>	5,97 $\pm$ 0,06	5,69 $\pm$ 0,05	6,13 $\pm$ 0,05	5,93 $\pm$ 0,22 <sup>ab</sup>
<b>4</b>	5,80 $\pm$ 0,33	5,49 $\pm$ 0,08	6,14 $\pm$ 0,05	5,81 $\pm$ 0,32 <sup>ab</sup>
<b>5</b>	5,48 $\pm$ 0,37	5,55 $\pm$ 0,05	6,06 $\pm$ 0,04	5,70 $\pm$ 0,31 <sup>ab</sup>
<b>6</b>	5,20 $\pm$ 0,33	5,30 $\pm$ 0,08	5,99 $\pm$ 0,14	5,50 $\pm$ 0,43 <sup>b</sup>
<b>7</b>	4,99 $\pm$ 0,32	5,17 $\pm$ 0,03	6,00 $\pm$ 0,09	5,39 $\pm$ 0,53 <sup>b</sup>
<b>8</b>	4,95 $\pm$ 0,63	4,98 $\pm$ 0,16	6,03 $\pm$ 0,06	5,32 $\pm$ 0,61 <sup>b</sup>

a,b – médias com pelo menos uma letra igual na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

Observa-se na Tabela 5 que a população de *S. boulardii* granulada com lactose, no tempo 0 apresentou contagem média de 6,69 log UFC/g. Ao final das 8 semanas de armazenamento apresentava contagem média de 5,32 log UFC/g, uma redução média de 1,37 ciclos logarítmicos.

A lista de alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos de julho de 2008 da ANVISA não contempla a levedura *S. boulardii* como micro-organismo com efeito probiótico, entretanto tem sido extensamente utilizada para tratar pacientes com reincidência de diarreia associada à *C. difficile*, diarreia do viajante e diarreia crônica de pacientes com HIV (KOLLARITSCH et al., 1989; SAINT-MARC et al., 1995; SURAWICZ et al., 2000).

Levando em consideração que o mercado de alimentos com propriedades funcionais está em crescente expansão, apoiado por evidências científicas, desenvolvimento de alimentos diferenciados, além dos tradicionais produtos funcionais lácteos, torna-se necessário estabelecer parâmetros para micro-organismos extensamente estudados como a levedura *S. boulardii*.

As curvas de sobrevivência de *Saccharomyces boulardii* granulada com lactose estão apresentadas na Figura 17.

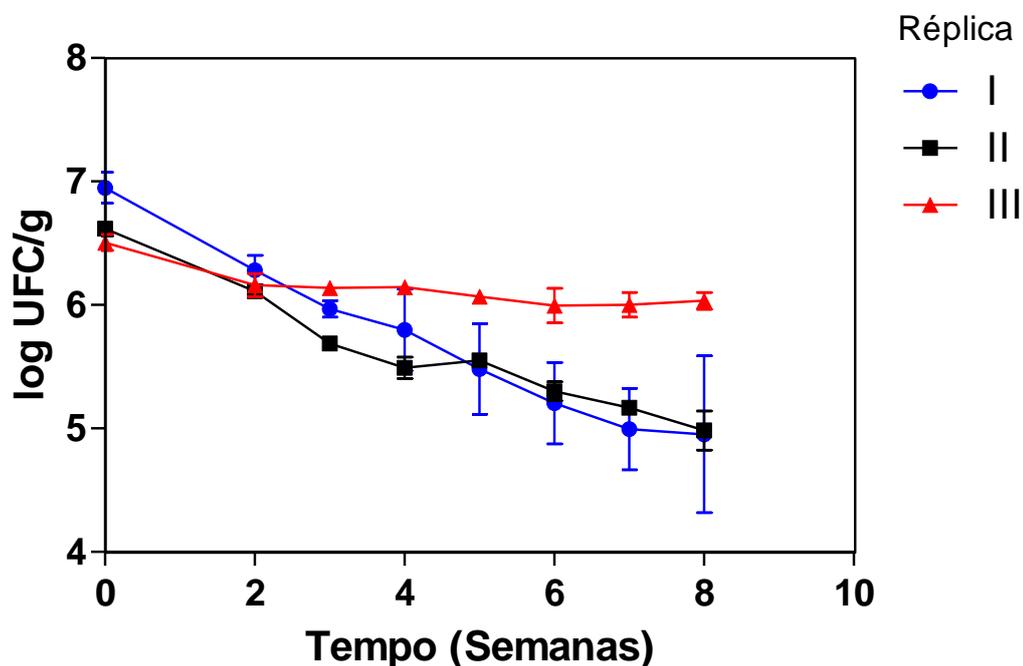


Figura 17 - Curva de sobrevivência de *Saccharomyces boulardii* granulada com lactose.

### 5.5.2 Acompanhamento da viabilidade da *Saccharomyces boulardii* encapsulada em alginato de cálcio

Os resultados da população viável de *Saccharomyces boulardii* encapsulada em alginato de cálcio durante o tempo oito semanas estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - População viável de *Saccharomyces boulardii* (Média  $\pm$  DP, n=2) encapsulada em alginato de cálcio, em barra de cereais, durante o armazenamento (log UFC/g). Réplica I, II, III.

Tempo (Semanas)	<i>Saccharomyces boulardii</i> (log UFC/g)			Média
	I	II	III	
0	8,00 $\pm$ 0,10	8,07 $\pm$ 0,04	8,20 $\pm$ 0,11	8,09 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
2	7,60 $\pm$ 0,01	7,67 $\pm$ 0,06	7,83 $\pm$ 0,20	7,70 $\pm$ 0,11 <sup>ab</sup>
3	7,59 $\pm$ 0,06	7,34 $\pm$ 0,13	7,28 $\pm$ 0,12	7,40 $\pm$ 0,16 <sup>abc</sup>
4	7,33 $\pm$ 0,20	6,74 $\pm$ 0,33	6,35 $\pm$ 0,28	6,80 $\pm$ 0,49 <sup>bc</sup>
5	6,64 $\pm$ 0,13	6,39 $\pm$ 0,26	5,92 $\pm$ 0,14	6,31 $\pm$ 0,36 <sup>cd</sup>
6	6,22 $\pm$ 0,23	5,47 $\pm$ 0,05	5,03 $\pm$ 0,13	5,57 $\pm$ 0,60 <sup>de</sup>
7	5,78 $\pm$ 0,11	5,11 $\pm$ 0,58	4,54 $\pm$ 0,06	5,14 $\pm$ 0,62 <sup>e</sup>
8	5,05 $\pm$ 0,04	4,18 $\pm$ 0,05	4,46 $\pm$ 0,23	4,56 $\pm$ 0,44 <sup>e</sup>

a,b,c,d,e – médias com pelo menos uma letra igual na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância (p<0,05).

Observa-se na Tabela 6 que a população de *Saccharomyces boulardii*, em barra de cereais, no tempo 0 apresentou contagem na faixa de 8,0 log UFC/g. Ao final das 8 semanas de armazenamento apresentava contagem média de 4,56 log UFC/g, uma redução média de 3,53 ciclos logarítmicos.

De acordo com Graff et al. (2008), poucos dados estão disponíveis no que diz respeito à encapsulação de leveduras. Em seu trabalho envolvendo microencapsulação da levedura *Saccharomyces boulardii* em alginato de cálcio, foi possível observar por meio de testes *in vitro* e *in vivo* a eficiente proteção das microesferas em meio ácido e um aumento da velocidade de passagem pelo trato gastrointestinal da levedura encapsulada quando comparada com a forma livre, desta forma, a levedura chega mais rapidamente ao seu local de ação no intestino grosso.

As curvas de sobrevivência de *Saccharomyces boulardii* encapsulada em alginato de cálcio estão apresentadas na Figura 18.

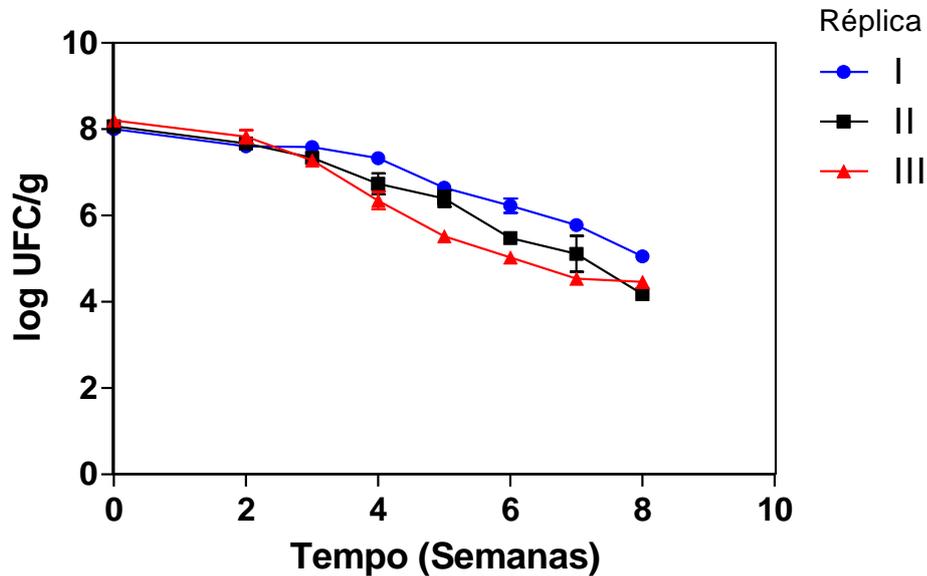


Figura 18 - Curva de sobrevivência de *Saccharomyces boulardii* encapsulada em alginato de cálcio.

### 5.5.3 Acompanhamento da viabilidade da *Saccharomyces boulardii* liofilizada Floratil<sup>®</sup>, Merck

Os resultados da população viável de *Saccharomyces boulardii*, liofilizada Floratil<sup>®</sup>, Merck, durante o tempo de armazenamento estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - População viável de *Saccharomyces boulardii* (Média  $\pm$  DP, n=2) liofilizada Floratil<sup>®</sup>, Merck, em barra de cereais, durante o armazenamento (log UFC/g). Réplica I, II.

<b><i>Saccharomyces boulardii</i> (log UFC/g)</b>			
<b>Tempo (Semanas)</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>Média</b>
<b>0</b>	7,74 $\pm$ 0,02	7,72 $\pm$ 0,09	7,73 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
<b>2</b>	7,68 $\pm$ 0,06	7,77 $\pm$ 0,01	7,72 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>
<b>4</b>	7,46 $\pm$ 0,02	7,57 $\pm$ 0,13	7,51 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
<b>6</b>	7,47 $\pm$ 0,07	7,55 $\pm$ 0,03	7,51 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
<b>8</b>	7,25 $\pm$ 0,05	7,24 $\pm$ 0,04	7,24 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>

a,b,c – médias com pelo menos uma letra igual na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

Observa-se na Tabela 7 que a população de *Saccharomyces boulardii* liofilizada Floratil<sup>®</sup>, Merck permaneceu na faixa de 7,0 log UFC/g, durante o tempo de armazenamento de 8 semanas. Os resultados encontrados de manutenção da viabilidade praticamente constantes durante o armazenamento estão de acordo com Costa & Ferreira (1991) e com Silva et al. (1992), os quais relatam que a liofilização mantém estável a viabilidade das culturas de levedura por longo período de armazenamento.

As curvas de sobrevivência de *Saccharomyces boulardii* liofilizada Floratil<sup>®</sup>, Merck estão apresentadas na Figura 19.

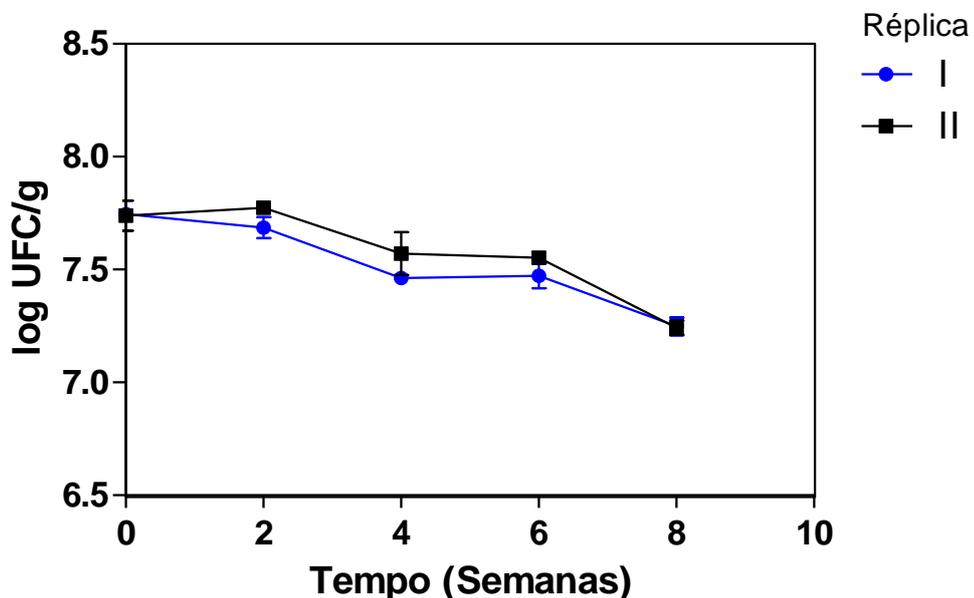


Figura 19 - Curva de sobrevivência de *Saccharomyces boulardii* liofilizado Floratil<sup>®</sup>, Merck.

#### 5.5.4 Comparação da viabilidade da levedura *Saccharomyces boulardii* em barra de cereais, em três formulações diferentes: granulado com lactose, encapsulado em alginato de cálcio e liofilizado Floratil<sup>®</sup>, Merck

A Tabela 8 apresenta a média da população viável de *Saccharomyces boulardii* em três formulações diferentes, granulado com lactose, encapsulado em alginato de cálcio e liofilizado Floratil<sup>®</sup>, Merck.

Tabela 8 - População viável de *Saccharomyces boulardii* (Média  $\pm$  DP, n=2) nas diferentes formulações de barra de cereais, durante o armazenamento (log UFC/g).

<b><i>Saccharomyces boulardii</i> (log UFC/g)</b>			
<b>Tempo (Semanas)</b>	<b>Granulado com lactose</b>	<b>Encapsulado em alginato de cálcio</b>	<b>Liofilizado Floratil<sup>®</sup>, Merck</b>
<b>0</b>	6,69 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	8,09 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	7,73 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
<b>2</b>	6,18 $\pm$ 0,08 <sup>ab</sup>	7,70 $\pm$ 0,11 <sup>ab</sup>	7,72 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>
<b>4</b>	5,81 $\pm$ 0,32 <sup>ab</sup>	6,80 $\pm$ 0,49 <sup>bc</sup>	7,51 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
<b>6</b>	5,50 $\pm$ 0,43 <sup>b</sup>	5,57 $\pm$ 0,60 <sup>de</sup>	7,51 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
<b>8</b>	5,32 $\pm$ 0,61 <sup>b</sup>	4,56 $\pm$ 0,44 <sup>e</sup>	7,24 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>

a,b,c,d,e – médias com pelo menos uma letra igual na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância (p<0,05).

Verifica-se por meio da análise da Tabela 8 que a formulação em que a levedura *S. boulardii* foi incorporada na barra de cereais na forma liofilizada Floratil<sup>®</sup>, Merck, apresentou os melhores resultados quando comparado com a formulação encapsulada e granulada. Ao final de 8 semanas de armazenamento, apresentava contagem de 7,24 log UFC/g e redução de 0,49 log UFC/g em relação ao tempo 0.

*S. boulardii* submetida à granulação com lactose apresentou no tempo 0 contagem de 6,69 log UFC/g e durante o armazenamento decréscimo de 1,37 ciclos logarítmicos.

A formulação em que a *S. boulardii* foi incorporada na barra de cereais na forma encapsulada em alginato de cálcio, apesar de apresentar contagem no tempo 0 de 8,09 log UFC/g, durante o armazenamento sofreu um decréscimo de 3,53 ciclos logarítmicos.

Ao final de 8 semanas de armazenamento a população de *S. boulardii* permaneceu na faixa de 7,00 log UFC/g apenas na forma liofilizada, indicando que a barra de cereais apresentou características adequadas para a sobrevivência do micro-organismo para esta forma de incorporação.

As curvas de sobrevivência de *Saccharomyces boulardii* em barra de cereais, em três diferentes formulações: granulado com lactose, encapsulado em alginato de cálcio e liofilizado Floratil<sup>®</sup>, Merck, estão apresentadas na Figura 20.

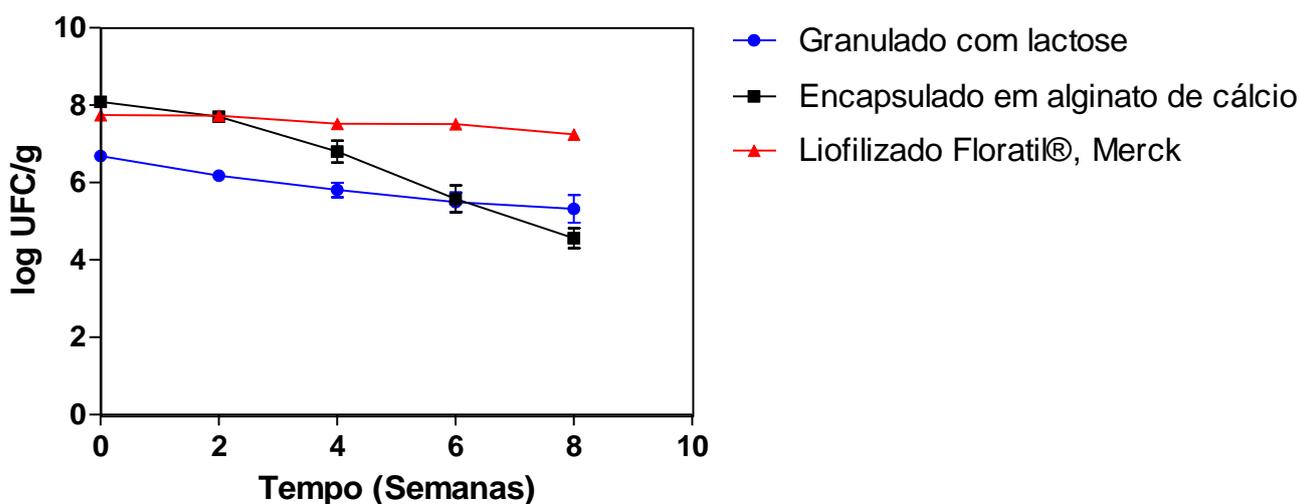


Figura 20 - Curva de sobrevivência de *Saccharomyces boulardii*, em três diferentes formulações: granulado com lactose, encapsulado em alginato de cálcio e liofilizado Floratil®, Merck.

### 5.5.5 Acompanhamento da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* LA-14 FloraFIT, liofilizado Danisco

Os resultados da população viável de *Lactobacillus acidophilus* LA-14 FloraFIT, liofilizado Danisco, durante o período de sete semanas de armazenamento, estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - População viável de *Lactobacillus acidophilus* LA-14 FloraFIT, liofilizado Danisco (Média  $\pm$  DP, n=2), em barra de cereais, durante o armazenamento (log UFC/g). Réplica I, II, III.

Tempo (Semanas)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (log UFC/g)			Média
	I	II	III	
0	9,02 $\pm$ 0,11	9,73 $\pm$ 0,02	9,74 $\pm$ 0,14	9,50 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>
1	*	9,36 $\pm$ 0,12	9,31 $\pm$ 0,01	9,33 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>
2	8,80 $\pm$ 0,35	8,91 $\pm$ 0,12	8,94 $\pm$ 0,17	8,89 $\pm$ 0,08 <sup>ab</sup>
4	8,15 $\pm$ 0,68	8,29 $\pm$ 0,09	8,08 $\pm$ 0,37	8,17 $\pm$ 0,04 <sup>bc</sup>
6	7,68 $\pm$ 0,04	6,38 $\pm$ 0,21	7,92 $\pm$ 0,02	7,33 $\pm$ 0,13 <sup>c</sup>
7	4,52 $\pm$ 0,03	5,12 $\pm$ 0,59	5,50 $\pm$ 0,41	5,05 $\pm$ 0,56 <sup>d</sup>

a,b,c,d – médias com pelo menos uma letra igual na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

\* dado não disponível.

Com relação ao *Lactobacillus acidophilus* LA-14 FloraFIT, liofilizado Danisco, verifica-se na Tabela 9, que a população permaneceu, em média, na faixa de 7,0 log UFC/g durante 6 semanas de armazenamento. Na sétima semana foram encontrados valores na faixa de 5,0 log UFC/g. De acordo com Macedo et al. (2008), o decréscimo na contagem bacteriana pode estar relacionado a vários fatores como acidificação do produto, nível de oxigênio no produto, permeação do oxigênio através da embalagem e presença de compostos antimicrobianos. Aklain e Erisir (2008), em trabalho no qual incorporaram *L. acidophilus* livres em sorvete, armazenado por 90 dias a -18°C, mostraram que houve um declínio de 2,0 log UFC/g durante o congelamento e 0,3 log UFC/g durante o armazenamento, atingindo 10<sup>5</sup> UFC/g.

Resultados semelhantes foram encontrados por Barreto et al. (2003), que avaliaram a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias totais em 177 amostras de 15 marcas de produtos probióticos comercializados no Brasil. Em 52% dos produtos contendo o probiótico *L. acidophilus*, as contagens estavam abaixo de 10<sup>5</sup> UFC/g.

Em estudo com musses de chocolate Borges et al. (2004), observaram um decréscimo de 3 log UFC/g da população de probióticos, após o vigésimo dia de armazenamento das musses adicionadas de *L. acidophilus* livres.

Ribeiro et al. (2009), verificaram que não houve uma redução significativa na população de *L. acidophilus* em queijo Minas frescal, sob refrigeração a 5°C durante 28 dias. Foi observado que a população inicial deve ser no mínimo, 10<sup>7</sup> UFC/g, de forma a manter a contagem do microrganismo probiótico durante a vida de prateleira do produto.

As curvas de sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* LA-14 FloraFIT, liofilizado Danisco, estão apresentadas na Figura 21.

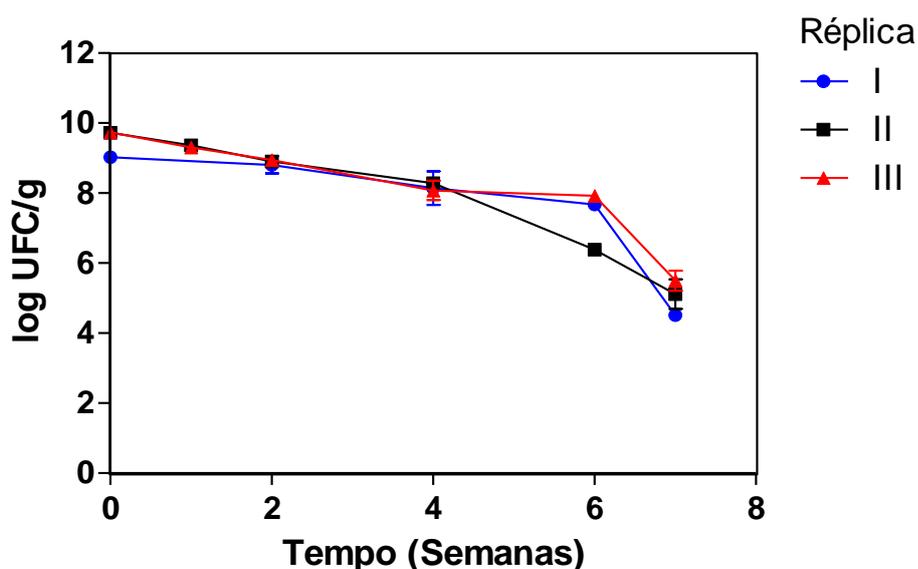


Figura 21 - Curva de sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* LA-14 FloraFIT, liofilizado Danisco.

### 5.5.6 Acompanhamento da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* LA-14 FloraFIT, liofilizado Danisco, encapsulados em alginato de cálcio

Os resultados da população de *Lactobacillus acidophilus* encapsulados em alginato de cálcio durante o tempo duas semanas estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - População de *Lactobacillus acidophilus* LA-14 FloraFIT, liofilizado Danisco, encapsulados em alginato de cálcio (Média  $\pm$  DP, n=2), em barra de cereais, durante o armazenamento (log UFC/g). Réplica I, II.

Tempo (Semanas)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (log UFC/g)		
	I	II	Média
0	7,73 $\pm$ 0,09	7,71 $\pm$ 0,70	7,72 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
2	<5,0	<5,0	<5,0 <sup>b</sup>

a,b – médias com pelo menos uma letra igual na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

Observa-se na Tabela 10 que a população de *Lactobacillus acidophilus* LA-14 FloraFIT, liofilizado Danisco, encapsulados em alginato de cálcio no tempo 0 apresentou valores na faixa de 7,0 log UFC/g. Entretanto, após 2 semanas de armazenamento houve uma redução na população para valores menores que 5,0

log UFC/g. Em trabalho semelhante com barra de cereais, Henriques, 2011, observou, após encapsulação por extrusão em alginato, concentração inicial de *Lactobacillus casei* 01 de  $10^8$  UFC/g. A contagem celular permaneceu quase inalterada durante os quatro primeiros dias. Entretanto, no 14º dia de armazenamento foi observada redução de 2,5 log UFC/g, permanecendo em torno de  $10^6$  UFC/g. O trabalho não analisou a partir do 14º dia de armazenamento. O mesmo autor fez uma comparação da viabilidade celular na temperatura de armazenamento de 4°C e 20°C, não observando diferença significativa ao final de 14 dias de armazenamento.

Já em trabalho de Sousa et al. (2010), foi observado que *Lactobacillus acidophilus* Ki encapsulados em alginato de cálcio, após 14 dias de armazenamento tanto em temperatura de 4°C quanto em temperatura de 21°C, as células não permaneceram viáveis.

Em estudo com musses de chocolate, Borges et al. (2004), observaram decréscimo de 2 log UFC/g na população de *L. acidophilus* microencapsulados em alginato após o vigésimo dia de armazenamento.

Godward (2000) observou que em queijo tipo cheddar, células livres probióticas de *L. acidophilus* sobreviveram melhor do que células encapsuladas, possivelmente devido ao acúmulo de metabólitos, como ácidos orgânicos dentro das cápsulas de alginato de cálcio levando à morte celular.

Apesar de alguns autores demonstrarem que a encapsulação em alginato de cálcio não aumenta a sobrevivência de *L. acidophilus*, outros trabalhos relatam o efeito benéfico da microencapsulação.

Boscarioli (2010) verificou que a sobrevivência de *L. acidophilus* tanto livre quanto encapsulado em alginato de cálcio permaneceu em torno de 7,5 log UFC/g em sorvete de creme armazenado por 210 dias a -18°C. Entretanto, o consumo desses alimentos não é diário, sendo consumido predominantemente no verão em muitos países (SAAD et al., 2011).

No caso de probióticos, foi já descrito que a diminuição da temperatura pode aumentar a viabilidade durante o armazenamento (SOUSA et al., 2012). Neste estudo, os autores observaram que encapsulação em microcápsulas de alginato de cálcio somente foi eficaz para a proteção das culturas de *Lactobacillus paracasei*

L26, *L. casei* 01, *L. acidophilus* Ki, e *Bifidobacterium animalis* BB-12 a temperatura de congelamento (-20°C e -80°C), independente da estirpe.

Os sistemas de micropartículas de alginato, entretanto, não podem ser descartados, uma vez que oferecem várias vantagens, como a de ser não tóxico, de fácil de manuseio, biodisponíveis, biocompatível, e de baixo custo (PARK & CHANG, 2000).

### 5.5.7 Comparação da viabilidade da levedura *Saccharomyces boulardii* liofilizado Floratil<sup>®</sup>, Merck e *Lactobacillus acidophilus* LA-14 FloraFIT, liofilizado Danisco, em barra de cereais

A Tabela 11 apresenta a média da população viável de *Saccharomyces boulardii* liofilizado Floratil<sup>®</sup>, Merck e *Lactobacillus acidophilus* LA-14 FloraFIT, liofilizado Danisco.

Tabela 11 - População viável de *Saccharomyces boulardii* liofilizado Floratil<sup>®</sup>, Merck e *Lactobacillus acidophilus* LA-14 FloraFIT, liofilizado Danisco (Média ± DP, n=2), em barra de cereais, durante o armazenamento (log UFC/g).

Tempo (Semanas)	<i>S. boulardii</i> (log UFC/g)	<i>L. acidophilus</i> (log UFC/g)
0	7,73±0,01 <sup>a</sup>	9,50±0,41 <sup>a</sup>
2	7,72±0,06 <sup>a</sup>	8,89±0,08 <sup>ab</sup>
4	7,51±0,05 <sup>b</sup>	8,17±0,04 <sup>bc</sup>
6	7,51±0,05 <sup>b</sup>	7,33±0,13 <sup>c</sup>
7	*	5,05±0,56 <sup>d</sup>
8	7,24±0,01 <sup>c</sup>	*

a,b,c,d – médias com pelo menos uma letra igual na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância (p<0,05).

\* dado não disponível.

A população de *Saccharomyces boulardii* liofilizado Floratil<sup>®</sup>, Merck apresentou melhores resultados de viabilidade quando comparada com a população de *L. acidophilus* LA-14 FloraFIT, liofilizado Danisco (Tabela 11), visto que permaneceu,

em média, na faixa de 7,0 log UFC/g, e declínio de 0,49 ciclos logarítmicos, durante as 8 semanas de armazenamento. A população de *L. acidophilus* permaneceu, em média, em torno de 7,0 log UFC/g durante 6 semanas de armazenamento, entretanto o decréscimo foi de 4,45 ciclos logarítmicos, atingindo o valor de 5,05 log UFC/g na sétima semana de armazenamento.

Muitos trabalhos demonstram que é pequena a sobrevivência de bactérias probióticas em produtos na forma de células livres (DE VOS et al., 2010).

Segundo a Instrução Normativa nº. 16, de 23 de agosto de 2005, em bebidas lácteas fermentadas 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 (BRASIL, 2005).

As curvas de sobrevivência das populações de *Saccharomyces boulardii* liofilizado Floratil<sup>®</sup>, Merck e *Lactobacillus acidophilus* LA-14 FloraFIT, liofilizado Danisco, estão apresentadas na Figura 22.

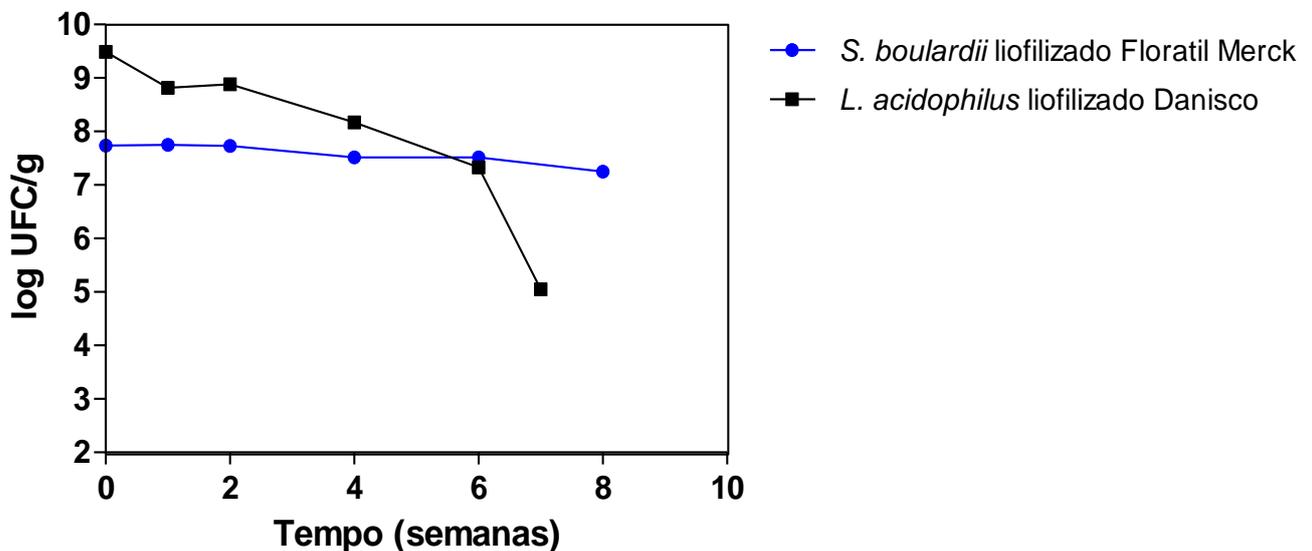


Figura 22. Curva de sobrevivência da população de *Saccharomyces boulardii* liofilizado Floratil<sup>®</sup>, Merck e *Lactobacillus acidophilus* LA-14 FloraFIT, liofilizado Danisco.

## 5.6 Avaliação sensorial

As médias das notas atribuídas pelos julgadores às formulações de barras de cereais quanto à aceitação sensorial encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12 - Média das notas atribuídas pelos julgadores para a aceitação sensorial das formulações de barras de cereais.

Formulação	Aparência	Textura	Sabor	Impressão Global
Comercial	7,52 <sup>a</sup>	8,03 <sup>a</sup>	7,38 <sup>a</sup>	7,27 <sup>a</sup>
Com <i>Saccharomyces boulardii</i>	7,80 <sup>a</sup>	7,72 <sup>a</sup>	7,72 <sup>a</sup>	7,66 <sup>a</sup>
Com <i>Lactobacillus acidophilus</i>	7,30 <sup>a</sup>	7,83 <sup>a</sup>	7,66 <sup>a</sup>	7,69 <sup>a</sup>
Sem Probiótico	7,80 <sup>a</sup>	7,63 <sup>a</sup>	8,05 <sup>a</sup>	7,91 <sup>a</sup>

a – médias com pelo menos uma letra igual na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

Ao analisar os dados da Tabela 12 observa-se que as quatro formulações de barra de cereais apresentaram, de um modo geral, boa aceitação sensorial de aparência, textura, sabor e impressão global.

Ao comparar as médias dos atributos sensoriais da barra de cereais comercial com os atributos sensoriais das três formulações desenvolvidas no presente trabalho, foi possível observar que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey, quanto ao atributo aparência, textura, sabor. Quanto à impressão global, também não foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Pode-se observar que as duas formulações desenvolvidas no presente trabalho adicionadas de probióticos apresentam um potencial de incorporação destes micro-organismos sem perda dos atributos sensoriais, visto que nenhum dos provadores detectou a presença dos componentes propriamente ditos, uma vez que não diferiu ( $p < 0,05$ ) da barra de sem probiótico em todos os quesitos sensoriais analisados.

Em trabalho envolvendo a incorporação de micro-organismos probióticos encapsulados Godward (2000), observou, em iogurte, que as cápsulas de alginato de cálcio eram visíveis e perceptíveis na boca quando ingeridos, fazendo com que o produto fosse desqualificado pelos provadores.

A Tabela 13 apresenta o índice de aceitabilidade para as quatro diferentes formulações testadas neste trabalho.

Tabela 13 - Índice de aceitabilidade para as diferentes formulações de barras de cereais.

Formulações	Índice de aceitabilidade das barras de cereais (%)			
	Aparência	Textura	Sabor	Impressão Global
Comercial	83,55	89,22	82,00	80,78
Com <i>Saccharomyces boulardii</i>	86,67	85,78	85,78	85,11
Com <i>Lactobacillus acidophilus</i>	81,11	87,00	85,11	85,44
Sem Probiótico	86,67	84,78	89,45	87,89

Segundo Teixeira et al. (1987) para que o produto seja considerado como aceito, em termos de suas propriedades sensoriais, é necessário que este obtenha um Índice de Aceitabilidade (IA) de no mínimo 70%. Com base nas notas para a aceitabilidade e cálculo do IA, pode-se verificar que todas as formulações apresentaram boa aceitabilidade, visto que as formulações avaliadas apresentaram IA superior a 80 % para todos os atributos avaliados, vide Tabela 13.

Ao desenvolver um novo produto, um dos pontos fundamentais é avaliar sua aceitabilidade, a fim de prever seu comportamento frente ao mercado consumidor (MOSCATTO et al., 2004). No entanto, pode-se inferir que a aceitabilidade para os atributos analisados das quatro formulações de barra de cereais representa valores consideráveis, visto que as três formulações desenvolvidas no presente trabalho foram feitas de modo artesanal, sendo duas delas, acrescentadas de micro-organismos probióticos.

A impressão global é entendida pelo conjunto relativo à primeira impressão causada pelo produto como um todo, sem representar a média das notas das outras características avaliadas (GOMES & PENNA, 2009). Os valores obtidos para este atributo variaram de 7,27 a 7,91.

A utilização do gráfico radar para demonstração do perfil sensorial nos permite uma melhor visualização das amostras avaliadas, Figura 23.

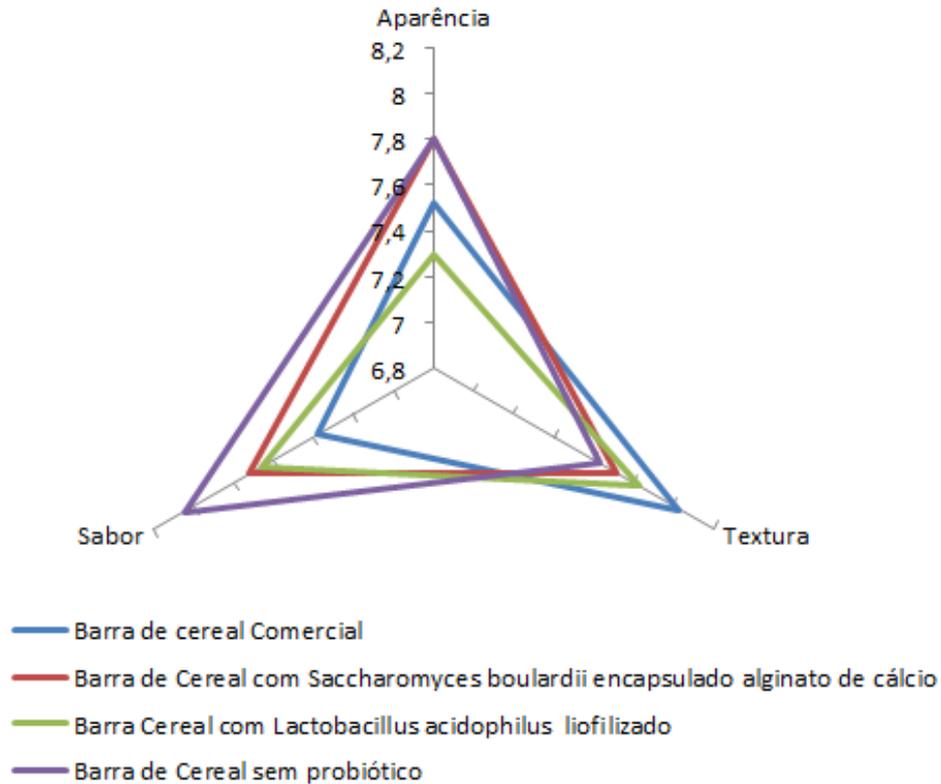


Figura 23. Média das notas de aparência, textura e sabor, atribuídas pelos julgadores referentes às quatro diferentes formulações de barras de cereais.

Através das Figuras 24, 25, 26, 27, pode-se observar a intenção de consumo dos provadores em relação as barras de cereais analisadas.

Observa-se por meio da Figura 24, a intenção de consumo, referente à barra de cereal comercial, atribuída pelos provadores se esta estivesse disponível no mercado.

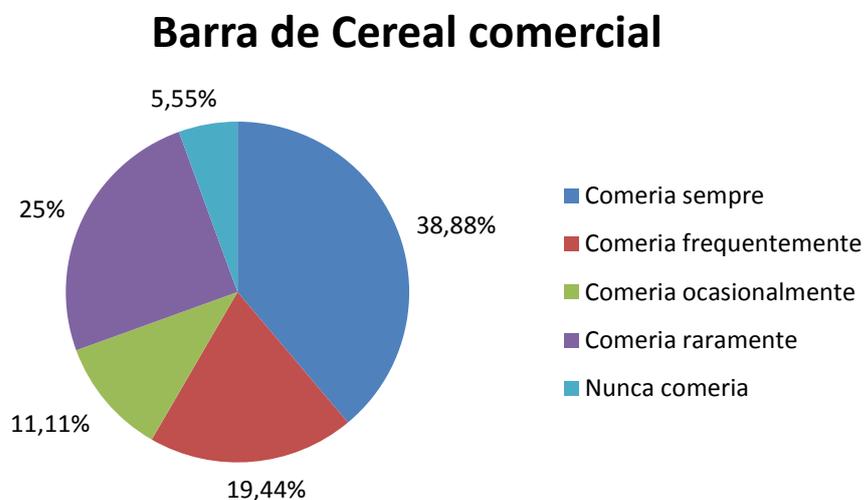


Figura 24. Intenção de consumo, referente à barra de cereal comercial, atribuída pelos julgadores.

Observa-se na Figura 24 que 38,88% dos provadores comeriam sempre a barra de cereal comercial. 19,44% comeriam frequentemente, 11,11% comeriam ocasionalmente, 25% comeriam raramente e 5,55% dos provadores inferiram que nunca comeriam.

Na Figura 25, observa-se a intenção de consumo, referente à barra de cereal com *Saccharomyces boulardii* encapsulada em alginato de cálcio, atribuída pelos provadores se esta estivesse disponível no mercado.

### Barra de Cereal com *Saccharomyces boulardii* encapsulada em alginato de cálcio

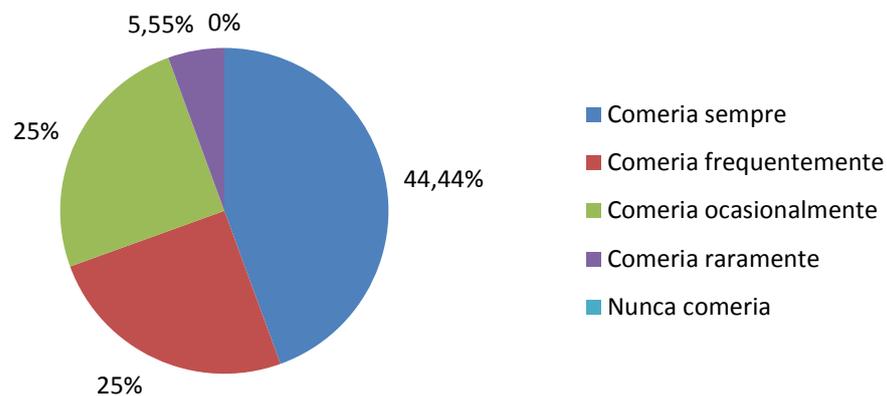


Figura 25. Intenção de consumo, referente à barra de cereal com *Saccharomyces boulardii* encapsulado em alginato de cálcio, atribuída pelos julgadores.

44,44% dos julgadores comeriam sempre a barra de cereais com o probiótico *Saccharomyces boulardii* encapsulado com alginato de cálcio, 25% comeriam frequentemente, 25% comeriam ocasionalmente e 5,55% raramente comeriam.

Na Figura 26, observa-se a intenção de consumo, referente à barra de cereal com *Lactobacillus acidophilus* liofilizado, atribuída pelos provadores se esta estivesse disponível no mercado.

### Barra Cereal com *Lactobacillus acidophilus* liofilizado

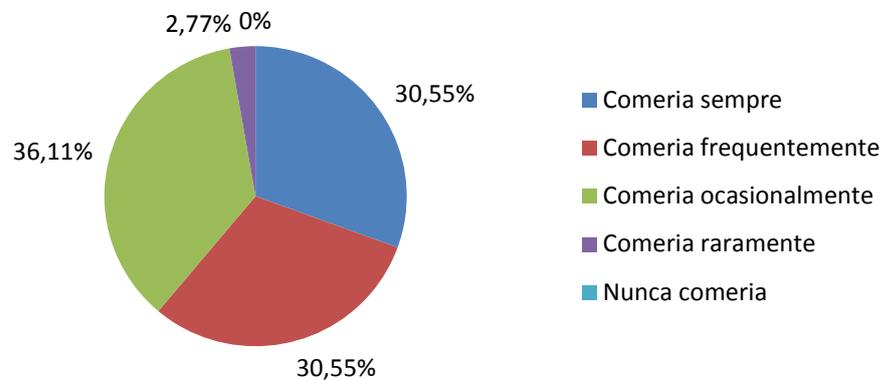


Figura 26. Intenção de consumo, referente à barra de cereal com *Lactobacillus acidophilus* liofilizado, atribuída pelos julgadores.

Observa-se que 30,55% dos julgadores alegaram que comeriam sempre a formulação contendo *Lactobacillus acidophilus*, 30,55% comeriam frequentemente, 36,11% comeriam ocasionalmente e 2,77% raramente comeriam se esta estivesse disponível no mercado.

Observa-se na Figura 27 a intenção de consumo, referente à barra de cereal sem probiótico, atribuída pelos julgadores se esta estivesse disponível no mercado.

### Barra de Cereal sem probiótico

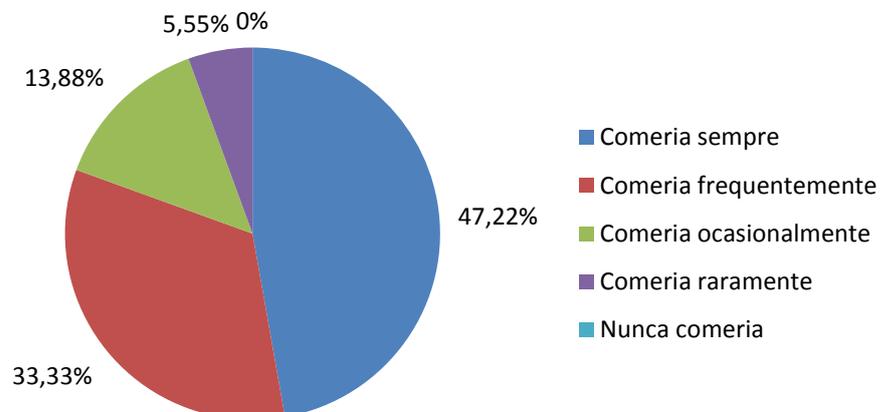


Figura 27. Intenção de consumo, referente à barra de cereal sem probiótico, atribuída pelos julgadores.

47,22% dos julgadores alegaram que comeriam sempre, 33,33% comeriam frequentemente, 13,88% comeriam ocasionalmente e 5,55% raramente comeriam se esta formulação estivesse disponível no mercado.

Com base nos resultados obtidos, podemos considerar as barras de cereais produzidas no presente trabalho como satisfatórias sob o ponto de vista da aceitabilidade pelo consumidor. Estas barras de cereais são, então, uma nova forma de veicular micro-organismos com funções probióticas.

Considerando a facilidade de transporte, a conservação do produto à temperatura ambiente, o baixo custo e a grande aceitação das barrinhas de cereais pela população, esta se mostra como uma fonte inovadora de disponibilização de alimentos funcionais com propriedade probiótica para a população. Assim, consiste em potencial diversificação do nicho das barras de cereais, às quais seriam agregados novos valores condizentes à manutenção e equilíbrio de funções orgânicas, pois além do apelo nutricional, insere-se também a vertente terapêutica.

Fazem-se necessários maiores estudos para verificação de novas formas de incorporação de micro-organismos probióticos a este tipo de produto, bem como um estudo de viabilidade econômica para produção dos mesmos.

## 6 CONCLUSÃO

Foi desenvolvida no presente estudo uma formulação de barra de cereais com a incorporação de micro-organismos probióticos. A levedura *S. boulardii* na forma liofilizada, granulada e encapsulada e a bactéria *L. acidophilus* na forma liofilizada e encapsulada.

Foi possível identificar que a melhor forma de incorporação e maior sobrevivência da levedura *S. boulardii* e da bactéria *L. acidophilus* se deu na forma liofilizada.

Durante o tempo de armazenamento de oito semanas, a levedura *S. boulardii* apresentou redução média de 0,49 log UFC/g na forma liofilizada, 1,37 log UFC/g na forma granulada com lactose e 3,53 log UFC/g na forma encapsulada em alginato de cálcio. A bactéria *L. acidophilus*, apresentou redução de 4,45 log UFC/g após sete semanas de armazenamento na forma liofilizada. Já a forma encapsulada em alginato de cálcio apresentou contagem inicial na faixa de 7 log UFC/g. Entretanto, após duas semanas de armazenamento reduziu para valores inferiores a 5 log UFC/g.

A utilização da levedura *Saccharomyces boulardii* e da bactéria *Lactobacillus acidophilus* por meio das diferentes formas de incorporação nas barras de cereais não interferiram na qualidade sensorial e estrutural do produto. As barras de cereais contendo micro-organismos probióticos não diferiram da barra de cereais sem probiótico.

Os resultados encontrados permitem inferir que é possível incorporar micro-organismos probióticos em novas matrizes alimentares. Desta forma, este trabalho abre caminho para novas pesquisas dentro do contexto de alimentos funcionais com atividade probiótica.

## 7 REFERÊNCIAS

AGHEYISI, R. **The probiotics market: Ingredients, supplements, foods.** Texto disponibilizado em junho 2011. In: BCC Research Market Forecasting. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/report/FOD035B.html>>. Acesso em 22 novembro 2012.

AKALIN, A.S.; ERIS, D. Effects of inulin and oligofructose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low-Fat probiotic Ice cream. **Journal of food science**, v. 73, n. 4, p. 184 – 188, 2008.

ALBERTINI, B., VITALI, B., PASSERINI, N., CRUCIANI, F., SABATINO, M.D., RODRIGUEZ, L., BRIGIDI, P. Development of microparticulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, p. 359–366, 2010.

ALVIM, L.B. **Identificação molecular e seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico isoladas de diferentes mucosas de suíno.** 2011. 66f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

ARAYA, H. L.; LUTZ, M. R. Alimentos Funcionales y saludables. **Revista chilena de nutrición.** v. 30, n. 1, p. 8-14, 2003.

ARES, G.; GIMÉNEZ, A. & GÁMBARO, A. Consumer perceived healthiness and willingness to try functional milk desserts: influence of ingredient name and health claim. **Food Quality and Preference.** v. 20, p. 50-56, 2009.

BALCÁZAR JL, VENDRELL D, De BLAS I, RUIZ-ZARZUELA I, GIRONÉS O, MÚZQUIZ JL: In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. **Veterinary Microbiology.** v. 122, p 373–380, 2007.

BARBOSA, C.M.E. Barras de Cereais: lucre com esse Mercado que cresce 20% ao ano. **Revista da Padaria Moderna**, São Paulo, ano 6, v. 68, n. 8, p. 16-18, agosto. 2003. Disponível em: <<http://www.padariamoderna.com.br/sites/arquivos/downloads/padaria68.pdf>>. Acesso em: 10 agosto 2012.

BARRETO, G.P.M.; SILVA, N.; SILVA, E.N.; BOTELHO, L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 1, p. 119-126, 2003.

BEDÊ, P.M. **Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para aplicações biomédicas.** 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) – Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2010.

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

BORGES, J.Q., FERREIRA, S.R.S.S., COSTA, G.W. Cinética de sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulados em matriz de alginato de cálcio e veiculados em musse de chocolate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19, 2004, Recife, *Resumos*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2004, p. 66.

BOSCARIOLI, M.P.M. **Influencia de prebióticos na encapsulação de bactérias probióticas adicionadas em sorvete**. 2010. 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Programa de Pós-graduação Engenharia, Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 2010.

BOUSTANI, P.; MITCHELL, V.W. Cereal bars: A perceptual, chemical and sensory analysis. **British Food Journal**, v. 92, n. 5, p. 17-22, 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência nacional de vigilância sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em julho, 2008. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em:

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº. 16, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. Brasília, 1999a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº. 17, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. Brasília, 1999b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº. 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Brasília, 1999c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº. 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. Brasília, 1999d.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº. 2, de 7 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.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Legislação. SISLEGIS: Sistema de consulta à legislação. Instrução Normativa n.º. 16, de 23 de agosto de 2005. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea.

BUCK, B.L.; ALTERMANN, E.; SVINGERUD T.; KLAENHAMMER, T.R. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Applied Environmental Microbiology**. v. 71, p. 8344–8351, 2005.

BUDDINGTON, R. Using probiotics and prebiotics to manage the gastrointestinal tract ecosystem. In: CHARALAMPOPOULOS, D.; RASTALL, R.A. **Prebiotics and probiotics science and technology**. New York: Springer. v.1, p.1-32, 2009.

BUENO, R.O.G. **Características de qualidade de biscoito e barra de cereais ricos em fibra alimentar a partir de farinha de semente de nêspera**. 2005. 103 f. Dissertação (Mestrado em tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

BUTS, J.P. Twenty-five years of research on *Saccharomyces boulardii* trophic effects: updates and perspectives. **Dig Dis Sci**. v. 54, p. 15-8, 2009.

CASTAGLIUOLO, I; RIEGLER M.F; VALENICK, L; LAMONT, J.T; POTHOUKAKIS, C. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. **Infection and Immunity**. v. 67, p. 302–307, 1999.

CANANI, R.B.; CUCCHIARA, S.; CUOMO, R.; PACE, F.; PAPALE, F. *Saccharomyces boulardii*: a summary of the evidence for gastroenterology clinical practice in adults and children. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 15, p. 809-822, 2011.

CARAMIA G: Probiotics: from Metchnikoff to the current preventive and therapeutic possibilities. **Pediatr Med Chir**, v.26, p. 19–33, 2004.

CARPENTER, J. F.; IZUTSU, K.; RANDOLPH, T. W. Freezing- and drying-induced perturbations of protein structure and mechanisms of protein protection by stabilizing additives. In: REY, L. **Freezing-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products**, 1999.

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

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

COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. “Selection of probiotic strains for human applications”. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 478-490, 1998.

COSTA, N.M.B.; ROSA, C.O.B. **Alimentos Funcionais componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. Editora Rubio, 2010.

COSTA, C.P.; FERREIRA, M.C. Preservação de microrganismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, v. 22, n. 3, p. 263-268, 1991.

COSTELL, E.; DURAN, L. El analise sensorial en el controle de qualidade de los alimentos. **Revista Agroquímica y Tecnología de alimentos**. v. 21, n. 1, p. 1-10, 1981.

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

CRUZ, C.H.G.; FOGGETTI, U.; SILVA, A.N. Alginato Bacteriano: Aspectos Tecnológicos, Características e Produção. **Química Nova**. v. 31, n. 7, p. 1800-1806, 2008.

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

DEGÁSPARI, C.H.; BLINDER, E.W.; MOTTIN, F. Perfil nutricional do consumidor de barras de cereais. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.9, n.1, Jan/Jun. 2008.

DE VOS, P., FAAS, M.M., SPASOJEVIC, M., SIKKEMA, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**. V. 20, n. 4, p. 292–302, 2010.

DOLEYRES, Y.; LACROIX, C. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 973-988, 2005.

DUONG, T.; BARRANGOU, R.; RUSSELL, W.M.; KLAENHAMMER, T.R.; Characterization of the tre locus and analysis of trehalose cryoprotection in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 72, n. 2. p. 1218–1225, 2006.

ERKKILÄ, S. et al. Flavor profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures. **Meat Science**, v. 58, p. 111-116, 2001.

EUROMONITOR. Functional foods: a world survey. **Euromonitor international**, London. Functional Times, Food Business, p. 6, 2009.

FARNWORTH, E.R.; MAINVILLE, I.; DESJARDINS, M.P.; GARDNER, N.; FLISS, I.; CHAMPAGNE, A.C. Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yoghurt formulation. **International Journal Food Microbiology**. v. 116, n. 1, p. 174–81, 2007.

FÁVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. Encapsulação de culturas probióticas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos (SBCTA)**, v. 37, p. 88-94, 2003.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos. Princípios e prática**. 2º ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2006.

FENNEMA, O.R., DAMODARAN, S., PARKIN, K.L. **Química de Alimentos de Fennema**. 4º ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2010.

FERREIRA, L.G. **Barras de cereais com propriedades funcionais direcionadas a mulheres no período do climatério**. 2004. 99 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em alimentos) – Programa de Pós-graduação em Engenharia de alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

FIETTO, J.L.; ARAÚJO, R.S.; VALADÃO, F.N.; FIETTO, L.G.; BRANDÃO, R.L.; NEVES, M.J.; GOMES, F.C.; NICOLI, J.R.; CASTRO, I.M. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 50, p. 615-621, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: Report of a joint Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization Expert Consultation**. Texto disponibilizado em 1 out. 2001. Disponível em: <[ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio\\_report\\_en.pdf](ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf)>. Acessado em: 12 agosto 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Production and utilization of products from commercial seaweeds**. Texto disponibilizado em 1987. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/X5822E/X5822E00.htm>>. Acesso em: 15 agosto 2012.

FREITAS, D.G.C.; MORETTI, R.H. Barra de cereais de elevado teor proteico e vitamínico: estabilidade enzimática e das vitaminas C e E durante armazenamento. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 56, p. 269-274, 2006.

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

FULLER, R. **Probiotics - The Scientific Basis**. 1 ed. Reino Unido: Editora Chapman & Hall, 1992.

GACESA, P. Alginates. **Carbohydrate Polymers**, v. 8, n. 3, p. 161-182, 1988.

GIBSON, G.R.; FULLER, R. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 391S-394, 2000.

GODWARD, G.N. **Studies on enhancing the viability and survival of probiotic bacteria in dairy foods through strain selection and microencapsulation**. 2000. 271 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - University of Western Sydney, Hawkesbury, 2000.

GOMES, A.M.P; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* ssp. And *Lactobacillus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotic. **Trends and Food Science & Technology**, v. 10, p. 139-157, 1999.

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

GRAFF, S.; HUSSAIN, S.; CHAUMEIL, J.C.; CHARRUEAU, C. Increased Intestinal Delivery of Viable *Saccharomyces boulardii* by Encapsulation in Microspheres. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 6, p. 1290-1296, 2008.

GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; NAZZARO, F.; CRUZ, A.G.; FARIA, J. A.F. Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, v. 9, n.3, 2010.

GUTKOSKI, L.C.; BONAMIGO, J.M.A.; TEIXEIRA, D.M.F.; PEDÓ, I. Desenvolvimento de barras de cereais à base de aveia com alto teor de fibra alimentar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 27, n. 2, p. 355-363, 2007.

HAMMES, W.P. and VOGEL, R.F. The Genus *Lactobacillus* in The Lactic Acid Bacteria. In: WOOD, B.J.B., HOLZAPFEL, W.H. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Vol. 2. London: Blackie Academic, 1995. p. 19-54.

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

HENRIQUES, S.M.S. **Incorporation of Probiotics in Cereal Bars: Technological viability and stability**. 2011. 50 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa, Porto, 2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Adolfo Lutz. 4. ed. São Paulo: IAL. v. 1, 2005.

ISOLAURI, E.; SALMINEM, S.; OUWEHAND, A.C. Probiotics. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**. v. 18, n. 2, p. 299-313, 2004.

JANKOVIC, I., SYBESMA, W., PHOTHIRATH, P., ANANTA, E., MERCENIER, A. Application of probiotics in food products – challenges and new approaches. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 21, n. 2, p. 175–181, 2010.

JELEN, P.; LUTZ, S. Functional milk and dairy products In: MAZZA, G. **Functional foods: biochemical and processing aspects**. Lancaster, p.357-381, 1998.

JUGEND, D. **Desenvolvimento de produtos em pequenas e médias empresas de base tecnológica: práticas de gestão no setor de automação de controle de processos**. 2006. 151 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção). Programa de Pós-graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

KAUR I.P.; KUHAD, A.; GARG, A.; CHOPRA, K. Probiotics: Delineation of Prophylactic and Therapeutic Benefits. **Journal of Medicinal Food**. v. 12, p. 219–235, 2009.

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 12, n. 1-3, p. 39–85, 1993.

KLEIN, J.; STOCK, J.; VORLOP, K.D. Pore size and properties of spherical Calcium alginate biocatalysts. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 18, p 86-91, 1983.

KOLLARITSCH H, KEMSNER P, WIEDERMANN G, SCHEINER O. Prevention of traveler's diarrhea: Comparison of different non-antibiotic preparations. **Travel Medicine International**. p. 9–17, 1989.

KRASAEKOOPT, W., BHANDARI, B., DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt: a review. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 3–13, 2003.

LAJOLO, F.M. Alimentos Funcionais: uma visão geral. In: DE ANGELIS, R.C. **Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia de nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas**. São Paulo: Atheneu, 2001.

LARSEN, B.; SALEM, D. M. S. A.; SALLAM, M. A. E.; MISHRIKEY, M. M.; BELTAGY, A. I. Characterization of the alginates from algae harvested at the Egyptian Red Sea Cost. **Carbohydrate Research**. v. 338, n. 22, p. 2325-2336, 2003.

LEBEER S.; VANDERLEYDEN J.; DE KEERSMAECKER S. C. J. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 171 - 184, 2010.

LEE, Y.K.; SALMINEN. S. **Handbook of probiotics**. 2<sup>o</sup> ed. Hoboken: John Wiley & Sons. p. 584, 2009.

LEY, R.E.; PETERSON, D.A.; GORDON, J.I.; Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**. v. 124, n. 4, p. 837–848, 2006.

LILLY DM, STILLWELL RH: Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**. v. 47, p.747–748, 1965.

LIMA, A. M. F. **Estudo de propriedades físico-químicas de alginato de sódio, pectina e blendas em solução e no estado sólido com aplicação em sistema de**

**liberação de fármacos.** 2006. 182 f. Dissertação (Doutorado em Química). Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

MACEDO, L.N.; LUCHESE, R.H.; GUERRA, A.F.; BARBOSA, C.G. Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** v. 28, n. 4, p. 935-924, 2008.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução a polímeros.** 2º Ed. São Paulo: Edgard Blucher, p.191, 2001.

MARTINS, F. S.; BARBOSA, F.H.F.; PENNA, F.J.; ROSA, C.A.; NARDI, R.M.D.; NEVES, M.J.; NICOLI, J.R. Estudo do potencial probiótico de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes in vitro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra.** v. 5, n.2, 2005.

MARTINS, F. S. **Efeito de dois probióticos, *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* linhagem UFMG 905, na resposta inflamatória induzida por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium.** 2008. 222 f. Dissertação (Doutorado em Ciências da Saúde) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

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

MÄTTÖ, J.; FONDÉN, R.; TOLVANEN, T.; VON WRIGHT, A.; VILPPONEN-SALMELA; SATOKARI, R.; SAARELA, M. Intestinal survival and persistence of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains administered in triple-strain yoghurt. **International Dairy Journal.** v. 16, p. 1174-1180, 2006.

MATSUURA, F.C.A.U. **Estudo do albedo de maracujá e de seu aproveitamento em barra de cereais.** 2005. 157 f. Dissertação (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

MCAULIFFE, O.; CANO, R.J.; KLAENHAMMER, T.R. Genetic analysis of two bile salt hydrolase activities in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Applied Environmental Microbiology.** v. 71, n. 8, p. 4925–4929, 2005.

MCFARLAND, L.V.; Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. **World Journal Gastroenterology.** n. 16, n. 18, p. 2202-2222, 2010.

MCFARLAND, L.V.; BERNASCONI, P. *Saccharomyces boulardii*: A review of an innovative biotherapeutic agent. **Microbial Ecology Health and Disease.** v. 6, p. 157-171, 1993.

MENEZES, A.C.S. **Desenvolvimento de bebida láctea fermentada à base de soro de leite e polpa de cajá (*Spondias mombin* L.) com potencial atividade probiótica**. 2011. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.

MERCK, 2012. Disponível em: <<http://www.merck.com.br/pt/index.html>>. Acesso em: 10 dezembro 2012.

MIGOWSKI, E. & PUGLIESE, B. S. Gastreenterite aguda: por que dose maior de *Saccharomyces boulardii* na fase aguda? **Revista Brasileira Clínica Médica**. p. 267-271, 2009.

MORGAN, C.A.; HERMAN, N.; WHITE, P.A.; VESEY, G. Preservation of microorganisms by drying: A review. **Journal of Microbiological Methods**. v. 66l, n. 2. p. 183-193, 2006.

MORTAZAVIAN, A., RAZAVI, S.H., EHSANI, M.R., SOHRABVANDI, S. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 1, 2007.

MOSCATTO, J.A.; PRUDÊNCIO-FERREIRA, S.H.; HAULY, M.C.O. Farinha de yacon e inulina como ingredientes na formulação de bolo de chocolate. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 24, n.4, p. 634-640, 2004.

NICOLI, J.R. E VIEIRA, L.Q. Probióticos, prebióticos e simbióticos: moduladores do ecossistema digestivo. **Ciência Hoje**, v. 28, p. 34-38, 2000.

NINESS, K.R. Inulin and oligofructose: what are they?. **Journal of nutrition**, v. 129, n. 7, p. 1402-1406, 1999.

O`CARROL, P. Booting cereal bars. **World of Ingredients**, p. 36-38, mar/abr. 1999.

PAIVA, A. P. **Estudos tecnológico, químico, físico-químico e sensorial de barras alimentícias elaboradas com subprodutos e resíduos agroindustriais**. 2008. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

PALAZZOLO, G. Cereal bars: they're not just for breakfast anymore. **Cereal Foods World**, v. 48, n. 2, p. 70-72, Mar-Apr, 2003.

PARK, J.K.; CHANG, H.N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology Advances**. v. 18, p. 303–319, 2000.

PARVEZ, K.A.; MALIK, S.; KANG S.AH; KIM, H.-Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**. v. 100, n. 6, p.1171-1185, 2006.

PIMENTEL, B. M. V.; FRANCKI, M.; GOLLÜCKE, B. P. **Alimentos funcionais: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos**. 1º ed. São Paulo: Editora Varela, 2005.

PUUPPONEN-PIMIA, R.; AURA, A.M.; OKSMAN-CALDENTY, K.M.; MYLLARINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends in Food Science and Technology**. v. 13, p. 3-11, 2002.

RENUKA, B.; KULKARNI, P.; PRAPULLA, S.G. Fucoidan fortification of selected fruit juice beverages: effect on the quality characteristics. **LWT – Food Science and Technology**. v. 42, n. 5, p. 1031-1033, 2008.

RESEARCH AND MARKETS. **Functional foods market assessment 2008**. Disponível em: <[http://www.researchandmarkets.com/reports/589248/functional\\_foods\\_market\\_assessment\\_2008](http://www.researchandmarkets.com/reports/589248/functional_foods_market_assessment_2008)>. Acesso em 21 outubro 2012.

RIBEIRO, E.P.; SIMÕES, L.G.; JURKIEWICZ, C.H. Desenvolvimento de queijo minas frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzido a partir de retentados de ultrafiltração. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 29, p. 19-23, janeiro - março, 2009.

ROBERFROID, M.B. Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. **Journal of nutrition**. v. 129, n.7, p. 1398-1401, 1999.

ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digest and Liver disease**. v. 34, n. 2, p. 105-110, 2002.

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

ROSS, R.P.; DESMOND, C.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. **Journal of Applied Microbiology**. v. 98, p. 1410-1417, 2005.

SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. **Probióticos e prebióticos em alimentos fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1º ed. São Paulo: Editora Varela, 2011.

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

SAINT-MARC T, BLEHAUT H, MUSIAL C, TOURAINE J. AIDS related diarrhea: a double-blind trial of *Saccharomyces boulardii*. **Sem Hôsp Paris**. v. 71, p. 735–741, 1995.

SENHORAS, E.M.; TAKEUCHI, K.P.; TAKEUCHI, K.P. Gestão da Inovação no Desenvolvimento de Novos Produtos. In: IV SIMPÓSIO DE EXCELÊNCIA EM GESTÃO E TECNOLOGIA, 2007, Resende - RJ. p. 2-10.

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

SILVA, L.F.; KAMIYA, N.F.; OLIVEIRA, M.S.; ALTERTHUM, F. Comparison of preservation methods applied to yeasts used for ethanol production in Brazil. **Revista de Microbiologia**. v. 23, n. 3, p.177-182, 1992.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4º ed. Editora Varela, 2010.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance – A review. **Appetite**, v. 51, p.456-467, 2008.

SOUSA, S.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.M.; SILVA, J.P.; COSTA, P., AMARAL, M.H.; ROCHA-SANTOS, T.A.P.; RODRIGUES, D.; FREITAS, AC. Effect of storage conditions on stability of free and encapsulated – in plain or cysteine supplemented alginate, *Lactobacillus acidophilus* Ki. In: **XVIII International Conference on Bioencapsulation**, p-034, 2010, Porto, Portugal.

SOUSA, S.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.M.; MALCATA, F.X.; SILVA, J.P.; SOUSA, J.M.; COSTA, P.; AMARAL, M.H.; RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T.A.P.; FREITAS, A.C. Encapsulation of probiotic strains in plain or cysteine-supplemented alginate improves viability at storage below freezing temperatures. **Engineering in Life Sciences**. v.12, n, 4, p. 457–465, 2012.

STANTON, C.; DESMOND, C.; COAKLEY, M.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD G.F.; ROSS, R.P. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. In: FARNWORTH, E.R. **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p. 27-58.

STONE, H. S.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**. 4º ed. San Diego: Editora Elsevier, 2012.

STRINGHETA, P. C.; VILELA, M. A. P.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J. **Alimentos “Funcionais” conceitos, contextualização e regulamentação**. 1º ed. Juiz de Fora: Editora Templo, 2007.

SURAWICZ, C.M; MACFARLAND, L.V; GREENBERG, R.N; RUBIN, M; FEKETY, R; MULLIGAN, M.E; GARCIA, R.J; BRANDMAKER, S; BORJAL, D; ELMER, G.W. The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: use of high-dose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii*. **Clinical Infections Diseases**. v 31, p. 1012-17, 2000.

TANAKA, H.; MASATOSE, M.; VELEKY, I.A. Diffusion characteristic of substrates in Ca-alginate beads. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 26, p. 53-58, 1984.

TEIXEIRA, E.; MEINERT, E.; BARBETA, P.A. Análise sensorial dos alimentos. UFSC. p. 182, 1987.

TYÖPPÖNEN, S.; PETÄJÄ, E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 3, p. 233-244, 2003.

VERBEKE, W. "Consumer acceptance of functional foods: socio-demographic cognitive and attitudinal determinants. **Food Quality and Preference**. v.16, n.1, p.45-57, 2005.

VYAS, U.; RANGANATHAN, N. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: gut and beyond. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2012, p 1-16, 2012.

## Anexo A



UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO ESPÍRITO SANTO

### Avaliação Sensorial de Barra de Cereais

Data: \_\_\_\_\_

Obs.: Caso o participante apresente alergia a algum ingrediente presente na barra de cereal, o mesmo será incapacitado de participar dos testes.

Você está recebendo quatro amostras de Barra de Cereais. Avalie cada uma seguindo a escala abaixo:

- ( 9 ) gostei extremamente
- ( 8 ) gostei moderadamente
- ( 7 ) gostei regularmente
- ( 6 ) gostei ligeiramente
- ( 5 ) não gostei, nem desgostei
- ( 4 ) desgostei ligeiramente
- ( 3 ) desgostei regularmente
- ( 2 ) desgostei moderadamente
- ( 1 ) desgostei extremamente

1-Você está recebendo quatro amostras de Barra de Cereais. Avalie a APARÊNCIA da amostra e indique conforme a escala acima o quanto você gostou ou desgostou da APARÊNCIA da amostra.

AMOSTRA				
VALOR				

2-Você está recebendo quatro amostras de Barra de Cereais. Avalie a TEXTURA da amostra e indique conforme a escala acima o quanto você gostou ou desgostou da TEXTURA da amostra.

AMOSTRA				
VALOR				

3-Você está recebendo quatro amostras de Barra de Cereais. Avalie a SABOR da amostra e indique conforme a escala acima o quanto você gostou ou desgostou do SABOR da amostra.

AMOSTRA				
VALOR				

4-Você está recebendo quatro amostras de Barra de Cereais. Avalie a IMPRESSÃO GLOBAL da amostra e indique conforme a escala acima o quanto você gostou ou desgostou da IMPRESSÃO GLOBAL da amostra.

AMOSTRA				
VALOR				

Com base em sua opinião sobre de Barra de Cereais. Avalie cada amostra segundo a sua intenção de consumo, utilizando a escala abaixo:

- (5) Comerá sempre
- (4) Comerá frequentemente
- (3) Comerá ocasionalmente
- (2) Comerá raramente
- (1) Nunca comerá

AMOSTRA				
VALOR				