

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO

DETERMINAÇÃO DO EFEITO BIFIDOGÊNICO DA FARINHA DE
CASCA DE JABUTICABA EM LEITE FERMENTADO PROBIÓTICO

Izabela Mendes Zin

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**DETERMINAÇÃO DO EFEITO BIFIDOGÊNICO DA FARINHA
DE CASCA DE JABUTICABA EM LEITE FERMENTADO
PROBIÓTICO**

IZABELA MENDES ZIN

Sob a Orientação do Professor

Dr. Adriano Gomes da Cruz

e Co-orientação da Pesquisadora

Dra. Ana Carolina Sampaio Doria Chaves

Dissertação submetida como requisito para a obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos** no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ
Abril, 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Z77d Zin, Izabela Mendes, 1988-
DETERMINAÇÃO DO EFEITO BIFIDOGÊNICO DA FARINHA DE
CASCA DE JABUTICABA EM LEITE FERMENTADO PROBIÓTICO e /
Izabela Mendes Zin. - 2018.
62 f.

Orientador: Adriano Gomes da Cruz.
Coorientador: Ana Carolina Sampaio Doria Chaves.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Ciência e Tecnologia de
Alimentos, 2018.

1. jabuticaba. 2. Bifidobacterium animalis subsp.
lactis. 3. probiótico. I. Gomes da Cruz, Adriano, 1978
, orient. II. Sampaio Doria Chaves, Ana Carolina,
1968-, coorient. III Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro. Ciência e Tecnologia de Alimentos.
IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

IZABELA MENDES ZIN

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Tecnologia de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 18/04/2018

Adriano Gomes da Cruz, D. Sc., Instituto Federal Fluminense
(Orientador)

Karina Maria Olbrich dos Santos, D. Sc., Embrapa

Érick Almeida Esmerino, D. Sc., Universidade Federal Fluminense

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo apoio emocional e financeiro, sem eles nada disso seria possível. Aos meus irmãos, familiares e meu namorado Bruno Pontes pelo suporte e carinho.

Aos meus grandes amigos Alyne Alves, Luis Otávio Moreira e Raphaela Alessandra por compartilhar os melhores e piores momentos. Aos amigos de Florianópolis, que mesmo distante sempre se fizeram presente.

Ao meu orientador e minha co-orientadora pela orientação, paciência e dedicação.

À todos os amigos e funcionários da Embrapa, Agnelli, Filé, Chorão, Érika, Ana Paula, Zé Carlos e Paulo Sérgio que auxiliaram na realização desta pesquisa.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade e à Capes pelo auxílio financeiro.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação, muito obrigada!

RESUMO

ZIN, Izabela Mendes. **Determinação do efeito bifidogênico da farinha de casca de jabuticaba em leite fermentado probiótico**. 2018. 62 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

O interesse por produtos alimentícios saudáveis, nutritivos e prontos para o consumo tem aumentando tanto no Brasil quanto no restante do mundo e, entre eles, os leites fermentados probióticos merecem destaque. A jabuticaba é uma fruta nativa brasileira de sabor e aroma agradáveis, além de ser rica em compostos bioativos encontrados principalmente na casca em elevadas concentrações. A farinha da casca da jabuticaba (FCJ) foi processada (despolpada, as cascas desidratadas e trituradas) e caracterizada por análises físicas, químicas e microbiológicas. A FCJ é rica em compostos fenólicos ($544,37 \pm 6,84$ mg de ácido gálico/100 g), antocianinas totais ($601,88 \pm 15,61$ mg/100 g) e apresentou elevada capacidade antioxidante (pelo método ABTS⁺ de $1084,12 \pm 61,55$ μ mol trolox/g e ORAC de $438,05 \pm 7,43$ μ mol trolox/g); tem coloração roxa; tamanho médio das partículas de 80,8 μ m; rica em fibras solúveis (26,20 g/100 g); pH de 3,42 e acidez em 6,61%. Para avaliar o potencial bifidogênico da FCJ foram produzidos leites fermentados probióticos com *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 (*B. lactis*), o controle sem FCJ (F1) e outro com adição de 2% de FCJ (F2). Verificou-se que a FCJ impactou na multiplicação das *B. lactis* durante a fermentação e redução do tempo de fermentação em cinco horas em relação ao controle, (redução de 19%). Na simulação *in vitro* da passagem dos leites fermentados pelo sistema gastrointestinal realizada na primeira e na quarta semana de armazenagem, observou-se que a FCJ interferiu positivamente na proteção da *B. lactis*. Com exceção da fase entérica 1, nas outras etapas a F2 apresentou uma contagem de um ciclo logarítmico superior de *B. lactis* em relação ao controle. A contagem de bolor e leveduras acima de 2×10^2 UFC/g determinou o fim da vida útil dos produtos em estudo, apesar das contagens de *B. lactis* permanecerem acima do mínimo recomendado pela legislação vigente até a quarta semana de armazenagem. Ao longo das quatro semanas de armazenagem observou-se que a contagem de *B. lactis* na F1 variou de 8,47 a 6,73 log UFC/g enquanto que na F2 variou de 9,64 a 7,28 log UFC/g, ou seja, a FCJ favoreceu a manutenção elevada das *B. lactis*. Ao longo do período de estocagem foi observado uma redução de 47,9% no teor de compostos fenólicos, 85,2% no teor de cianidina-3-glicosídeo e 46,3% na capacidade antioxidante pelo método de ORAC.

Palavras-chave: Jabuticaba. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Probiótico.

ABSTRACT

ZIN, Izabela Mendes. **Determination of the bifidogenic effect of the jabuticaba skin flour on probiotic fermented milk.** 2018. 62 p. Dissertation (Master Science in Food Science and Technology, Food Technology). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

The interest in healthy, nutritious and ready-to-eat food products has increased both in Brazil and in the rest of the world, and among them fermented milks probiotics deserves attention. Jabuticaba is a Brazilian native fruit with a pleasant taste and aroma and rich in bioactive compounds found mainly in the skin at high concentration. The jabuticaba skin flour (JSF) was processed (pulped, the skins were dehydrated and crushed) and characterized by physical, chemical and microbiological analyzes. JSF is rich in phenolic compounds (544.37 ± 6.84 mg of gallic acid/100 g), total anthocyanins (601.88 ± 15.61 mg/100 g) and showed high antioxidant capacity (using ABTS⁺ method of 1084.12 ± 61.55 μ mol trolox/g and ORAC of 438.05 ± 7.43 μ mol trolox/g); has purple coloration; mean particle size of 80.8 μ m; rich in soluble fibers (26.20 g/100 g); pH of 3.42 and acidity in 6.61%. To evaluate the bifidogenic potential of JSF, probiotic fermented milks were produced with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 (*B. lactis*), control without JSF (F1) and another with addition of 2% JSF (F2). It was verified that JSF impacted the multiplication of *B. lactis* during the fermentation and reducing the fermentation time in five hours in relation to the control, (reduction of 19%). In the in vitro simulation of fermented milk passage through the gastrointestinal tract performed in the first and the fourth week of storage, it was observed that the JSF interfered positively in the protection of *B. lactis*. With the exception of enteric phase 1, in the other stages F2 presented a higher logarithmic cycle count of *B. lactis* than control. The mold and yeast counts above 2×10^2 CFU/g determined the end of the product's shelf life under study, although *B. lactis* counts remained above the minimum recommended by the legislation in force until the fourth week of storage. Over the four weeks of storage, the *B. lactis* count in F1 ranged from 8.47 to 6.73 log CFU/g whereas in F2 it ranged from 9.64 to 7.28 log CFU/g, the FCJ favored the high maintenance of *B. lactis*. During the storage period, a reduction of 47.9% in the content of phenolic compounds, 85.2% in the cyanidin-3-glycoside content and 46.3% in the antioxidant capacity by the ORAC method was observed.

Key words: Jabuticaba. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Probiotic.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características físicas químicas dos leites fermentados F1 e F2.....	30
Tabela 2 – Resultados das concentrações de compostos fenólicos, antocianinas e capacidade antioxidante nas amostras de leite fermentado F1 e F2. Valores médios \pm desvio padrão.....	31
Tabela 3 – Parâmetros de cor dos leites fermentados F1 e F2 armazenados refrigerado durante o período de 4 semanas. Valores médios \pm desvio padrão.....	32
Tabela 4 – Valores de pH das formulações F1 e F2. Valores médios \pm desvio padrão.	35
Tabela 5 – Acidez titulável (% ácido láctico) de F1 e F2. Valores médios \pm desvio padrão....	36
Tabela 6 – Contagem de células viáveis de <i>B. lactis</i> (log UFC/g) nas amostras F1 e F2 durante o período de quatro semanas de armazenamento refrigerado (4°C).	37
Tabela 7 – Contagem de células viáveis de <i>B. lactis</i> (log UFC/g) em F1 e F2 nas diferentes etapas da simulação da passagem pelo sistema gastrointestinal realizadas na primeira semana de análise a na quarta semana. Valores médios \pm desvio padrão.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Jabuticabas higienizadas e enxugadas na mesa de aspersão.	17
Figura 2 - Cascas de jabuticabas desidratadas em bandeja com circulação de ar forçada.....	18
Figura 3 - Cascas de jabuticabas trituradas em moinho de martelo.....	19
Figura 4 - Curva de fermentação (pH e acidez titulável) dos leites fermentados probióticos F1 e F2 em função do tempo.	34

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo de rendimento do processo de despulpamento da jabuticaba.	17
Equação 2 - Cálculo de rendimento do processo de desidratação da casca da jabuticaba.....	18
Equação 3 - Cálculo da concentração de antocianinas presentes na farinha da casca de jabuticaba.	21
Equação 4 - Cálculo da concentração da capacidade antioxidante pelo método de ORAC. ...	22
Equação 5 - Cálculo da taxa de sobrevivência (TS%) do probiótico após a simulação da fase entérica 2 (final).	24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1	Leite fermentado	3
2.2	Probióticos.....	4
2.2.1	<i>Bifidobacterium</i>	5
2.3	Efeito bifidogênico.....	7
2.4	Jabuticaba.....	11
3	OBJETIVOS	15
3.1	Objetivo geral.....	15
3.2	Objetivos específicos	15
4	MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1	Material	16
4.2	Métodos.....	16
4.2.1	Obtenção da farinha da casca de jabuticaba (FCJ).....	16
4.3	Caracterização da farinha da casca de jabuticaba	19
4.3.1	Análises físico-químicas	19
4.3.2	Tamanho das partículas.....	19
4.3.3	Cor instrumental.....	20
4.3.4	Análise microbiológica	20
4.3.5	Compostos fenólicos totais	20
4.3.6	Antocianinas totais	20
4.3.7	Capacidade antioxidante	21
4.3.7.1	Método ABTS+	21
4.3.7.2	Método ORAC	22
4.3.8	Formulação dos leites fermentados probióticos com e sem farinha da casca de jabuticaba	22
4.4	Avaliação das formulações dos leites fermentados probióticos com e sem farinha da casca de jabuticaba.....	23
4.4.1	Simulação da passagem pelo trato gastrointestinal	23
4.4.2	Análise de pH e acidez total.....	24
4.4.3	Análises microbiológicas	24
4.4.4	Composição centesimal.....	24
4.4.5	Extrato para determinação de compostos fenólicos e capacidade antioxidante.....	25
4.4.6	Compostos fenólicos totais	25
4.4.7	Antocianinas totais	25
4.4.8	Capacidade antioxidante	26
4.4.9	Cor instrumental.....	26
4.4.10	Análise estatística.....	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27

5.1	Composição da farinha da casca de jabuticaba	27
5.1.1	Compostos bioativos	28
5.2	Caracterização dos leites fermentados F1 e F2	29
5.2.1	Compostos bioativos	30
5.2.2	Cor instrumental.....	32
5.3	Resultados microbiológicos dos leites fermentados F1 e F2	33
5.3.1	pH e acidez titulável.....	34
5.3.2	Segurança microbiológica.....	36
5.3.3	Contagem de células viáveis de <i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12	37
5.3.4	Simulação <i>in vitro</i> da passagem pelo sistema gastrointestinal.....	38
6	CONCLUSÃO	41
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

A busca por uma alimentação saudável, com matérias primas ricas em determinados nutrientes ou em compostos bioativos aumenta a cada dia. Os consumidores estão cada vez mais preocupados com a qualidade dos alimentos, os ingredientes e aditivos presentes nos produtos alimentícios, tanto no Brasil quanto no restante do mundo. Atualmente existe uma tendência crescente por produtos com rótulo limpo (“*Clean label*”), com pouco ou sem aditivos. A procura por aditivos naturais, entre eles os corantes tem aumentado. A farinha de casca de jabuticaba (FCJ), além de ser rica em compostos bioativos, pode ser utilizada para conferir cor aos alimentos devido ao seu elevado teor de antocianinas.

O leite é uma matéria prima amplamente consumida devido ao seu elevado valor nutritivo, é rico em proteínas e contém carboidratos, lipídeos, vitaminas e sais minerais como o cálcio. Existem diferentes tipos de leites fermentados, sendo que o iogurte é o principal deles, tanto no Brasil quanto no restante do mundo. Os leites fermentados são excelentes veículos para incorporação de probióticos na alimentação humana. Os leites fermentados probióticos, podem conter ou não as bactérias do iogurte (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) e devem conter pelo menos um microrganismo probiótico. Os probióticos devem estar em quantidade suficiente até o final da vida útil do produto, devem sobreviver ao processamento, à armazenagem e à passagem pelo trato gastrointestinal para que o produto possa ter uma alegação funcional de probiótico que deve ser devidamente comprovada por estudos científicos.

A demanda por leites fermentados probióticos tem aumentado devido ao fato da indústria ter selecionado algumas linhagens de bactérias probióticas com boas características sensoriais e tecnológicos. As bactérias probióticas agregam valor e podem conferir uma alegação funcional ao produto final. Para aumentar o valor nutritivo, aceitação sensorial e diferenciar os produtos alimentícios é possível à incorporação de ingredientes funcionais, como diferentes tipos de frutas (na integra ou de partes específicas) e cereais além de diferentes microrganismos.

Para que as bactérias probióticas se multipliquem e sobrevivam, a composição do alimento deve ser conhecida. É importante conhecer o teor de gordura, de proteínas (concentração e tipos), açúcares, vitaminas, minerais e pH final do produto. Fatores inerentes ao produto alimentício também são importantes na viabilidade dos probióticos, como

atividade de água, potencial oxidativo, presença de outros microrganismos (co-cultura), temperatura de processo e de armazenamento do produto final.

A jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) é uma fruta nativa do Brasil, largamente apreciada pelos brasileiros devido ao aroma e sabor característicos. Porém, a elevada atividade de água e o alto teor de açúcar, são responsáveis por esta fruta ter uma vida útil muito limitada. E, devido ao fato de ser muito perecível, é transformada em diferentes produtos como geleia, doce, polpa e produtos fermentados; além de ser empregada na produção de licor, “vinho” e vinagre, entre outros.

A jabuticaba ainda é pouco explorada industrialmente e do processamento desta, obtém-se como resíduo as cascas, que são destinadas basicamente para ração animal ou compostagem. Porém, vários estudos recentes têm evidenciado que a casca possui um elevado potencial funcional a ser explorado, pois apresenta diferentes compostos bioativos. Importantes grupos de pesquisa (nacionais e internacionais) têm estudando esta fruta e identificado vários compostos de interesse comercial, e por isso já pode ser considerada como uma fruta do grupo das “Super Frutas”. Várias publicações científicas relatam que a jabuticaba apresenta diferentes compostos identificados na polpa, casca e caroço.

A farinha de casca pode ser utilizada para enriquecer produtos alimentícios com fibras, uma vez que possui cerca de 15% e é rica em pectina. A maioria das pesquisas recentes tem focado a atenção principalmente na casca, parte da fruta mais rica em compostos funcionais, apresentando uma composição físico-química única, com presença de compostos de grande substâncias polifenólicas, como: taninos (galotaninos e elagitaninos) e antocianinas (cianidina-3-glicosídeo e delphinidina-3-glicosídeo) entre outros.

E, em uma pesquisa recente, observou-se que um extrato supercrítico de casca de jabuticaba manteve elevada a contagem de probióticos em queijo *Petit Suisse*, sugerindo que a casca de jabuticaba apresenta um possível efeito prebiótico. O possível efeito bifidogênico da farinha de casca de jabuticaba foi estudado nesta pesquisa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leite fermentado

Entende-se por leites fermentados, os produtos obtidos por coagulação e diminuição do pH do leite, adicionado ou não de outros produtos lácteos/substâncias alimentícias, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microrganismos específicos (BRASIL, 2007).

A fermentação do leite é realizada em quase todos os países com diferentes microrganismos e por métodos diversos, resultando em uma grande variedade de produtos. A fermentação é um dos métodos mais antigos utilizado para aumentar a vida útil do leite. Desde a antiguidade existem relatos do consumo de leites fermentados, não se sabe exatamente a origem destes processos, porém mais de 10.000 anos de história (TAMINE; ROBISON, 2007).

A presença de bolores e leveduras em leites fermentados é permitida até a contagem máxima de 10^2 UFC/g. E em geral, o que determina o fim da vida útil dos leites fermentados é a contagem elevada de bolores e leveduras, acima da máxima permitida na legislação vigente (BRASIL, 2007).

Em todos os leites fermentados, até o final da validade dos produtos, as bactérias lácticas devem estar viáveis e em quantidade elevada. Nos casos dos leites fermentados com probióticos é necessário a comprovação de eficácia dos efeitos funcionais e deve ser demonstrado efeito funcional. A identificação e mensuração do efeito devem estar claramente definidas (BRASIL, 2007).

Caso um leite fermentado não tenha em sua formulação as duas bactérias do iogurte, ele não pode ser chamado de iogurte, por definição. A Instrução Normativa N° 46/2007 prevê a elaboração de diferentes tipos de leites fermentados e de acordo com o(s) microrganismo(s) utilizado(s) o produto terá uma denominação diferenciada, assim como também aroma, sabor e textura característicos (BRASIL, 2007).

Os leites fermentados, além de serem bem aceitos pelo público em geral, apresentam alto valor nutritivo e eles constituem um excelente veículo para inserir os probióticos na dieta humana, devido a composição do leite (ANTUNES et al., 2007).

Segundo Oliveira (2009), as bactérias lácticas utilizadas na fabricação de leites fermentados podem ser divididas em dois grandes grupos. O grupo das tecnológicas, que são acidificantes responsáveis pela fermentação do leite e que resultam em produtos com

qualidade sensorial, porém, estas bactérias não resistem à passagem pelo trato gastrointestinal. E o grupo das chamadas de terapêuticas, que são as probióticas, tolerantes à elevada acidez estomacal e à bile, sobrevivendo à passagem pelo trato gastrointestinal, contribuindo com a saúde e com o bem estar dos consumidores (OLIVEIRA, 2009).

2.2 Probióticos

Para que um microrganismo seja considerado probiótico deve possuir características específicas, permanecer estável e viável ao longo das condições de processamento e durante toda a vida útil do produto onde foi adicionado; ser capaz de resistir às condições adversas da passagem pelo trato gastrointestinal (elevada acidez gástrica, enzimas digestivas e sais biliares) e ser capaz de se fixar à mucosa intestinal e colonizar a região para que possam produzir efeito benéfico ao hospedeiro. Dentre os efeitos benéficos dos probióticos, podem ser destacados os seguintes: atividade antimicrobiana contra patógenos; redução da adesão de patógenos no cólon do intestino; atividade hidrolítica sobre sais biliares; contribuição nutricional devido ao aumento de absorção de alguns minerais e produção de vitaminas; modulação da atividade imunológica e redução da produção de toxinas patogênicos que iriam permanecer no cólon do intestino caso os probióticos não estivessem presentes na região (SAAD et al., 2013; JUNGENSEN et al., 2014).

Os alimentos funcionais, além das funções básicas nutritivas, como fonte de energia para constituição das células e dos tecidos, contêm compostos que atuam modulando e ativando processos metabólicos, podendo resultar em benefícios para a saúde do consumidor e prevenindo o aparecimento de diferentes doenças (ZUCCOTTI et al., 2008).

Muitos benefícios para saúde têm sido relacionados ao consumo de probióticos, porém, somente alguns deles já tem suficiente comprovação científica. Os produtos lácteos estão entre os principais alimentos de veiculação de microrganismos probióticos, devido ao fato do leite ser um meio rico, sendo necessário, apenas a adição de alguns fatores de multiplicação que reduzem o tempo de fermentação das bactérias probióticas (LEE; SALMINEN, 2009). Os leites fermentados são bons veículos para incorporação dos probióticos na dieta humana, e além disso, possuem grande aceitação pelo público em geral (ANTUNES et al., 2007).

Estudos têm demonstrado que o consumo de leites fermentados contendo probióticos traz benefícios à saúde. Segundo Denipote, Trindade e Burini (2010), existem vários

benefícios atribuídos aos probióticos que ainda estão sendo estudados, tais como: atividade anti-carcinogênica e redução dos níveis de colesterol. E alguns benefícios que já foram cientificamente comprovados como, por exemplo a prevenção de infecções intestinais, de diarreias e a melhora na digestão da lactose por pessoas com intolerância. O efeito hipocolesterolemizante dos probióticos está associado à desconjugação dos ácidos biliares pela enzima hidrolase ácido biliar, reduzindo a absorção do colesterol (COSTA; BORÉM, 2003).

Vários microrganismos são probióticos e, dentre eles, destacam-se os seguintes gêneros: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Enterococcus*, sendo que os dois primeiros gêneros citados são, em geral, os probióticos mais utilizados em produtos lácteos (SHAH, 2007). As bactérias probióticas para humanos foram isoladas do trato gastrointestinal dos seres humanos saudáveis, sendo as *Bifidobacterium* spp. principalmente do cólon e os *Lactobacillus* spp. do íleo intestinal (BARRETO et al., 2003; SAAD, 2006).

2.2.1 *Bifidobacterium*

O gênero *Bifidobacterium* possui várias espécies (KHEADR et al., 2007) com diversos habitats, como por exemplo: o intestino humano, a cavidade bucal e o trato gastrointestinal animal. Eles fazem parte da microbiota humana, tem a capacidade de inibir a multiplicação de *Candida albicans*, de *Escherichia coli* e outras bactérias patogênicas (BIAVATI et al., 2000).

Inicialmente, em 1899, esses microrganismos foram isolados de fezes de recém-nascidos que só foram amamentados por leite materno. Mas atualmente sabe-se que estas bactérias são comuns na microbiota do trato gastrointestinal (JUNGERSEN et al., 2014).

Bifidobacterium são caracterizadas como bactérias gram-positivas, anaeróbicas, que se apresentam na forma de bastonete, não esporuladas e não tem motilidade. Estes microrganismos são também produtores de ácido lático e ácido acético, sem produção de gás carbônico (JUNGERSEN et al., 2014). A temperatura ótima de multiplicação varia de 37 a 42 °C (DONG; CHENG; JIAN, 2000).

Estudos comprovaram os seguintes efeitos benéficos no metabolismo: diminuição do colesterol LDL (*Low Density Lipoprotein*) em pacientes com diabetes tipo 2 e melhora na tolerância à glicose durante a gravidez (LUOTO, 2010). Apenas *Bifidobacterium lactis* têm demonstrado habilidade de sobreviver em ambientes ácidos e, portanto, são os

preferencialmente utilizadas em produtos comerciais à base de leite fermentado (JAYAMANNE; ADAMS, 2006).

A bactéria *Bifidobacterium lactis* é comumente utilizada em associação com as bactérias do iogurte devido à elevada resistência ao meio ácido e em condições de estresse oxidativo, por aderir fortemente à mucosa intestinal humana e conseqüentemente ter uma elevada capacidade de colonização (MATTLA-SANDHOLM et al., 2002; GUEIMONDE et al., 2004). As mudanças fenotípicas, seleção de linhagens com melhoramento das propriedades tecnológicas promoveram um aumento da resistência das bifidobactérias à acidez, aumentando a possibilidade da utilização comercial deste probiótico (YOLANDA, 2007).

A linhagem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 é originária da coleção de culturas lácticas de Chr. Hansen. Esta linhagem foi especialmente selecionada para produção de produtos lácteos probióticos e também tem sido bastante utilizada em formulações para lactantes, em suplementos dietéticos e em produtos fermentados no mundo todo. A linhagem BB12 apresenta uma excelente tolerância aos ácidos, a hidrólise dos sais biliares e tem uma forte aderência ao cólon do intestino. Além disso, ela não gera efeito adverso no sabor, aparência ou na percepção sensorial dos produtos e também tem uma boa capacidade de sobrevivência (JUNGERSEN et al., 2014).

Estudos realizados *in vivo* e *in vitro* utilizando *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (*B. lactis*) BB12 determinaram os efeitos benéficos desta linhagem e também de *Lactobacillus acidophilus* (*Lb. acidophilus*) La-5. Um estudo testou estes dois microrganismos na supressão da infecção por *Helicobacter pylori* em indivíduos assintomáticos. Durante seis semanas um grupo recebeu iogurte contendo um dos probióticos: o *Lb. acidophilus* ou *B. lactis* duas vezes ao dia, enquanto o grupo controle recebeu apenas um leite fermentado placebo. No grupo que ingeriu o iogurte probiótico, as análises mostraram que houve diminuição da atividade de urease de *Helicobacter pylori*, sendo que *B. lactis* demonstrou ser a principal responsável pela supressão da infecção por *Helicobacter pylori* (WANG et al., 2004).

Estudos evidenciam que *B. lactis* e *Lb. acidophilus* são capazes de inibir a multiplicação de *Helicobacter pylori*, devido a liberação de bacteriocinas e de ácidos orgânicos. Além disso, possivelmente são também responsáveis pela estabilização da função da mucosa gástrica e pela diminuição da inflamação (GOTTELAND; BRUNSER; CRUCHET, 2006). As bifidobactérias se diferenciam dos lactobacilos devido à produção das enzimas: frutose-6-fosfato e β -galactosidase (TANNOCK et al., 2004).

Mesmo com o aumento do interesse em se desenvolver novos alimentos funcionais simbióticos (combinação de probióticos com prebióticos), existem poucos trabalhos publicados de produtos simbióticos, sendo necessário mais pesquisas (LAMIKI et al., 2010). Já existem alguns produtos simbióticos no mercado, no entanto, existem poucos estudos comprovando que os prebióticos provocam o aumento da sobrevivência e da multiplicação dos probióticos tanto *in vivo* quanto *in vitro* (DUNCAN; FLINT, 2013).

Leite (2015) caracterizou e avaliou os parâmetros físico-químicos e a viabilidade das bactérias em um iogurte simbiótico de açaí com inulina e adicionado de cultura probiótica de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. O processamento do iogurte foi realizado inoculando uma cultura liofilizada de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (Chr Hansen[®]) de acordo com as recomendações do fabricante. Foram preparadas diferentes formulações com adição de polpa de açaí nas concentrações de 0%, 5%, 10%, 15%, 20% e 25%. Observou-se um aumento no conteúdo de fenólicos totais, nas antocianinas e na atividade antioxidante com o aumento do teor de polpa de açaí. Após 28 dias de armazenamento a 5 °C, foi observada uma redução no teor de antocianinas e na atividade antioxidante. Verificou-se uma contribuição positiva da polpa de açaí na viabilidade das bactérias lácticas (LEITE, 2015).

2.3 Efeito bifidogênico

A microbiota intestinal apresenta uma grande biodiversidade com mais de 500 espécies de bactérias distribuídas de igualdade ao longo do trato gastrointestinal devido à ação bactericida do suco gástrico, bile, secreção do pâncreas e forte movimento peristáltico do intestino (GUARNER; MALAGELADA, 2003). A maior concentração de bactérias é no cólon, local que apresenta um complexo e dinâmico ecossistema microbiótico, favorecido pela ausência de secreção enzimática e riqueza de nutrientes (KELLY; KING; AMINOV, 2007).

O cólon tem grande importância na fisiologia humana, além de absorver água e sais minerais, a região armazena carboidratos não digeríveis e os converte em ácidos graxos de cadeia curta por meio da fermentação (BÚRIGO et al., 2007; MEYER; STASSE-WOLTHUIS, 2009). O butirato está envolvido na proteção contra substâncias carcinogênicas e na redução sérica de lipídeos de baixa densidade (ROBERFROID et al., 2010).

Os prebióticos não devem ser hidrolisados e nem absorvidos, na parte superior do trato gastrointestinal, porém devem ser fermentados pela microbiota intestinal estimulando a multiplicação e/ou atividade dos probióticos. Os prebióticos podem atuar modulando o sistema gastrointestinal indiretamente devido ao estímulo da multiplicação das bactérias probióticas, responsáveis pela redução do pH e pela absorção da amônia (OLIVEIRA, 2009; SILVA, 2007).

Existem diversos prebióticos, como os frutanos (diferentes tipos de frutoligossacarídeos e a inulina), os glucossacarídeos (dextrinas resistentes, β -glucanos e amidos resistentes), os monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (goma Guar, amido resistente e pectina). Alguns prebióticos são encontrados naturalmente em alimentos, como no alho poró, almeirão, aspargos, banana, alcachofra, alho, cebola, soja, trigo e aveia (PINEIRO et al., 2008).

Estudos *in vitro* e *in vivo* relatam que os prebióticos estimulam seletivamente a multiplicação de probióticos, como por exemplo as bifidobacterias (efeito bifidogênico) no cólon do intestino (GIBSON et al., 2004).

Ao serem incorporados nos produtos, os prebióticos não devem influenciar negativamente na qualidade sensorial e devem ser estáveis ao processamento, armazenagem e distribuição. Altas temperaturas e baixos valores de pH são parâmetros tecnológicos que quando combinados por longos períodos de armazenamento, podem diminuir o potencial de alguns prebióticos. As características sensoriais e físico-químicas podem ser fatores limitantes na utilização dos prebióticos em produtos alimentícios. Os fatores limitantes podem ser uma baixa solubilidade em água em temperatura ambiente, um sabor levemente adocicado e a produção de soluções não transparentes ou géis brancos. A doçura dos prebióticos depende da estrutura química, do grau de polimerização e se eles são mono ou dissacarídeos (SAAD et al., 2013).

A inulina é uma fibra solúvel, fermentável e não digerível pela α -amilase e por enzimas hidrolíticas, como a sacarase, a maltase e a isomaltase, no trato gastrintestinal (SAAD, 2006). Pertence ao grupo dos frutanos, sendo um carboidrato composto de frutose, glicose e sacarose, apresentando em torno de 10% da doçura da sacarose. O baixo poder adoçante permite ser combinada com outros ingredientes sem alterar o sabor dos produtos. Quanto a solubilidade é relativamente solúvel em água e de baixa viscosidade (FRANCK, 2002). Apresenta uma alegação de propriedade funcional ou de saúde por exercer um efeito bifidogênico na estimulação do crescimento das bactérias presente no cólon, podendo ser usadas tanto como suplemento em alimentos quanto como substitutos de macronutrientes. Quando utilizado como suplemento, são adicionados com objetivo de aumentar o teor de fibra

do alimento, melhorando seu valor nutricional. Quanto utilizado como substitutos de macronutrientes, faz o papel de substituir a gordura. Forma microcristais na presença de água ou leite, que não são perceptíveis na boca, e caracteriza uma textura cremosa que promove a mesma sensação da gordura. Além disso, contribui na melhoria da capacidade de retenção de água e aumento da viscosidade do alimento devido a habilidade de formar um gel. A adição de inulina em produtos lácteos resulta em uma textura mais cremosa e sabor mais balanceado (PIMENTEL; GARCIA; PRUDENCIO, 2012).

Quando ocorre a hidrólise enzimática parcial da inulina e o número de unidades de monossacarídeos varia entre 2 e 8, são chamados de frutoligossacarídeos (FOS) (SAAD, 2006). Os FOS são carboidratos resistentes à ação das enzimas salivares e intestinais, chegando intactos ao cólon. Atuam na alteração do trânsito intestinal reduzindo metabólitos tóxicos, prevenção do câncer de cólon, diminuição do colesterol plasmático e hipertrigliceridemia. Além disso, possuem baixo valor energético, não são cariogênicos e atuam como um fator de crescimento de microorganismos benéficos da flora intestinal (BÚRIGO et al., 2007).

Oligossacarídeos são açúcares encontrados naturalmente em alimentos como frutas, vegetais, leite e mel, podendo ser sintetizados por enzimas via biotecnológica. Dentre os oligossacarídeos, destacam-se os galactooligossacarídeos produzidos a partir da lactose pela β -galactosidase. Outros oligossacarídeos são formados a partir da lactose por síntese química, como a lactulose que é um dissacarídeo composto por uma molécula de galactose e outra de frutose, unidas por ligação do tipo β -1,4 (AIT-AISSA; AIDER, 2014). Por não serem fermentados pela microflora bucal, os oligossacarídeos são utilizados como açúcares de baixa caloria em confeitos, gomas de mascar, iogurtes e bebidas, e, principalmente, em alimentos para diabéticos, podendo ainda ser utilizados em conjunto com edulcorantes artificiais, como aspartame e fenilalanina, mascarando o sabor indesejável produzido por alguns destes adoçantes (MICHELON et al., 2014).

O amido resistente é uma fração do amido que não é metabolizado e resiste a uma digestão enzimática do trato gastrointestinal, podendo ser fermentado no cólon pela microbiota bacteriana e produzir principalmente gás e ácidos graxos de cadeia curta. Por isso, os efeitos do amido resistente são comparáveis aos de fibra dietética, encontrada nos prebióticos (COPELAND et al., 2009).

As pectinas e os oligossacarídeos derivados de pectina (POS) foram identificados como prebióticos emergentes com capacidade de modulação da microbiota, incluindo o aumento de espécies bacterianas como *Faecalibacterium prausnitzii* e *Roseburia intestinalis*, capacidade

de atingir e causar efeitos na parte distal do cólon quando comparados com outros oligossacarídeos como frutooligossacarídeos (FOS) ou galactooligossacarídeos (GOS). São complexos hetero-polissacarídeos, constituídos principalmente de homogalacturonano, xilogalacturonano, rhamnogalacturonano I e rhamnogalacturonano II (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). Estudos utilizando polpa de beterraba e resíduos de casca de limão foram processados e obtendo-se duas misturas de oligossacarídeos de pectina que foram avaliados quanto ao seu potencial prebiótico por fermentação *in vitro* utilizando inóculos fecais humanos. A polpa de beterraba mostrou uma habilidade bifidogênica notável, permitindo uma mudança nas bifidobactérias após a fermentação, enquanto o resíduo de casca de limão estimulou a multiplicação de lactobacilos (GÓMEZ, 2016).

A combinação de probióticos com prebióticos em produtos alimentícios resultam nos chamados produtos simbióticos que podem promover uma melhoria do bem-estar e um impacto positivo na saúde. Os prebióticos irão favorecer a multiplicação dos probióticos no cólon do intestino em detrimento dos microrganismos patogênicos que possam estar presentes na microbiota intestinal (SAAD et al., 2013).

O interesse com relação as antocianinas aumentou após a possível ligação existente entre o consumo destas com a redução do risco de doenças crônicas. Estudos sugerem que as antocianinas podem reduzir o risco de doenças coronarianas, contribuem na prevenção da obesidade, têm efeito anti-inflamatório, atividade anticarcinogênica, antioxidantes, antimicrobiana (PEIXOTO et al., 2016).

Os efeitos biológicos das antocianinas dependem de uma biodisponibilidade, que estão relacionados com a sua estabilidade digestiva, bioaccessibilidade, eficiência da passagem transepitelial (absorção), distribuição no plasma e nos tecidos alvo. Quando expostas as condições do pH intestinal, a estrutura das antocianinas mudam, tornando-as incolor. Essa modificação estrutural restringe a identificação, quantificação e subestima os valores detectados. Assim, as antocianinas apresentam algumas características particulares relacionadas à absorção biológica, que devem ser consideradas. Por exemplo, podem ser absorvidas como glicosídeos sem sofrer alterações, apresentam baixa biodisponibilidade aparente *in vivo*, podem ser absorvidas e eliminadas rapidamente, além disso, podem ser metabolizadas pela microbiota do cólon (HE; GIUSTI, 2010).

2.4 Jaboticaba

O nome científico da jaboticabeira ou jaboticabeira é *Myrciaria cauliflora* Berg, uma árvore frutífera nativa da Mata Atlântica Brasileira, que pertence à família *Myrtaceae* e pode ser encontrada em diversos estados brasileiros, nas regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste, sendo que São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo são os maiores produtores desta fruta. Os frutos desta planta são bagas globosas com até três centímetros de diâmetro, com casca de coloração avermelhada/roxa a quase preta, a polpa é esbranquiçada com sabor doce, podendo ter de uma a quatro sementes. As características da jaboticaba variam de acordo com a variedade da fruta (ASQUIERI; SILVA; CÂNDIDO, 2009; JUNIOR et al., 2011; LIMA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2003; SILVA et al., 2008; VILELA et al., 2012).

A jaboticabeira é uma árvore de porte médio, possui folhas lanceoladas, flores brancas e frutos globosos. Quando a fruto está maduro, a casca é preta, fina e frágil, porém, a polpa é ácida e doce. A partir desta fruta podem ser produzidos diferentes produtos tais como: suco, polpa, chás, geleias, compotas, fermentados, licores e vinhos (ASQUIERI; SILVA; CÂNDIDO, 2009). Devido à elevada produtividade, a jaboticaba é uma fruta com um grande potencial econômico, considerando as características sensoriais únicas, o fato de ser largamente apreciada, além de ter um potencial funcional promissor (JUNIOR et al., 2011).

A espécie de jaboticaba mais difundida no Brasil é a *Myrciaria cauliflora* (*M. cauliflora*) popularmente conhecida como jaboticaba paulista ou jaboticaba açu, ela se destaca por apresentar uma boa produtividade, frutos grandes, coriáceos e tem uma maturação tardia (GOMES, 1983). Porém, a espécie de jaboticaba de maior cultivo no país é a *Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg (*M. jaboticaba*), conhecida como jaboticaba Sabará, que possui um fruto globoso, polpa macia, esbranquiçada, succulenta e ligeiramente ácida. Tem cerca de 0,23% de vitamina C e com relação aos minerais, destacam-se os teores de ferro, cálcio, fósforo e potássio (OLIVEIRA et al., 2003; SILVA et al., 2008).

A jaboticaba é uma fruta muito perecível, tendo uma vida útil extremamente curta, apesar de ainda não ser muito industrializada, a polpa pode ser transformada em diferentes produtos e existem estudos que indicam que a casca pode ter efeito antiasmático, prevenir inflamação do intestino e hemoptise (LIMA et al., 2008).

Alezandro e colaboradores (2013) compararam a composição química e a capacidade antioxidante de duas espécies mais comercializadas de jaboticaba, Sabará e Paulista, de

diferentes partes da fruta (casca, polpa e semente) e em diferentes estágios de maturação. As duas espécies apresentam composições centesimais e minerais bastante similares, ambas são ricas em: K, Mn e Cu. A concentração dos derivados de quercetina e de antocianinas foi maior na espécie Paulista. No entanto, os derivados do ácido elágico, que são os principais polifenóis da jabuticaba, foram detectados em maior quantidade na espécie Sabará. A quantidade variou de acordo com estágio de maturação e com as diferentes partes da fruta (casca, polpa e sementes). A fruta verde apresentou teor mais elevado dos compostos fenólicos e maior capacidade antioxidante. O amadurecimento das frutas levou a uma diminuição dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante (ALEZANDRO et al., 2013).

A casca da jabuticaba tem sido bastante estudada nos últimos anos por apresentar um elevado teor de fibras, ser rica em pectina, possuir substâncias que atuam no controle dos níveis sanguíneos de açúcar e de colesterol, que auxiliam na redução da incidência de doenças cardíacas e de cálculos biliares (FERREIRA et al., 2012). Geralmente a casca é descartada ou, quando utilizada, é basicamente destinada à produção de ração animal ou compostagem, sendo que as cascas e as sementes representam em torno de 50% da massa da fruta *in natura* (LIMA et al., 2008).

Um estudo clínico piloto caracterizou o perfil de polifenóis e a capacidade antioxidante da casca de jabuticaba Sabará (*Myrciaria jaboticaba*). As antocianinas foram os compostos fenólicos encontrados em maior concentração, no entanto, os elagitaninos e os galotaninos parecem ser os principais responsáveis pela capacidade antioxidante total da fruta (PLAZA et al., 2016).

Pesquisa realizada com jabuticaba Sabará (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg) determinou os compostos bioativos e a composição química das diferentes frações da fruta. Com a exceção de polpa de jabuticaba, as outras frações podem ser exploradas como fonte de fibra dietética. A jabuticaba pode ser considerada como uma fonte de vitamina A e a polpa como fonte de Fe, Mn e Cu. O perfil fenólico das frações de jabuticaba (polpa, casca, sementes e resíduo do despolpamento) foi estudado e onze compostos fenólicos foram identificados, dos quais, as formas solúveis predominaram, sendo as antocianinas os compostos mais abundantes. A casca, a semente e os resíduos do despolpamento jabuticaba apresentaram maior atividade antioxidante quando comparados a: açai, mirtilo, jambolão, amora, framboesa e morango. Os resultados indicaram que a jabuticaba tem um elevado potencial comercial devido às suas propriedades nutricionais e funcionais (INADA et al., 2015).

A composição química de casca de jabuticaba liofilizada e de um extrato aquoso da casca de jabuticaba foram avaliadas com relação aos compostos fenólicos, antocianinas totais, flavonoides e capacidade antioxidante. O extrato metanólico da casca de jabuticaba liofilizada apresentou os maiores níveis de compostos fenólicos totais (ácido elágico) e de antocianinas. Porém, no extrato aquoso de casca de jabuticaba observou-se os níveis mais elevados de antocianinas (cianidina-3-O-glicosídica) e de compostos fenólicos totais. Nos dois tipos de extratos da casca de jabuticaba analisados observou-se atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* nos animais pesquisados (LENQUISTE et al., 2015).

Avaliando a composição da jabuticaba *in natura* e desidratada, pesquisadores observaram que o teor total de antocianina foi de 58 mg/100 g de fruta *in natura*, o teor de compostos fenólicos totais foi 440 mg/100 g de ácido gálico na fruta *in natura* e 3584 mg/100 g de ácido gálico na fruta desidratada e o teor de carotenoide foi de 0,32 mg/100 g na fruta fresca (RUFINO et al., 2010). A antocianina é um componente muito importante e estudado, por isso a maioria das pesquisas focou na casca da jabuticaba que é a parte da fruta com o teor mais elevado deste composto (SANTOS; VEGGI; MEIRELES, 2010; LEITE-LEGATTI et al., 2012).

O teor de antocianinas presente na casca da jabuticaba é elevado, sendo próximo ao encontrado em uva (cerca de 750 mg/100 g) segundo os estudos de Malacrida e Motta (2005). Segundo Teixeira, Stringheta, e Oliveira (2008), o teor de antocianinas da casca da jabuticaba determinado pelo método do pH diferencial foi de 641,01 mg/100 g e também foi observado uma elevada capacidade antioxidante. De acordo com a classificação adotada por Macheix e colaboradores (1990), alimentos com teor de antocianinas dentro desta faixa são considerados como tendo elevado teor de antocianinas.

Lima e colaboradores (2011) analisaram diferentes solventes para a extração de antocianinas de duas variedades de jabuticaba (Paulista e Sabará). Eles fizeram a identificação, quantificação e verificação da estabilidade das antocianinas, avaliando a atividade antioxidante por três métodos e a determinação do teor de vitamina C. Foi observado uma melhor extração e estabilidade dos pigmentos quando realizada a maceração com etanol acidificado com HCl 1,5 mol/L (85:15). O estudo constatou que as cascas são ricas em antocianinas e a cianidina 3-glucosídeo, componente majoritário encontrado nas cascas, seguido pela delphinidina-3-glucosídeo. Os níveis de vitamina C mais elevados foram encontrados nas cascas e nas sementes. Foi verificado que a casca apresentou a maior atividade antioxidante, tanto na captura de radical livre, quanto no retardo do processo de oxidação lipídica (LIMA et al., 2011).

Estudos identificaram diferentes compostos de interesse em casca de jabuticaba tais como: compostos fenólicos, depsídeos, galotaninos, elagitaninos, entre outros (REYNERTSON et al., 2006; WU; LONG; KENNELLY, 2013).

A jabuticaba e seus derivados já foram estudados e aplicados em diversos produtos, como atomização de extratos da semente e da casca desidratados (BORGES et al., 2015); ultrassom assistida na extração de antocianinas da casca de jabuticaba (VEGGI; SANTOS; MEIRELES, 2011); estabilidade das antocianinas extraídas das cascas de jabuticaba para utilização como corante natural (SILVA et al., 2010); utilização de extratos de antocianinas de casca de jabuticaba em bebidas isotônicas (CIPRIANO, 2011); uso da farinha de casca da jabuticaba desidratada por convecção com ar quente e seco e por liofilização e com um extrato líquido ou desidratado em diferentes produtos alimentícios (LAMOUNIER et al., 2015); elaboração de biscoitos do tipo cookie com adição da farinha da casca da jabuticaba (FERREIRA et al., 2012); uso de farinha e extratos de antocianinas da casca da jabuticaba como corante em iogurte (ALVES et al., 2013); adição do extrato da casca de jabuticaba como corante natural em queijo *Petit Suisse* (SAITO, 2014); extrato da casca de jabuticaba em salsicha tipo *Bologna* (ALMEIDA et al., 2015).

Segundo estudos preliminares de Cavalcanti, Cruz e Meireles (2013), o extrato obtido da casca de jabuticaba pode ter um efeito prebiótico, uma vez que prolongou a sobrevivência de probióticos em produtos lácteos. Nos produtos testados, observou-se que os probióticos *Bifidobacterium longum* (em iogurte) e *Lactobacillus acidophilus* em *Petit Suisse* permaneceram viáveis por 30 dias. Este estudo sugeriu a existência de alguma substância na casca de jabuticaba com potencial prebiótico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi determinar o efeito bifidogênico da farinha de casca da jabuticaba Sabará (*Myrciaria jaboticaba*) em um leite fermentado probiótico com *Bifidobacterium lactis*.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a farinha de casca de jabuticaba (FCJ) por meio das análises físico-químicas, instrumentais, microbiológicas, quantificação total de antocianinas, compostos fenólicos e capacidade antioxidante;
- Avaliar o impacto da adição da farinha de casca de jabuticaba na viabilidade da bactéria probiótica *B. lactis* em leite fermentado durante a fermentação e ao longo de quatro semanas de estocagem refrigerada (4 °C);
- Quantificar antocianinas e compostos fenólicos, e determinar a capacidade antioxidante do leite fermentado com FCJ ao longo de quatro semanas de estocagem refrigerada (4 °C);
- Avaliar a sobrevivência das *B. lactis* do leite fermentado com FCJ pela simulação *in vitro* da passagem do produto pelo trato gastrointestinal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Neste projeto foi utilizado a jabuticaba Sabará *Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg, provenientes do Sítio Boa Vista, na localidade de Lagoa Branca, cidade de Casa Branca no estado de São Paulo.

O leite em pó integral da marca Nestlé (Ninho) foi adquirido da cidade do Rio de Janeiro/RJ e a bactéria probiótica utilizada foi a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, linhagem BB12 da marca Christian Hansen[®] (Dinamarca).

4.2 Métodos

As análises deste projeto de pesquisa foram realizadas nos laboratórios da Embrapa Agroindústria de Alimentos. O processamento do leite fermentado e todas as análises realizadas em triplicata.

4.2.1 Obtenção da farinha da casca de jabuticaba (FCJ)

As jabuticabas foram transportadas de São Paula para a CADEG-RJ durante a noite, onde foram recebidas de madrugada e levadas até a Embrapa Agroindústria de Alimentos, RJ.

Na planta de processamento, as frutas foram higienizadas, inicialmente com uma lavagem em água corrente para remoção das sujidades grosseiras, seguida pela etapa de sanitização realizada com imersão das frutas em solução clorada (hipoclorito de sódio) em uma concentração de 200 ppm por 15 minutos para redução da contaminação inicial da superfície da fruta e finalizada pela lavagem em mesa de aspersão para retirada do cloro residual (**Figura 1**).

Figura 1 - Jabuticabas higienizadas e enxugadas na mesa de aspersão.



Logo após a etapa de higienização das frutas foi realizada a separação das polpas das cascas e sementes em uma despulpadeira horizontal (Marca Bonina 0,25 df). O rendimento do foi calculado utilizando a massa de casca e a massa de jabuticaba *in natura* através da **Equação 1**.

Equação 1 - Cálculo de rendimento do processo de despulpamento da jabuticaba.

$$\text{Rendimento final} = \left(\frac{\text{Massa casca}}{\text{Massa jabuticaba } in\ natura} \right) \times 100$$

As cascas foram desidratadas em um desidratador de bandeja (desenvolvido na Embrapa Agroindústria de Alimentos) com circulação de ar forçada (**Figura 2**) a temperatura de 45 °C durante 36 horas até atingir peso constante.

Figura 2 - Cascas de jaboticabas desidratadas em bandeja com circulação de ar forçada.



A rendimento do processo de desidratação foi calculado utilizando a massa inicial e a massa final de casca de jaboticaba através da **Equação 2**.

Equação 2 - Cálculo de rendimento do processo de desidratação da casca da jaboticaba.

$$\text{Rendimento final} = \left(\frac{\text{Massa final}}{\text{Massa inicial}} \right) \times 100$$

As cascas desidratadas foram trituradas em moinho de martelo (**Figura 3**) e acondicionada em embalagens de polietileno metalizada à vácuo e armazenada em câmara de congelamento a -18 °C até o momento da utilização.

Figura 3 - Cascas de jaboticabas trituradas em moinho de martelo.



4.3 Caracterização da farinha da casca de jaboticaba

Na farinha da casca de jaboticaba foram determinados parâmetros físico-químicos como teor de fibras alimentares, umidade, atividade de água, pH, acidez (% em ácido cítrico); tamanho de partícula; cor instrumental; análises microbiológicas; teor de compostos fenólicos; teor de antocianinas totais e capacidade antioxidante.

4.3.1 Análises físico-químicas

A análise de fibras alimentares totais foi realizada de acordo com o método descrito pela AOAC (2010). As análises de umidade, pH e acidez (% de ácido cítrico) foram realizadas segundo as metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). Para a determinação da atividade de água foi utilizado o aparelho AquaLab (Washington, EUA) e analisado conforme as instruções do fabricante.

4.3.2 Tamanho das partículas

O tamanho de partícula da farinha da casca de jabuticaba foi determinado em um analisador de partículas a laser MICROTRAC S3500 (Microtrac Inc., Montgomery Ville, USA). A análise foi conduzida em duplicata utilizando-se água destilada como solvente com índice de refração de 1,33 (AACC, 2010).

4.3.3 Cor instrumental

A análise instrumental de cor foi realizada por refletância no aparelho Color Quest XE, escala CIELAB e CIELCh, com abertura de 25 mm de diâmetro, com iluminante D65/10 e determinados os parâmetros de L* (luminosidade), a* (-80 até zero = verde, do zero ao +100 = vermelho) e b* (-100 até zero = azul, do zero ao +70 = amarelo (FERNANDES et al., 2010).

4.3.4 Análise microbiológica

As análises microbiológicas da farinha de casca de jabuticaba foram realizadas no laboratório de microbiologia da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Foram determinadas as contagem de coliformes totais, coliformes termotolerantes, e bolores e leveduras conforme descrito em APHA (2001), seguindo as determinações da RDC n°12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

4.3.5 Compostos fenólicos totais

A determinação dos compostos fenólicos totais foi realizada conforme o método espectrofotométrico proposto por Singleton e Rossi (1965), modificado por Georgé et al. (2005) e os resultados obtidos foram expressos equivalente de ácido gálico.

4.3.6 Antocianinas totais

Na determinação do teor de antocianinas foi utilizando a metodologia de pH diferencial descrita por Giusti e Wrolstad (2001) e adaptada por Cruz (2013).

Para a quantificação das antocianinas totais foi utilizada absorvância entre 520 e 700 nm em solução de pH 1,0. Na quantificação das antocianinas monoméricas a absorvância foi na faixa de 520 a 700 nm e as amostras foram diluídas em solução tampão com pH 4,5. A concentração foi calculada utilizando a **Equação 3**.

Equação 3 - Cálculo da concentração de antocianinas presentes na farinha da casca de jabuticaba.

$$C_n = \left(\frac{(A_1 - A_2) \cdot V_1 \cdot fd_1}{m_1} - \frac{(A_3 - A_4) \cdot V_2 \cdot Fd_2}{m_2} \right) \cdot \frac{PM \cdot 1000}{\epsilon_1}$$

Onde:

A₁ e A₃ são as absorvâncias determinadas a 520 nm ;

A₂ e A₄ as absorvâncias a 700 nm para pH 1 e 4, 5, respectivamente;

Fd é o fator de diluição;

V o volume do balão utilizado;

PM o peso molecular da antocianina predominante (malvidina-3-glucosídeo);

ϵ é o coeficiente de extinção molar da malvidina 3,5-diglucosídeo em solução tampão pH 1,0 a 520 nm, cujo valor é de 37.700 L/cm.mol.

4.3.7 Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante da farinha da casca de jabuticaba foi determinada por meio de dois diferentes métodos descritos a seguir.

4.3.7.1 Método ABTS+

A determinação da capacidade antioxidante foi realizada pelo método ABTS⁺ proposto por Serpen et al. (2007). Os resultados foram expressos em *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC). Os extratos foram obtidos de acordo com a metodologia descrita por Rufino et al. (2007) e a quantificação foi realizada de acordo com Re et al. (1999).

4.3.7.2 Método ORAC

A determinação da capacidade antioxidante também foi realizada pelo método de ORAC (*Oxygen Radical Antioxidant Capacity*) e os resultados expressos em *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC) baseada na metodologia descrita por Zuleta et al. (2009).

A área abaixo da curva (AUC - Area Under Curve) das soluções padrão de Trolox, assim como das amostras e do branco foi calculado por meio do programa computacional Prisma[®], plotando-se as leituras de fluorescência ao longo do tempo de reação.

Os valores de AUC das diferentes concentrações de Trolox foram subtraídos da AUC do branco e as diferenças utilizadas para a construção da curva de calibração do Trolox. Os coeficientes, linear e angular, obtidos na curva de calibração foram empregados na quantificação das amostras utilizando a **Equação 4**.

Equação 4 - Cálculo da concentração da capacidade antioxidante pelo método de ORAC.

$$\text{ORAC}(\mu\text{molTrolox. g}^{-1}) = \frac{\left[\left((\text{AUC}_{\text{amostra}} - \text{AUC}_{\text{branco}})^{-b} \right) \right]}{\frac{a}{CA}}$$

Onde:

AUC é a área abaixo da curva calculada para a amostra;

AUC branco é a área abaixo da curva calculada para o branco;

b é o coeficiente linear;

a é o coeficiente angular;

CA é a concentração da amostra em solução dada (mg.L⁻¹).

4.3.8 Formulação dos leites fermentados probióticos com e sem farinha da casca de jabuticaba

Os leites fermentados probióticos foram processados de acordo com as recomendações de Tamime e Robinson (2007). O leite em pó, com 7 g de gordura/L, foi reconstituído a 12% (p/p) em água destilada, conforme instruções do fabricante, e esterilizado em autoclave. O leite a 42 ± 2 °C foi inoculada com *B. lactis* na concentração de 0,03 g por litro de leite e fermentado em incubadora BOD (SL – 200, Solab) a 42 ± 2 °C por 18 horas até atingir pH

4,8. Para interromper a fermentação, o produto foi resfriado e mantido a 4 °C, até análises finais.

Para avaliar o efeito da farinha de casca de jabuticaba na viabilidade de *B. lactis* no leite fermentado probiótico foi seguida a metodologia descrita por Santos et al. (2010). Inicialmente foram testadas a adição de diferentes concentrações (0,5%, 0,75%, 1%, 2% e 3%) de FCJ no leite fermentado probiótico afim de avaliar o impacto na multiplicação das *B. lactis*. A contagem de *B. lactis* foi realizada em MRS com glicose, as placas foram incubadas a 37 °C por 72 horas em anaerobiose (APHA, 2001).

Com base nestes resultados dos testes preliminares relacionando o tempo de fermentação e a contagem de *B. lactis*, foi determinada que a melhor concentração de farinha de casca de jabuticaba foi de 2%.

Com isso, para os experimentos finais elaborou-se duas formulações: o controle com leite fermentado probiótico sem farinha de casca de jabuticaba (F1) e leite fermentado probiótico com adição de 2% de farinha de casca de jabuticaba (F2).

4.4 Avaliação das formulações dos leites fermentados probióticos com e sem farinha da casca de jabuticaba

Após a determinação das formulações finais dos leites fermentados probióticos F1 e F2, foram realizadas análises da simulação da passagem pelo trato gastrointestinal (TGI), cor instrumental, físicas-químicas, determinação dos compostos fenólicos, antocianinas totais, capacidade antioxidante, análises microbiológicas e tratamento estatístico.

4.4.1 Simulação da passagem pelo trato gastrointestinal

Para avaliar a sobrevivência da bactéria probiótica *B. lactis* nas duas formulações dos leites fermentados probióticos, os produtos foram submetidos às condições que simulam a passagem pelo trato gastrintestinal *in vitro* de acordo com a metodologia proposta por Bedani et al. (2013).

A taxa de sobrevivência (TS%) do probiótico após a simulação da digestão gástrica e entérica foi calculada de acordo com a **Equação 5** descrita por Wang e colaboradores (2009).

Equação 5 - Cálculo da taxa de sobrevivência (TS%) do probiótico após a simulação da fase entérica 2 (final).

$$\text{Taxa de Sobrevivência (\%)} = \frac{\log \text{UFC N1}}{\log \text{UFC N0}} \times 100$$

Onde:

N1 é contagem de *B. lactis* após simulação entérica 2 (tempo 6).

N0 é contagem de *B. lactis* no produto, antes das simulações gastrintestinais (inicial - tempo 0).

4.4.2 Análise de pH e acidez total

As análises de umidade, pH e acidez (% de ácido láctico) foram realizadas segundo as metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (1985).

4.4.3 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas das duas formulações desenvolvidas foram realizadas no laboratório de microbiologia da Embrapa Agroindústria de Alimentos, a cada sete dias ao longo de quatro semanas de estocagem refrigerada para determinação do tempo de vida útil.

Semanalmente foram realizadas contagens de bolores e leveduras e de *B. lactis*. As análises foram realizadas em duplicata, conforme descrito por APHA (2001).

Além disso, na primeira semana de estocagem foram realizadas também as análises de coliformes totais e coliformes termotolerantes para avaliação das condições higiênico-sanitárias do processamento. Estas análises foram realizadas em triplicata (APHA, 2001).

4.4.4 Composição centesimal

As formulações foram analisadas segundo as metodologias propostas pela AOAC (2010). Foram determinados os teor de carboidratos, proteínas (método de Kjeldahl), lipídeos, fibras alimentares (método enzimático-gravimétrico), umidade (método gravimétrico), cinzas e sólidos solúveis. Todas estas análises foram realizadas na primeira semana de estocagem.

Para se avaliar a pós-acidificação dos leites fermentados, a cada sete dias de armazenamento refrigerado, foram realizadas as determinações de pH (em potenciômetro

segundo as recomendações do fabricante) e de acidez total titulável (% de ácido láctico) pelo método potenciométrico em titulador automático (Metrohm Modelo 785 DMP Titrimo) com uma solução de 0,1 M de NaOH.

4.4.5 Extrato para determinação de compostos fenólicos e capacidade antioxidante

A extração dos compostos fenólicos foi realizada utilizando-se metanol acidificado (HCl concentrado, 0,1 g.100ml⁻¹), segundo Karaaslan et al. (2011), com modificações. Para cada 1,5 g de bebida fermentada adicionou-se 6 ml de metanol acidificado. As amostras foram mantidas em repouso durante a noite à 4 ± 1 °C. Em seguida, foram centrifugadas a 4000 rpm, sob refrigeração (4 ± 1 °C) durante 15 minutos. O sobrenadante foi armazenado em um balão volumétrico de 25 ml. Ao precipitado foi adicionado 6 ml de metanol acidificado e as amostras foram novamente centrifugadas nas mesmas condições. O procedimento foi repetido mais duas vezes até se obter um volume final de 24 ml. As amostras foram mantidas à -16 ± 1 °C e utilizadas para determinação do teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante.

4.4.6 Compostos fenólicos totais

A determinação dos compostos fenólicos totais foi realizada conforme o método espectrofotométrico proposto por Singleton e Rossi (1965), modificado por Georgé et al. (2005) e os resultados obtidos foram expressos em equivalente de ácido gálico.

4.4.7 Antocianinas totais

As antocianinas cianidina-3-glicosídeo e delphinidina-3-glicosídeos nos leites fermentados foram determinadas por meio de cromatografia utilizando um Cromatógrafo de Alta Eficiência Waters[®] Alliance 2695, detector de arranjo de diodos Waters[®] 2996, coluna Thermo Scientific C₁₈ BDS (100mm x 4,6mm; 2,4µm) e o modo de eluição utilizado foi gradiente com acetonitrila e ácido fórmico. A padronização externa foi realizada utilizando padrões isolados no laboratório da Embrapa Agroindústria de Alimentos segundo Santiago et al. (2010).

4.4.8 Capacidade antioxidante

A determinação da capacidade antioxidante foi realizada pelos métodos ABTS⁺ e ORAC. No método ABTS⁺ proposto por Serpen et al. (2007) os resultados obtidos foram expressos como equivalente de mmol Trolox por grama de amostra. Seguido o método de ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity), os resultados foram expressos em Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) baseado na metodologia descrita por Zuleta et al. (2009).

4.4.9 Cor instrumental

A análise instrumental de cor foi realizada utilizando-se um colorímetro Color Quest XE, com escala CIELAB e CIELCh. Foi utilizada uma abertura de 25mm de diâmetro, iluminante D65/10 e determinados os parâmetros de L* (luminosidade), a* (-80 até zero = verde, do zero ao +100 = vermelho) e b* (-100 até zero = azul, do zero ao +70 = amarelo) segundo FERNANDES et al. (2010).

4.4.10 Análise estatística

O experimento foi conduzido em triplicata, ou seja, foram processados e analisados três lotes dos leites fermentados probióticos (F1 e F2) . Os resultados apresentados são de médias e desvio padrão.

Todas as análises foram realizadas em duplicata ou triplicata. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e realizado teste de t de *Student* para comparação das médias, ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico SAS[®] versão 8.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, 24 kg de jabuticaba foram submetidos a etapa de despulpamento, conforme descrito no item 4.2.1, e obtidos 9 kg de casca. O rendimento calculado conforme a **Equação 1** foi de 37,5%. As cascas passaram pela etapa de secagem e foram obtidos 1,915 kg de casca seca. O rendimento calculado conforme a **Equação 2** foi de 21,3%.

A casca de jabuticaba foi triturada, transformada em farinha (FCJ) e analisada, e em seguida utilizada na formulação do leite fermentado probiótico para avaliar seu potencial bifidogênico e impacto nas características físicas, químicas e microbiológicas.

5.1 Composição da farinha da casca de jabuticaba

De acordo com as análises realizadas, observou-se que a farinha da casca de jabuticaba (FCJ) possui 26,20 g/100 g de fibras alimentares, sendo este seu principal componente. Segundo a Resolução RDC n.º 54, de 12 de novembro de 2012, do Ministério da Saúde, alimentos que tenham no mínimo 6% de fibras podem ser classificados como tendo “alto conteúdo de fibras” (BRASIL, 2012). Sendo assim, a FCJ desidratada pode ser considerada como um ingrediente com alto teor de fibras alimentares.

Ferreira et al. (2012) encontrou um valor de fibras totais inferior (15,25%) ao observado neste estudo. Enquanto que Leite-Legatti et al. (2012) estudando a FCJ liofilizada encontraram teores de fibras totais de 25%, valor próximo ao encontrado nesta pesquisa.

De acordo com a legislação brasileira, as farinhas podem conter teor de umidade máximo de até 15% (BRASIL, 2005). Desta forma, a FCJ analisada está em conformidade com a referida legislação, pois apresenta 6,19 g/100g (6,19%) de umidade.

Todos os pesquisadores citados a seguir encontraram valores de umidade superiores ao observado nesta pesquisa. Zago (2014) caracterizou a farinha da casca da jabuticaba e encontrou 11,1% de umidade, enquanto Boari Lima et al. (2008) observaram 12,05% e Leite-Legatti et al. (2012), encontraram 15,33% de umidade na FCJ. Alves et al. (2014) estudaram o comportamento da umidade da FCJ desidratada ao longo de 12 meses de estocagem e verificaram um aumento significativo no teor de umidade, que variou de 9,28% para 14,01%.

A FCJ também apresentou uma baixa atividade de água (Aa) de 0,40. Este valor encontra-se abaixo do limite máximo para que um alimento seja considerado seguro, quando a

Aa é menor que 0,60 não ocorre a multiplicação de microrganismos no produto (CHISTE et al., 2006).

Nesta pesquisa a FCJ apresentou um pH de 3,42 e por isso poderia ser classificada como um ingrediente ácido. Valores semelhantes foram encontrados por Zago (2014), Lima et al. (2008) e Lima (2009) de 3,90, 3,47, e 3,39, respectivamente.

O valor de acidez titulável (% em ácido cítrico) encontrado neste estudo foi de 6,61%, muito superiores aos encontrados por Zago (2014) e Lima et al. (2008) que encontraram 1,55% e 1,37%, respectivamente.

Com relação à análise de tamanho das partículas da amostra de FCJ, observou-se que o tamanho médio das partículas foi de 80,8 μm , cerca de 60% das partículas passaram em uma abertura de 79,63 μm . Como a FCJ apresentou partículas menores que 500 μm em massa, pode ser classificada como pó.

A cor da FCJ foi determinada por meio de um colorímetro que determinou as coordenadas cromatográficas: L* (44,97 \pm 0,30), a*(9,27 \pm 0,28) e b* (1,68 \pm 0,11). Devido ao valor de h_{ab} calculado de 10,28 \pm 0,37, a FCJ pode ser classificada como tendo coloração roxa. Alves et al. (2014) encontraram valores de L* de 37,10 inferior ao encontrado neste estudo. A luminosidade pode ser influenciada pelo tempo e temperatura de desidratação da amostra, ou seja, provavelmente as condições de processamento favoreceram o escurecimento da FCJ.

Os resultados das análises microbiológicas da FCJ com relação à contagem de coliformes termotolerantes e coliformes totais foram inferiores a 3 UFC/g. A contagem de bolores e leveduras foi de 1.0×10^3 UFC/g, abaixo do limite máximo (10^4 UFC/g) permitido pela legislação brasileira. Estes resultados evidenciaram as boas condições higiênico-sanitárias de processamento da FCJ. Sendo assim, pode-se afirmar que as condições de pré-processamento, desidratação e armazenagem da farinha foram adequadas, sendo a FCJ um ingrediente seguro para utilização na formulação de alimentos.

5.1.1 Compostos bioativos

A FCJ apresentou teores elevados de compostos fenólicos (544,37 \pm 6,84 mg de ácido gálico/100 g) e antocianinas totais (601,88 \pm 15,61 mg/100 g). Também foi observada uma elevada capacidade antioxidante por meio dos métodos de ABTS⁺ (1084,12 \pm 61,55 μmol

trolox/ g) e ORAC ($438,05 \pm 7,43$ $\mu\text{mol trolox/ g}$). Os altos teores de compostos fenólicos e antocianinas são compatíveis com a elevada capacidade antioxidante observada.

Alves et al. (2011) analisaram o teor total de antocianinas na FCJ desidratada a temperatura de $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ e encontraram valores de 646 mg/100 g , valor ligeiramente superior ao encontrado nesta pesquisa.

Araújo et al. (2013) avaliaram também os compostos fenólicos da casca da jabuticaba desidratada a mesma temperatura, observaram valor inferior de 403 mg de ácido gálico/ 100 g de amostra. Porém, ao determinarem a capacidade antioxidante destas amostras pelo método ABTS⁺, encontraram $1017,8\text{ } \mu\text{mol trolox/g}$, valor semelhante ao observado neste estudo (ARAÚJO et al., 2013).

Provavelmente a baixa temperatura de desidratação utilizada no processamento da FCJ ($45\text{ }^{\circ}\text{C}$), contribuiu para conservar os compostos fenólicos, as antocianinas e manter elevada a capacidade antioxidante. Segundo Leonid et al. (2006), alguns nutrientes, como os compostos bioativos e os pigmentos são sensíveis ao processamento térmico.

O departamento de agricultura dos Estados Unidos publicou uma lista da atividade antioxidante de 277 alimentos determinada pelo método de ORAC (HAYTOWITZ et al., 2010). Os elevados valores dos compostos fenólicos encontrados em diversas frutas são responsáveis pela elevada capacidade antioxidante (BAHRAMIKIA; ARDESTANI; YAZDANPARAST, 2009; SAHREEN; KHAN; KHAN, 2010; BARROS; FERREIRA; GENOVESE, 2012).

5.2 Caracterização dos leites fermentados F1 e F2

Os resultados médios calculados das análises físicas químicas dos leites fermentados F1 e F2 podem ser observados na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Características físicas químicas dos leites fermentados F1 e F2.

	F1	F2
Carboidratos (g/100 g)	3,68 ^a	5,43 ^b
Proteína (g/100 g)	2,91 ^a	2,91 ^a
Lipídeos (g/100 g)	2,52 ^a	2,08 ^a
Fibras alimentares (g/100 g)	NQ	NQ
Umidade (g/100 g)	90,71 ^a	89,42 ^b
Cinzas (g/100 g)	0,60 ^a	0,58 ^a
Sólidos solúveis (°Brix)	4,5 ^a	5,5 ^a

Letras minúsculas diferentes sobrescritas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações F1 e F2.

NQ: quantidade abaixo do limite de quantificação.

O teor de carboidratos calculado por diferença foi significativamente ($p < 0,05$) superior em F2, provavelmente devido a adição da FCJ. Verificou-se que a adição da FCJ também diminuiu o teor de umidade do leite fermentado significativamente ($p < 0,05$), provavelmente devido a elevada capacidade de absorção de água da FCJ.

O valor de fibras alimentares ficaram abaixo do limite mínimo de quantificação do método utilizado, ou seja, mesmo adicionando 2% da FCJ (com elevado teor de fibras), isto não impactou no teor de fibras do produto final.

Os leites fermentados avaliados estão em conformidade com a legislação vigente, quanto ao teor de proteínas, que estabelece um mínimo de 2,9 g/100 g, para leites fermentados (BRASIL, 2007). O teor de proteínas não foi influenciado pela adição da FCJ.

Em relação ao teor de gordura, não foi observado diferença significativa ($p > 0,05$) e os leites fermentados F1 e F2 podem ser classificados como semidesnatados, devido ao teor de gordura estar entre 2,9 e 0,6% (BRASIL, 2007).

A Instrução Normativa n° 46, de 2007, não faz menção ao teor de cinzas. Não houve diferença significativa quanto ao teor de cinzas e teor de sólidos solúveis ($p > 0,05$).

5.2.1 Compostos bioativos

Os resultados das concentrações dos compostos fenólicos, antocianinas totais e capacidade antioxidante dos leites fermentados probióticos F1 e F2, avaliados na primeira e na quarta semana de armazenamento refrigerado, foram apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Resultados das concentrações de compostos fenólicos, antocianinas e capacidade antioxidante nas amostras de leite fermentado F1 e F2. Valores médios \pm desvio padrão.

Amostra	Semana	Compostos fenólicos (mg de ácido gálico/100 g)	Antocianinas (mg/100 g)		Capacidade antioxidante (μ mol trolox/ g)	
			D3	C3	ABTS ⁺	ORAC
F1	1	25,06 ^{aA} \pm 0,08	ND	ND	144,31 ^{aA} \pm 12,25	5,17 ^{aA} \pm 0,75
	4	12,28 ^{cB} \pm 0,35	ND	ND	163,68 ^{cA} \pm 11,10	3,83 ^{cA} \pm 0,58
F2	1	62,78 ^{bA} \pm 0,36	0,12	1,83 ^A \pm 0,1	286,56 ^{bB} \pm 15,15	9,29 ^{bA} \pm 0,66
	4	32,71 ^{dB} \pm 0,92	ND	0,27 ^B \pm 0,0	292,00 ^{dB} \pm 11,25	6,35 ^{dB} \pm 0,61

D3: Delfinidina-3-glicosídeo; C3: Cianidina-3-glicosídeo; NQ: quantidade abaixo do limite de quantificação.

Letras minúsculas diferentes sobrescritas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações F1 e F2.

Letras maiúsculas diferentes sobrescritas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as semanas de análises.

Observou-se um decréscimo significativo ($p < 0,05$) nos valores de compostos fenólicos para as duas formulações ao longo das quatro semanas de estocagem. Pode-se observar que F2 apresentou um valor de compostos fenólicos significativamente superior ($p < 0,05$) a formulação controle F1.

Comportamento semelhante foi relatado por Vieites et al (2011) ao estudar a jabuticaba e Chouchouli et al (2013) ao estudar iogurte com extrato de semente de uva. Enquanto Cipriano (2011) observou valores inferiores aos relatados nesta pesquisa ao estudar uma bebida isotônico com casca de jabuticaba, e Freire et al (2017) encontraram valores superiores ao estudar um leite fermentado com extrato de casca de uva.

Os ácidos fenólicos tem atividade antioxidante provavelmente devido à ocorrência de um grupo carboxila facilmente ionizável na sua estrutura, que é um eficiente doador de hidrogênio (PALAFOX-CARLOS; YAHIA; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2012).

Com relação aos resultados da análise de cromatografia das antocianinas cianidina-3-glicosídeo e delfinidina-3-glicosídeos foram os principais metabólitos secundários identificados. Observou-se que em F1 não foi detectado a presença de antocianinas cianidina-3-glicosídeo e delfinidina-3-glicosídeos. Na primeira semana de estocagem, na formulação F2 foi identificado a presença dos dois metabólitos secundários. A cianidina-3-glicosídeo apresentou uma redução na concentração significativa ($p < 0,05$) em relação a quarta semana. Estes resultados são semelhantes aos relatados por Lima et al (2011) e Araújo (2011).

Com relação aos resultados da capacidade antioxidante das duas formulações observa-se que, os dois métodos utilizados (ORAC e ABTS⁺), tiveram comportamento semelhante. Na

formulação F2, para os dois métodos, foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) da capacidade antioxidante possivelmente devido a adição da FCJ.

Foi observado que utilizando-se o método ABTS⁺ não houve diferença significativa para nenhuma das duas formulações com relação ao tempo de estocagem. E na utilizando o método ORAC foi observada uma redução significativa ($p > 0,05$) ao longo do período de quatro semanas de estocagem. A vantagem da utilização desta metodologia ocorre devido ao menor erro de interferência dos compostos coloridos presentes na amostra devido ao uso da fluorescência como medida do dano oxidativo, fator importante quando se analisa alimentos que possuem cor (especialmente frutos) (SUCUPIRA et al., 2012). Chouchouli et al (2013) também observaram comportamento semelhante em seus estudos.

5.2.2 Cor instrumental

Os parâmetros de cor instrumental L*, a* e b* foram influenciados significativamente ($p < 0,05$) pela adição da farinha de casca de jabuticaba, como pode ser observado na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Parâmetros de cor dos leites fermentados F1 e F2 armazenados refrigerado durante o período de 4 semanas. Valores médios \pm desvio padrão.

Amostra	Semanas	L*	a*	b*
F1	1	84,00 ^{aA} \pm 1,23	2,34 ^{aA} \pm 0,52	12,18 ^{aA} \pm 0,97
	2	84,19 ^{aA} \pm 1,41	2,21 ^{aA} \pm 0,37	12,50 ^{aA} \pm 0,72
	3	84,38 ^{aA} \pm 1,36	2,07 ^{aA} \pm 0,49	12,46 ^{aA} \pm 0,74
	4	84,52 ^{aA} \pm 1,47	1,87 ^{aA} \pm 0,73	12,54 ^{aA} \pm 0,78
F2	1	57,58 ^{bB} \pm 2,84	5,80 ^{bB} \pm 0,87	4,99 ^{bB} \pm 0,50
	2	58,05 ^{bB} \pm 3,17	5,62 ^{bB} \pm 0,79	5,39 ^{bB} \pm 0,27
	3	58,61 ^{bB} \pm 2,43	5,50 ^{bBC} \pm 0,79	6,19 ^{bC} \pm 0,40
	4	59,07 ^{bB} \pm 2,23	5,50 ^{bC} \pm 0,81	6,62 ^{bC} \pm 0,25

Onde L* significa luminosidade, a* e b* são as coordenadas de cromaticidade.

Letras minúsculas diferentes sobrescritas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações F1 e F2.

Letras maiúsculas diferentes sobrescritas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as semanas de análises.

Foi possível notar que para na formulação F1 não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) nos valores dos parâmetros L*, a* e b* ao longo das quatro semanas de armazenagem. O parâmetro L*, que referente à luminosidade, apresentou valores elevados em F1 e se manteve estável ($p > 0,05$) durante toda a estocagem. Segundo Nozière et al. (2006), a

característica da cor branca ocorre devido à dispersão das micelas de caseína, fosfato de cálcio e dos glóbulos de gordura responsáveis pela difusão da luz incidente, com maior refletância, elevando os valores de L^* .

Na formulação F2, também não se observou diferença significativa ao longo do tempo de armazenagem para luminosidade (L^*). Enquanto que, para a coordenada a^* houve uma diminuição significativa entre a primeira (5,80) e a última semana (5,50). E na coordenada b^* houve um aumento significativo a partir da terceira semana de estocagem.

Comparando a F1 com a F2, verifica-se que a L^* é muito mais alto em F1 que em F2, ou seja, a formulação controle tem uma luminosidade muito superior a F2 devido a adição da farinha que torna o produto mais escuro. A coordenada a^* é consideravelmente menor em F1 do que em F2 e com relação a coordenada b^* observa-se o contrário, a F1 é maior que a F2.

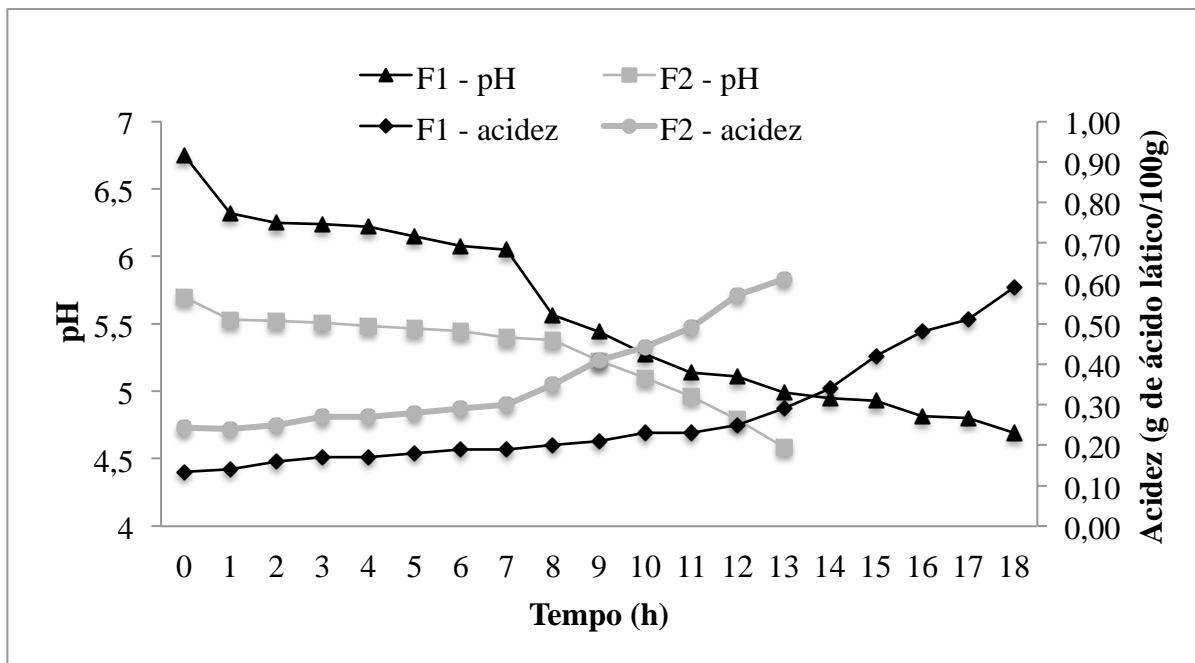
Pode-se observar que a adição de FCJ em F2 elevou significativamente ($p < 0,05$) o parâmetro a^* quando comparada a F1 e por esta razão a formulação F2 tende a coloração vermelha. De acordo com a escala, quando a^* é positivo indica aproximação ao vermelho e negativo indica ao verde (HUNTERLAB, 2008). Os valores encontrados foram sempre positivos, indicando variação de cor, em direção ao vermelho.

Os valores de b^* se apresentaram sempre positivos, porém sem diferença significativa ($p > 0,05$) na formulação F1 durante o período de armazenamento. Os valores de b^* de F2 são significativamente ($p < 0,05$) menores que F1. Durante o período de armazenamento de F2 ocorreu um aumento significativo do b^* ($p < 0,05$) indicando uma tendência ao amarelamento.

5.3 Resultados microbiológicos dos leites fermentados F1 e F2

A **Figura 4** apresenta a curva de fermentação das formulações dos leites fermentados probióticos F1 e F2, com a determinação do pH e acidez titulável (% de ácido láctico) em função do tempo.

Figura 4 - Curva de fermentação (pH e acidez titulável) dos leites fermentados probióticos F1 e F2 em função do tempo.



Os valores de pH e acidez total foram aferidos de hora em hora, durante a fermentação, a partir da inoculação da cultura probiótica. A fermentação do leite fermentado probiótico F1 ocorreu em 18 horas, enquanto F2 fermentou em 13 horas, ocorrendo uma redução de 5 horas. Verificou-se que a FCJ provocou uma acidificação imediata no leite, ocasionando uma diminuição do pH inicial para 5,7 e acelerando a fermentação.

Um longo período de fermentação do leite por bifidobactérias é comum, e já foi anteriormente relatado por Herzallah (2005) e Casarotti et al. (2014).

Durante a fermentação, a formulação F1 reduziu o pH de 6,75 a 4,69 (pH final após 18 horas de fermentação) e na F2 o pH reduziu de 5,70 a 4,59. Já os valores de acidez aumentaram de 0,13% a 0,59% em F1 e de 0,24% para 0,61% em F2. A redução do pH é resultado da produção de ácido láctico em função da degradação da lactose que ocorre durante a fermentação, causando a desestabilização das micelas de caseína e, conseqüentemente, a coagulação do leite, que ocorre em um pH de 4,6 (ponto isoelétrico da caseína).

5.3.1 pH e acidez titulável

Durante o período de quatro semanas de estocagem refrigerado (4 °C) dos leites fermentados probióticos, os valores de pH foram afetados observando-se um decréscimo,

conforme apresentados na **Tabela 4**. Este comportamento indica que houve uma possível pós-acidificação dos produtos, processo natural ocasionado pela contínua produção de ácido láctico e outros ácidos orgânicos devido ao metabolismo da *B. lactis*.

Tabela 4 – Valores de pH das formulações F1 e F2. Valores médios \pm desvio padrão.

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
F1	5,07 ^{aA} \pm 0,00	5,03 ^{aAB} \pm 0,01	4,97 ^{aBC} \pm 0,02	4,88 ^{aC} \pm 0,01
F2	4,85 ^{bA} \pm 0,02	4,79 ^{bB} \pm 0,00	4,73 ^{bC} \pm 0,01	4,69 ^{bD} \pm 0,0

Letras minúsculas diferentes sobrescritas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações F1 e F2.

Letras maiúsculas diferentes sobrescritas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as semanas de análises.

Para as duas formulações foi observada uma pós-acidificação significativa ($p < 0,05$), mas nos dois casos a queda do pH é pequena. Já o pH inicial, de ambas as formulações, apresentou diferença significativa ($p < 0,05$). Quando comparadas F1 e F2, verificou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre elas nos valores de pH em todas as semanas ao longo do período de armazenamento.

Estudos mostraram que durante o armazenamento refrigerado o pH do leite fermentado probiótico pode sofrer uma queda e isso pode refletir mudanças em um grau maior ou menor, dependendo da temperatura e do tempo de armazenamento e a atividade pós-acidificante das culturas (DONKOR et al., 2006). O pH altera a estrutura e pode afetar a e textura por interferir nas interações químicas entre os componentes estruturais, como proteína, água e minerais do produto (BURITI et al., 2007).

Os valores de pH em torno de 5,0 são próximos aos observações por Gomes e Malcata (1999) na fermentação de leites por bifidobactérias, e com as afirmações de Dave e Shah (1996) sobre a reduzida capacidade de acidificação destes microrganismos durante a estocagem refrigerada. Mattila-Sandholm et al. (2002) também afirmaram que a capacidade de produção de ácidos orgânicos pelas bifidobactérias em leite é limitada, o que explica os valores de pH observados nesta pesquisa. O baixo pH inicial de F2 se deve a adição de 2% de FCJ.

Os valores de acidez titulável (% ácido láctico) de F1 e F2 estão apresentados na **Tabela 5**. Estes valores estão de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2007). A acidez titulável (% de ácido láctico) de F1 apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado a F2 durante todo o período de armazenamento. Na média, a acidez de F2 foi 64% superior a F1.

Tabela 5 – Acidez titulável (% ácido lático) de F1 e F2. Valores médios \pm desvio padrão.

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
F1	0,64 ^{aA} \pm 0,06	0,66 ^{aA} \pm 0,06	0,68 ^{aA} \pm 0,06	0,74 ^{aA} \pm 0,04
F2	1,02 ^{bA} \pm 0,03	1,06 ^{bAB} \pm 0,03	1,07 ^{bAB} \pm 0,03	1,09 ^{bB} \pm 0,01

Letras minúsculas diferentes sobrescritas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações F1 e F2.

Letras maiúsculas diferentes sobrescritas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as semanas de análises.

Em F1 não foi observado variação significativa ($p > 0,05$) nos valores de acidez titulável durante o período de estocagem, enquanto F2 apresentou mudança significativa ($p < 0,05$) a partir da terceira semana de estocagem em refrigeração. Resultados semelhantes foram observados por Donkor et al. (2006) com relação ao comportamento de F1.

Observou-se uma leve pós-acidificação nas duas formulações de leites fermentados probióticos. Segundo Almeida, Bonassi e Roça (2001) o aumento da acidez ocorre pela ação das bactérias lácticas e produção de ácido lático durante o armazenamento refrigerado, fenômeno conhecido como pós acidificação.

Os leites fermentados estão sujeitos ao decréscimo de pH e aumento da acidez durante a estocagem refrigerada, isso devido à atividade das bactérias durante a estocagem do produto.

5.3.2 Segurança microbiológica

Logo após o processamento (primeira semana), as amostras foram submetidas às análises microbiológicas de quantificação de coliformes totais, termotolerantes, contagem de bolores e leveduras e contagem de bifidobactérias. Os resultados de quantificação de coliformes totais ($< 10^3$ UFC/g), termotolerantes ($< 10^3$ UFC/g) e de bolores e leveduras ($< 10^3$ UFC/g) estavam abaixo do máximo permitido pela legislação evidenciando as boas condições higiênico-sanitárias do processamento.

E a contagem elevada de *B. lactis* mostrou a inoculação e fermentação adequadas, sendo contagem alta suficiente para permitir que os leites fermentados possam ser potencialmente probióticos. Na **Tabela 6** é possível observar a contagem ao longo das quatro semanas de estocagem.

Semanalmente foram realizadas as contagens de bolores e leveduras e a contagem de bifidobactérias. O aumento da contagem de bolor e leveduras foi o que determinou o final da

vida útil das duas formulações. Na quarta semana de análise ambas as formulações, atingiram uma contagem superior a 2×10^2 UFC/g, contagem máxima permitida pela legislação vigente, tornando os produtos impróprios para o consumo.

Por esta razão, o tempo de vida útil dos leites fermentados probióticos foi de três semanas, mesmo as contagens de *B. lactis* ainda estarem elevadas. Os valores de pH e acidez encontravam-se também de acordo com a legislação vigente até o final da vida útil dos produtos (BRASIL, 2007).

No Brasil, não é permitida a adição direta de conservantes nos leites fermentados, porém é permitida a adição de conservantes nos preparados de frutas naturais e nas misturas artificiais de aromatizantes/saborizantes adicionados aos leites fermentados (BRASIL, 2007). Os conservantes são eficientes no controle de bolores e leveduras nos leites fermentados aumentando a vida útil destes produtos.

5.3.3 Contagem de células viáveis de *Bifidobacterium lactis* BB-12

Os resultados referentes às contagens de células viáveis de *B. lactis* nos leite fermentado F1 e F2, durante quatro semanas de estocagem refrigerada, se encontram na **Tabela 6**.

Tabela 6 – Contagem de células viáveis de *B. lactis* (log UFC/g) nas amostras F1 e F2 durante o período de quatro semanas de armazenamento refrigerado (4°C).

Amostras	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
F1	8,47 ^{aA}	8,16 ^{aA}	7,36 ^{aAB}	6,73 ^{aB}
F2	9,64 ^{bA}	8,76 ^{aB}	8,73 ^{bB}	7,28 ^{bC}

Letras minúsculas diferentes sobrescritas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações F1 e F2.

Letras maiúsculas diferentes sobrescritas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as semanas de análises.

A cultura BB-12 apresentou alta viabilidade ao longo do período de armazenamento refrigerado de quatro semanas dos produtos, sendo suficientemente alta para que os produtos possam ser potencialmente probióticos, promovendo efeitos benéficos à saúde do consumidor e, portanto, este produto poderia ter uma alegação funcional de probiótico de acordo com a legislação brasileira vigente. Comportamento semelhante foi relatado por Kailasapathy, Harmstorf e Phillips (2008).

A amostras F1 e F2 obtiveram contagens médias de *B. lactis* nos valores de 8,47 e 9,64 log UFC/g, respectivamente, na primeira semana de estocagem. Ao final das quatro semanas

de armazenamento refrigerado, o número de células viáveis reduziu significativamente ($p < 0,05$) em 6,73 (F1) e 7,28 (F2) log UFC/g. Estas reduções podem ter ocorrido devido à permeação de oxigênio através da embalagem ou acidificação do produto (FERREIRA; TESHIMA, 2000).

Também pode-se observar que a farinha de casca de jabuticaba apresentou influência positiva na viabilidade das *B. lactis*, uma vez que ao longo do período de estocagem as maiores contagens de bifidobactérias ocorreram em F2. As contagens de *B. lactis* foram significativamente mais altas que F1 em todas as semanas. Segundo Ranadheera et al. (2012), o aumento da viabilidade das bactérias pode ser atribuído a disponibilidade de diferentes compostos existentes nos frutos.

5.3.4 Simulação *in vitro* da passagem pelo sistema gastrointestinal

Os resultados das contagens de células viáveis de *B. lactis* em F1 e F2, após a exposição às condições que simulam a passagem pelo sistema gastrointestinal realizadas na primeira e na quarta semana de armazenamento podem ser observadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Contagem de células viáveis de *B. lactis* (log UFC/g) em F1 e F2 nas diferentes etapas da simulação da passagem pelo sistema gastrointestinal realizadas na primeira semana de análise e na quarta semana. Valores médios \pm desvio padrão

Etapas	Semana 1		Semana 4	
	F1	F2	F1	F2
Inicial	8,50 ^{aA} \pm 0,20	9,09 ^{bA} \pm 0,09	6,62 ^{aA} \pm 0,61	8,16 ^{bA} \pm 0,30
Gástrica	7,39 ^{aB} \pm 0,31	8,00 ^{aB} \pm 0,00	6,36 ^{aA} \pm 0,09	7,54 ^{aAB} \pm 0,71
Entérica 1	8,69 ^{aA} \pm 0,15	8,34 ^{bB} \pm 0,14	7,08 ^{aAB} \pm 0,23	7,34 ^{bB} \pm 0,24
Entérica 2	7,63 ^{aB} \pm 0,15	8,35 ^{aBC} \pm 0,05	6,51 ^{aAC} \pm 0,11	7,45 ^{bB} \pm 0,32

Letras minúsculas diferentes sobrescritas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações F1 e F2.

Letras maiúsculas diferentes sobrescritas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as etapas da simulação da passagem pelo sistema gastrointestinal.

No início do experimento (semana 1) e no final (semana 4) foram realizadas as simulação *in vitro* da passagem do produto pelo sistema gastrointestinal. No tempo inicial, antes da exposição às condições experimentais, as contagens de células viáveis de *B. lactis* de F1 e F2 eram de 8,50 e 9,09 log UFC/g, respectivamente. Ao final das etapas de simulação da passagem pelo sistema gastrointestinal da semana 1, foi observada uma redução significativa ($p < 0,05$) do número de células viáveis, F1 e F2 apresentaram, respectivamente, contagens de

7,63 e 8,35 log UFC/g. Na quarta semana de análise, no início a população era de 6,62 e 8,16 em F1 e F2, respectivamente, e no final observou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) em F2.

A taxa de sobrevivência calculadas na primeira semana da simulação *in vitro* da passagem do produto pelo sistema gastrointestinal para F1 foi de 89,76% e para F2 foi de 91,86%. Na quarta semana de análise aumentaram para 98,33% em F1 e 91,30% em F2.

Após a exposição das amostras à etapa gástrica, a contagem de células viáveis sofreu uma diminuição significativa ($p > 0,05$) na primeira semana de análise para ambas as formulações F1 e F2, indicando uma possível sensibilidade do probiótico ao pH de 2,3 a 2,6 simulado no estômago. Por outro lado, a análise realizada na quarta semana, nesta mesma etapa, a contagem de células viáveis para F1 e F2, sofreram uma redução de 0,26 e 0,62 log UFC/g, respectivamente, com relações as células viáveis no início da simulação gastrointestinal. Apenas F1 apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) de 1,03 log UFC/g entre a simulação realizada na primeira e na quarta semana.

Comportamento semelhante foi relatado por Schillinger, Guigas e Holzapfel (2005) e Verruck et al. (2015). A capacidade de suportar o estresse digestivo causado pelos baixos valores de pH é uma das características mais importantes dos probióticos incorporados aos alimentos com êxito (MEIRA et al., 2015).

A etapa seguinte simulou a fase entérica 1 (passagem do alimento pelo duodeno), que compreende a exposição aos sais biliares, à pancreatina e um pH de 5,4 a 5,7. Foi observado que a contagem de *B. lactis* aumentou ligeiramente ($p < 0,05$) em F1 na primeira e na quarta semana da análise. Madureira et al. (2011), sugere que este aumento na sobrevivência das células viáveis pode ser atribuído à uma recuperação de células injuriadas nas etapas anteriores. O aumento do pH que ocorre nesta etapa favorece a sobrevivência das bifidobactérias (BOYLSTON et al., 2004).

Na etapa posterior que simulou a fase entérica 2 (passagem do alimento pelo íleo), Não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) em F1 com relação as células viáveis na primeira e na última semana. Entretanto, a F2 apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) no número de células viáveis. De acordo com Madureira et al. (2011), este comportamento pode ser atribuído a neutralidade do pH de 6,8 a 7,2 desta etapa, que favorece a recuperação das células injuriadas. Ao comparar a análise realizada na primeira com a quarta semana, verificou-se que ambas as formulações apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) de 1,12 e 0,9 log UFC/g, respectivamente. Ou seja, a redução em F2 foi significativamente ($p < 0,05$)

menor, sugerindo que a FCJ teve um impacto positivo na manutenção e/ou sobrevivência da bactéria probiótica *B. lactis*.

Ao comparar a simulação realizada na primeira e na quarta semana de estocagem do produto, verificou-se que as formulações inicialmente (tempo zero) apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) na contagem de células viáveis entre si. Observou-se que F2 iniciou com uma contagem de 6,5% a mais na primeira e de e 18,8% na quarta semana quando comparadas à formulação controle. Ao final da quarta semana se estocagem as formulações F1 e F2 apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) de 1,61 e 1 log UFC/g, respectivamente. De qualquer forma, todas as amostras apresentaram contagem de células viáveis superiores ao mínimo requerido a um leite fermentado com *Bifidobacterium* pela atual legislação brasileira, que exige no caso destas bactérias uma contagem mínima de 6 log UFC/g (BRASIL, 2007).

6 CONCLUSÃO

A farinha de casca de jabuticaba, processada e utilizada nesta pesquisa, apresentou elevado teor de fibras, baixa atividade de água e elevada acidez. Devido aos elevados teores de compostos fenólicos e de antocianinas, além de a alta capacidade antioxidante, conclui-se que a FCJ é um ingrediente interessante para ser utilizado na indústria de alimentos em diferentes produtos alimentícios para agregar valor nutritivo e conferir cor.

Ao ser adicionada ao leite fermentado probióticos, a FCJ apresentou um impacto positivo no tempo de fermentação do leite, reduzindo em cinco horas, ou seja, reduziu 19% o período de fermentação.

A FCJ também interferiu positivamente na proteção da *B. lactis*, impedindo que sofressem maiores injúrias ao durante o ensaio da simulação *in vitro* da passagem pelo trato gastrointestinal do produto. Exceto na fase entérica 1, em todas as outras etapas a contagem de *B. lactis* ficou sempre um log acima da formulação controle.

Foi possível observar que a FCJ também teve influência positiva na viabilidade das *B. lactis* ao longo do período de armazenamento refrigerado. As contagens de *B. lactis* foram significativamente ($p < 0,05$) superiores, em torno de um log, em relação a formulação controle. Ao longo de quatro semanas de estocagem sob refrigeração houve um decréscimo da contagem de *B. lactis*, porém, permaneceram elevadas o suficiente ($> 10^6$ UFC/ml) estando de acordo com a legislação brasileira vigente. Este resultado indica que a FCJ teve um impacto positivo na manutenção do probiótico ao longo da vida útil.

Durante o período de estocagem os leites fermentados F1 e F2 apresentaram uma ligeira pós acidificação, porém, até o final da vida útil a acidez permaneceu dentro dos limites estabelecidos pela legislação, não comprometendo as características do produto.

Os leites fermentados probióticos F1 e F2 apresentaram uma vida útil de três semanas devido elevada contagem de bolores e leveduras, apesar da contagem de *B. lactis* permanecer acima do mínimo exigido pela legislação vigente até a quarta semana de estocagem.

A FCJ aumentou significativamente ($p < 0,05$) o teor de carboidrato e diminuiu significativamente ($p < 0,05$) o teor de umidade de F2 comparado a F1. Os leites fermentados F1 e F2 podem ser classificados como semidesnatados.

O leite fermentado probiótico adicionado de farinha de casca de jabuticaba apresentou elevado teor de compostos fenólicos e antocianina (Delfinidina-3-glicosídeos 0,12 mg/100g e Cianidina-3-glicosídeo 1,83 mg/100g). Ao longo de quatro semanas de estocagem observou-

se uma redução de 47,9% no teor de compostos fenólicos. Com relação as antocianinas, após quatro semanas de estocagem a delphinidina-3-glicosídeos não foi detectada e houve uma redução de 85,2% da cianidina-3-glicosídeo.

Ao longo da vida útil do produto observou-se uma elevada capacidade antioxidante, sendo que não houve diferença significativa quando foi utilizado o método ABTS⁺. Porém, utilizando-se o método ORAC, observou-se uma redução de 46,3% na atividade antioxidante ao longo de quatro semanas de estocagem refrigerada (4 °C).

Considerando o conjunto de resultados, é possível concluir que a adição de 2% de FCJ no leite fermentado com *B. lactis* demonstrou um impacto positivo na multiplicação e preservação deste probiótico. Provavelmente existe algum composto na FCJ que ocasionou um efeito bifidogênico.

Trabalhos futuros sugerem estudos *in vivo* para comprovar o efeito prebiótico do produto desenvolvido e análise sensorial para avaliar a aceitação deste novo produto. Também seria de interesse a identificação do composto presente na casca da jabuticaba que tem esse efeito bifidogênico

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC INTERNATIONAL. Particle size of wheat flour by laser instrument. **Approved Methods of Analysis**, 11 ed. St. Paul: AACC International, 2010.

AIT-AISSA, A.; AIDER, M. Lactulose: production and use in functional food, medical and pharmaceutical applications. Practical and critical review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 1245- 1253, 2014.

AKISSOÉ, N. H. et al. Cross-cultural acceptance of a traditional yoghurt-like product made from fermented cereal. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, p. 1876-1884, 2014.

ALEZANDRO, M. R. et al. Comparative study of chemical and phenolic compositions of two species of jaboticaba: *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg and *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. **Food Research International**, v. 54, p. 468-477, 2013.

ALMEIDA, K. E.; BONASSI, I. A.; ROÇA, R. O. Avaliação sensorial de bebida láctea preparada com diferentes teores de soro, utilizando-se dois tipos de cultura láctea. **Indústria de Laticínio**, v. 32, p. 50-54, 2001.

ALMEIDA, P. L. et al. Effect of jaboticaba peel extract on lipid oxidation, microbial stability and sensory properties of *Bologna*-type sausages during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 110, p. 9-14, 2015.

ALVES, A. P. C. et al. Flour and anthocyanin extracts of jaboticaba skins used as a natural dye in yogurt. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 2007–2013, 2013.

ANTUNES, A. E. C. et al. Desenvolvimento de *buttermilk* probiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 83-90, 2007.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis of the AOAC International. 18th ed. Washington, DC, 2005. AOAC, 2005, rev. 2010.

APHA, AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, 17th Ed., Washington, DC. Editado por WEHR, H.W. e FRANK, J.F., 2004. 570p.

APHA, AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4th Ed., Washington, DC, 2001, 31p.

ARAÚJO, C. R. **Composição Química, Potencial Antioxidante e Hipolipidêmico da Farinha da Casca de *Myrciaria cauliflora* (jaboticaba)**. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Química. Faculdade de Ciências Exatas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2011.

ASQUIERI, E. R.; SILVA, A. G. M.; CÂNDIDO, M. A. Aguardente de jabuticaba obtida da casca e borra da fabricação de fermentado de jabuticaba. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 896-904, 2009.

BARRETO, G. P. M. et al. 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.

BIAVATI, B. et al. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications, **Annals Microbiology**, v. 50, p. 117-131, 2000.

BRASIL, 2002. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 2** de 07/01/2002. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedade funcional e ou de saúde.

BRASIL, 2003. Ministério da Saúde. **Resolução da diretoria colegiada nº 359** de 03/12/2003. Regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional.

BRASIL, 2007. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 46** de 23/10/2007. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados.

BORGES, L. L. et al. Optimization of the spray-drying process for developing jabuticaba waste powder employing response surface methodology. **Journal of Food Process Engineering**, p. 1-9, 2015.

BOYLSTON, et al. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: Challenges and rewards. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 375- 387, 2004.

BÚRIGO, T. et al. Bifidogenic effect of fructooligosaccharides in the intestinal flora of patients with hematological neoplasia. **Revista de Nutrição**, n. 5, v. 20, p. 491-497, 2007.

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

BURITI, F. C. A. et al. Symbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus termophilus*. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1605-1610, 2007.

CASAROTTI, S. N. et al. Influence of the combination of probiotic cultures during fermentation and storage of fermented milk. **Food Research Internacional**, v. 59, p. 67-75, 2014.

CAVALCANTI, R. N.; CRUZ, A. G.; MEIRELES, M. A. A. Extração de Antocianinas de Resíduo de Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) utilizando líquido pressurizado e fluido. **Jornal da UNICAMP**, Campinas, n. 553, 2013.

CHOUCHOULI, V. et al. Fortification of yoghurts with grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 522-529, 2013.

CHR. HANSEN. Method for counting probiotic bacteria. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacteria* in milk products made with nutrish cultures. Horsholm, Dinamarca, 1999. 9p.

CIPRIANO, P. A. **Antocianinas de açaí (*Euterpe oleracea* mart.) e casca de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) na formulação de bebidas isotônicas.** 2011. 131p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, MG, 2011.

COPELAND, L. et al. Form and functionality of starch. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1527-1534, 2009.

COSTA, N. M. B.; BORÉM, A. **Biotecnologia e nutrição: saiba como o DNA pode enriquecer a qualidade dos alimentos.** 1 ed. São Paulo: Nobel, 2003. 215 p.

CRUZ, A. P. G. **Recuperação de compostos bioativos a partir de resíduos da indústria vitivinícola.** Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

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

DENIPOTE, F. G.; TRINDADE, E. B. S. M.; BURINI, R. C. Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon. **Arquivos de Gastroenterologia, Botucatu**, v. 47, p. 93-98, 2010.

DONG, X; CHENG, G; JIAN, W. Simultaneous identification of five *Bifidobacterium* species isolated from human being using multiple PCR primers. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 23, p. 386-390, 2000.

DONKOR, O. N. et al. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1181–1189, 2006.

DUNCAN, S. H.; FLINT, H. J. Probiotics and prebiotics and health in ageing populations. **Maturitas**, v. 75, n. 1, p. 44–50, 2013.

FERNANDES, A. M; SORATTO, R. P; EVANGELISTA, R. M; NARDIN, I. Qualidade físico-química e de fritura de tubérculos de cultivares de batata na safra de inverno. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 299-304, 2010.

FERREIRA, A. E. et al. Produção, caracterização e utilização farinha de casca de jaboticaba em biscoitos tipo *cookie*. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 603-607, 2012.

FERREIRA, C. L. L. F.; TESHIMA, E. Prebióticos. **Biotechnology, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 16, p. 22-25, 2000.

FRANCK, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**, v. 87, n. 2, p. 287-291, 2002.

FREIRE, F. C. et al. Impact of multi-functional fermented goat milk beverage on gut microbiota in a dynamic colon model. **Food Research International**, v. 99, p. 315-327, 2017.

GEORGÉ, S. et al. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1370–1373, 2005.

GIBSON, G. R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v. 17, p. 259-275, 2004.

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

GOMES, R. P. **Fruticultura Brasileira**. Vol. 9. Ed. São Paulo: Nobel, 1983. 446p.

GÓMEZ, B. et al. Prebiotic potential of pectins and pectic oligosaccharides derived from lemon peel wastes and sugar beet pulp: A comparative evaluation. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 108-121, 2016.

GOTTELAND, M.; BRUNSER, O.; CRUCHET, S. Systematic review: are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 23, n. 8, p. 1077-1086, 2006.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 361, p. 512-519, 2003.

GUEIMONDE, M. et al. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. **Food Research International**, v. 37, p. 839-850, 2004.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, p. 163–187, 2010.

HERZALLAH, S, M. Effect of dried raisins and apricots extract on the growth of bifidobacteria in cows and goats milk. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 4, p. 170-174, 2005.

HUNTERLAB. **Applications Note**: CIELCh Color Scale, v. 8, n. 11, 2008.

INADA, K. O. P. et al. Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 422-433, 2015.

JAYAMANNE, V. S.; ADAMS, M. R. Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p. 189-194, 2006.

JUNGERSEN, M. et al. The Science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12[®]. **Microorganisms** **2014**, v. 2, p. 92-110, 2014.

JUNIOR, A. W. et al. Germinação e desenvolvimento inicial de duas espécies de jaboticabeira em função do tamanho de sementes. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 33, n. 1, p.105-109, 2011.

KAILASAPATHY, K., HARMSTORF, I., PHILLIPS, M. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in stirred fruit yogurts. **LWT- Food. Science and Technology**. 1317–1322p, 2008.

KARAASLAN M. et al. Phenolic fortification of yogurt using grape and callus extracts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 1065–72, 2011.

KARSHEVA, M. et al. Physicochemical parameters and rheological properties of yoghurts during the storage. **Journal of Chemical Technology and Metallurgy**, v.48, n.5, p. 483-488, 2013.

KELLY, D.; KING, T.; AMINOV, R. Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 622, p. 58-69, 2007.

KHEADR, E. et al. Antibiotic susceptibility profile of bifidobacteria as effects by oxgal, acid and hydrogen peroxi de stress. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 169-174, 2007.

LAMIKI, P. J. et al. Probiotics in diverticular disease of the colon: an open label study. **Journal of Gastrointestinal Liver Disease**, v. 19, p. 31–36, 2010.

LAMOUNIER, M. L. et al. Desenvolvimento e caracterização de diferentes formulações de sorvetes enriquecidos com farinha da casca da jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 2, p. 93-104, 2015.

LEE, Y. K.; SALMINEN, S. **Handbook of Probiotics and Prebiotics**, p. 77-95, 2009.

LEITE-LEGATTI, A. V. et al. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities, **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 596-603, 2012.

LEITE, S. T. **Iogurte simbiótico de açaí (*Euterpe edulis* Mart.): caracterização físico-química e viabilidade de bactérias lácticas e probiótica**. 2015. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo, 2015.

LENQUISTE, S. A. et al. Jaboticaba peel and jaboticaba peel aqueous extract shows *in vitro* and *in vivo* antioxidant properties in obesity model. **Food Research International**, v. 77, p. 162-170, 2015.

LIMA, A. J. B. et al. Caracterização química do fruto da jaboticaba (*Myrciarya cauliflora* Berg) e de suas frações. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 58, n. 4, 2008.

- LIMA, A. J. B. et al. O. Anthocyanins, pigments stability and antioxidant activity in jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg]. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 877-887, 2011.
- LUOTO, R. Impact of maternal probiotic-supplemented dietary counselling on pregnancy outcome and prenatal and postnatal growth: a double-blind, placebo controlled study. **British Journal of Nutrition**, v. 103, n. 12, p. 1792-1799, 2010.
- MACHEIX, J. J; FLEURIET, A.; BILLOT, J. **Fruit Phenolics**. Boca Raton, USA: CRC Press, 1990. 378p.
- MADUREIRA, A. R. et al. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, p. 465-470, 2011.
- MAKRAS, L.; ACKER, G. V.; VUYST, L. D. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6531–6537, 2005.
- MALACRIDA, C. R; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 659-664, 2005.
- MATTILA-SANDHOLM, T. et al. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2, p. 173-182, 2002.
- MEIRA Q. G. S., et al. Effects of added *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* probiotics on the quality characteristics of goat ricotta and their survival under simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 76, p. 828–838, 2015.
- MEYER, D.; STASSE-WOLTHUIS, M. The bifidogenic effect of inulin and oligofructose and its consequences for gut health. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p. 1277-1289, 2009.
- MICHELON, M. et al. Concentration and purification of galactooligosaccharides using nanofiltration membranes. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 1953-1961, 2014.
- NOZIÈRE, P. et al. Carotenoids for ruminants: from forages to dairy products. **Animal Feed Science and Technology**, v. 131, p. 418-450, 2006.
- OLIVEIRA, A. L. et al. Caracterização tecnológica de jabuticabas ‘sabará’ provenientes de diferentes regiões de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 25, n. 3, p. 397-400, 2003.
- OLIVEIRA, M. E. G, et al. Addition of probiotic bacteria in a semihard goat cheese (coalho): Survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 241–247, 2014.
- OLIVEIRA, M. N. **Tecnologia de Produtos Lácteos Funcionais**, São Paulo: Editora Atheneu, 2009, 384p.

PALAFIX-CARLOS, H.; YAHIA, E. M.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Identification and quantification of major phenolic compounds from mango (*Mangifera indica*, cv. Ataulfo) fruit by HPLC–DAD–MS/MS-ESI and their individual contribution to the antioxidant activity during ripening. **Food Chemistry**, v. 135, p. 105-111, 2012.

PEIXOTO, F. M. et al. Simulation of *in vitro* digestion coupled to gastric and intestinal transport models to estimate absorption of anthocyanins from peel powder of jaboticaba, jmelão and lambo fruits. **Journal of Functional Foods**, v. 24, p. 373-381, 2016.

PIMENTEL, T. C.; GARCIA, S.; PRUDÊNCIO, S. Aspectos funcionais de saúde tecnológicos de frutanos tipo inulina. **B.CEPPA**, v. 30, n. 1, p. 103-118, 2012.

PINEIRO, M. et al. FAO technical meeting on prebiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 42, p. 156-159, 2008.

PLAZA, M. et al. Characterization of antioxidant polyphenols from *Myrciaria jaboticaba* peel and their effects on glucose metabolism and antioxidant status: A pilot clinical study. **Food Chemistry**, v. 211, p. 185-197, 2016.

RANADHEERA, C. S. Probiotic viability and physico-chemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1411e1418, 2008.

REYNERTSON, K. A. et al. Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1228-1230, 2006.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**. v. 34, p. 105-110, 2002.

ROBERFROID, M. et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, 2010.

RUFINO, M. D. S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.

SAAD N. et al. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT - Food Science and Technology**, v.50, n.1, p.1-16, 2013.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, p. 1- 16, 2006.

SAITO, T. **Efeito da adição de extrato de casca de jaboticaba nas características físico-químicas e sensoriais de queijo *petit Suisse***. 99p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, 2014.

SANTIAGO, M. C. P. A. et al. Adaptação de um método por cromatografia líquida de alta eficiência para análise de antocianinas em suco de açaí (*Euterpe oleraceae Mart.*). Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos. **Comunicado técnico** , 2010.

SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of antioxidant compounds from Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: Yield, composition and economical evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 101, p. 23-31, 2010.

SERPEN, A. et al. A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 19, p. 7676– 7681, 2007.

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

SCHILLINGER, U., GUIGAS, C.; HOLZAPFEL, H. In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1289–1297, 2005.

SILVA, N. et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4^a Ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SILVA, G. J. F. et al. Formulação e estabilidade de corantes de antocianinas extraídas das cascas de jabuticaba (*Myrciaria ssp.*). **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 21, n. 3, p. 429-436, 2010.

SILVA, P. H. A. et al. Avaliação da composição química de fermentados alcoólicos de jabuticaba (*Myrciaria jabuticaba*). **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 595-600, 2008.

SILVA, S. V. **Desenvolvimento de iogurte probiótico com prebiótico**. 2007. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

SUCUPIRA, N. R. et al. Methods for measuring antioxidant activity of fruits. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, n. 4, v. 14, p. 263-269, 2012.

TAMINE, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yoghurt Science and Technology**. 3 Ed. Inglaterra: Woodhead Publishing Limited e EUA: CRC Press LLC, 791p.

TANNOCK, G. W. et al. Impact of consumption of oligosaccharide- containing biscuits on the fecal microbiota of humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2129-2136, 2004.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**, v. 55, p. 297-304, 2008.

VEGGI, P. C.; SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. Anthocyanin extraction from Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins by different techniques: economic evaluation. **Procesia Food Science**, v.1, p.1725-1731, 2011.

VERRUCK, S., et al. The buffalo Minas Frescal cheese as a protective matrix of *Bifidobacterium* BB-12 under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 1179-1183, 2015.

- VIEITES, R. L. et al. Caracterização físico-química, bioquímica e funcional da jaboticaba armazenada sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, n. 2, v. 33, p. 362-375, 2011.
- VILELA, F. C. R. et al. Sistema reprodutivo e diversidade genética de quatro espécies de *Myrciaria* (*Myrtaceae*, *jaboticabeiras*). **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 4, p. 727-734, 2012.
- WANG, J. et al. Fermentation characteristics and transit tolerance of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang in soymilk and bovine milk during storage. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 6, p. 2468-2476, 2009.
- WANG, K.Y. et al. Effects of ingesting *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, p. 737-741, 2004.
- WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 97–104, 2006.
- WU, S.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Food Research International**, v. 54, p. 148–159, 2013.
- YOLANDA, S. Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: a way of selecting improved probiotic strains. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1284–1289, 2007.
- ZUCCOTTI, G. V. et al. Probiotics in clinical practice: an overview. **The Journal of International Medical Research**, v. 36, p. 1-53, 2008.
- ZULETA, A.; ESTEVES M. J.; FRÍGOLA. A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity for food products. **Food Chemistry**, v. 114, p. 310-316, 2009.