



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2010/2011

**André Filipe
Alves Moreira**

**Desenvolvimento e Caracterização de um Smoothie
Probiótico**



**André Filipe
Alves Moreira**

**Desenvolvimento e Caracterização de um Smoothie
Probiótico**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica do Doutor Jorge Saraiva, Investigador Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Domingos Almeida, Director da Inovação e Desenvolvimento da Frulact SA.

Dedico este trabalho aos meus pais e avós

o júri

presidente

Prof. [Doutor](#) João Manuel da Costa e Araújo Pereira Coutinho
professor associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. [Doutor](#) Jorge Manuel Alexandre Saraiva
Investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. [Doutor](#) Domingos Paulo Ferreira de Almeida
professor auxiliar da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Prof. [Doutor](#) Ivonne Delgadillo Giraldo
professor associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Agradeço à Frulact pelo acolhimento na realização do estágio curricular, em especial ao Professor Domingos Almeida e à Doutora Ana Luísa Pinto, pela orientação e dedicação em todo o trabalho.

À universidade de Aveiro e ao Professor Jorge Saraiva, pela oportunidade concedida para este estágio e acompanhamento na realização durante esta dissertação.

Agradeço também à Escola Superior de Biotecnologia e à Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto por me ter disponibilizado todo o material necessário para a realização das centrifugações.

Agradeço ao Daniel Ribeiro e ao Pedro Azevedo pelo apoio a nível informático e pesquisa em bases de dados. Agradeço, também, à Ana Ferreira pela ajuda na análise sensorial.

A toda a equipa I&D da Frulact por todo o apoio, ajuda e acolhimento demonstrado durante a minha estadia na empresa.

Por último gostaria de agradecer aos meus amigos e aos meus pais que durante este tempo estiveram sempre do meu lado, apoiando-me na realização desta dissertação.

Palavras-chave

Bactérias do ácido láctico, probióticos, fruta, Desenvolvimento de Novos Produtos, bebidas não-lácteas, smoothies.

Resumo

Os probióticos são organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Têm vindo a ser associados a efeitos positivos na fisiologia intestinal, diarreia, resistência gastrointestinal à colonização de patogénicos, funções imunológicas, entre outras. Os frutos fazem parte de uma alimentação saudável, fornecendo vitaminas e minerais importantes para a saúde humana, tendo por isso um papel destacado na roda dos alimentos. O desenvolvimento de um produto funcional, com características probióticas, à base de fruta adquire assim, um carácter inovador, reunindo propriedades nutricionais e probióticas importantes, aliadas a vantagens sensoriais. Os smoothies são bebidas constituídas por 100% de fruta (polpa e sumo) que, desenvolvidos numa versão probiótica, incentivariam o consumo de fruta promovendo, em simultâneo, benefícios para a saúde do consumidor.

Foram desenvolvidas duas versões de smoothies probióticos, banana e manga. Estes foram sujeitos a análises físico-químicas (pH, actividade da água e teor de sólidos solúveis), cor e viscosidade após a inoculação e durante o armazenamento dos smoothies. Determinou-se a viabilidade da estirpe probiótica *Lactobacillus rhamnosus* R11, durante 150 dias de armazenamento e a sua resistência ao sistema gastrointestinal simulado. Foram realizados testes sensoriais de aceitação, preferência e discriminação. Os dados obtidos neste estudo foram submetidos a análises estatísticas (valores médios com os respectivos desvios padrão, análise de variância (ANOVA)).

A estirpe revelou boa viabilidade nas matrizes utilizadas, havendo perda de 2,8 (Log (CFU's) / ml) da viabilidade na passagem pelo sistema gastrointestinal simulado. Não foram verificadas diferenças significativas de °Brix, actividade da água e cor ao longo do período de armazenamento dos smoothies. Foi observado um decréscimo do valor de pH para valores próximos de 3.4. A análise sensorial mostrou a aceitabilidade dos smoothies e a preferência pelo smoothie probiótico de banana.

keywords

Lactic acid Bacteria, Probiotics, Fruit, New Product Development, Non-dairy Beverages, smoothies

abstract

Probiotics are live organisms that confer a health benefit on the host, when administered in adequate amounts. Multiple reports have described their positive effects on intestinal physiology, diarrhea, resistance to pathogen gastrointestinal colonization and immune system modulation among other benefits. Fruits provide many vitamins and minerals for human health; therefore assume an important role in a varied and balanced diet. The development of a new functional fruit-based product, a probiotic product would bring an innovative approach since it combines the nutritional and probiotic properties in a product which has a pleasant taste. Smoothies are 100% fruit based beverages (pulp and juice) that, if developed on a probiotic version would encourage the consumption of fruit at the same time as promoting health benefits to the consumer.

Two versions of probiotic smoothies were developed, banana and mango. They were subjected to physico-chemical (pH, water activity and soluble solids), color and apparent viscosity analysis after inoculation and during storage of smoothies. The viability of the probiotic strain *L. rhamnosus* R11 during 150 days of storage, and its resistance to simulated gastrointestinal system was determined. Sensory acceptance, preference and discrimination tests were carried out. Data from this study were submitted to statistical analysis (mean values with their standard deviations, analysis of variance (ANOVA)).

The probiotic strain showed great viability in the matrices used and loss of viability occurred in a simulated passage through the gastrointestinal system. There were no significant differences between the time of inoculation in relation to °Brix, water activity and colour. A decrease in pH to a value near 3.4 was observed. The sensorial tests showed a preference for banana smoothie probiotic.

“ A necessidade é a mãe da Invenção ”
Platão

Índice

1	Introdução.....	1
2	Estado da arte	3
2.1	Alimentos Funcionais	4
2.2	Alimentos probióticos	4
2.2.1	Enquadramento legal dos alimentos funcionais	6
2.3	Bactérias utilizadas como probióticos	7
2.4	Benefícios dos probióticos para a saúde humana	12
2.5	Efeitos adversos dos probióticos	14
2.6	Mercado probiótico.....	15
2.7	Desenvolvimento de um novo alimento probiótico.....	19
2.7.1	Metodologia de Desenvolvimento de Novos Produtos Alimentares.....	20
2.7.2	Identificação da oportunidade	21
2.7.3	Smoothies.....	24
2.8	Seleção da estirpe probiótica	24
2.9	Análise sensorial.....	27
3	Material e Métodos.....	29
3.1	Preparação da cultura probiótica	30
3.2	Preparação dos smoothies	30
3.2.1	Análise da viabilidade por variações de pH.....	31
3.3	Inoculação e armazenamento dos smoothies.....	33
3.4	Análises microbiológicas	33
3.4.1	Quantificação de células viáveis.....	33
3.4.2	Simulação do trato gastro-intestinal	34
3.5	Análises físico-químicas	35
3.5.1	Determinação do pH e teor de sólidos solúveis	35
3.5.2	Determinação da actividade da água	35
3.5.3	Determinação da cor	35
3.5.4	Determinação da viscosidade	36
3.1	Análise sensorial.....	37

3.1.1	Teste triangular	37
3.1.2	Teste preferência.....	37
3.1.3	Teste de aceitabilidade	38
3.2	Análise estatística	38
4	Resultados e discussão	39
4.1	Análise Microbiologica	41
4.1.1	Quantificação de células viáveis.....	41
4.1.2	Simulação do trato gastrointestinal (GI)	47
4.2	Propriedades físico-químicas dos smoothies.....	51
4.2.1	Evolução do pH durante o período de prateleira	51
4.2.2	Variação do teor de sólidos solúveis durante o período de prateleira	53
4.2.3	Actividade da água	56
4.2.4	Cor dos smoothies ao longo do armazenamento	58
4.2.5	Viscosidade dos smoothies	63
4.3	Análise sensorial aos smoothies probióticos	65
4.3.1	Teste triangular	65
4.3.2	Teste de aceitabilidade	66
4.3.3	Teste Avaliação da preferência	70
5	Conclusão	72
6	Bibliografia.....	74
	Anexos.....	81
	Anexo 1 - Industrialização	82
	Anexo 2 – Questionários da análise sensorial.....	84
	Tese de aceitabilidade do <i>smoothie</i> probiótico.....	84
	Teste de preferência para <i>smoothies</i> probióticos.....	85
	Anexo 3 – Contagem de Células Viáveis	86

Índice Figuras

Figura 1 – Distribuição do consumo de alimentos probióticos na Europa em 2005 (RTS, 2010)	16
Figura 2 – Número de produtos probióticos lançados anualmente a nível mundial entre 2006 e 2010 (Innova, 2011).....	16
Figura 3 - Produtos probióticos lançados pelas principais empresas mundiais (top14) entre os anos de 2006 e 2010 (Innova, 2011)	17
Figura 4 – Número de novos produtos probióticos lançados entre os anos de 2006 e 2010 em diferentes regiões geográficas (Innova, 2011).....	17
Figura 5 - Lançamento de produtos probióticos a nível mundial de 2006 até ao primeiro semestre de 2010 (Innova, 2011).....	18
Figura 6 – Diagrama de desenvolvimento do produto probiótico.....	20
Figura 7- Lançamento de produtos probióticos de matriz não láctea vs. bebida matriz não láctea a nível mundial, de 2006 até 2009 (Innova, 2011).....	21
Figura 8 - Lançamento de produtos probióticos de matriz não láctea por categoria de mercado a nível mundial, de 2006 até 2009 (Innova, 2011).....	21
Figura 9 – Distribuição da população por índice de tolerância à lactose (Ital, 2010)	23
Figura 10 - Preparação dos smoothies para inoculação.	33
Figura 11 - Preparação do material para realização de diluições decimais e parqueamento da cultura	34
Figura 12 – A esfera de cores CIELAB (retirado de www.linocolor.com)	36
Figura 13 – Variação dado número de células viáveis (Log (CFU) / mL) do <i>L. rhamnosus</i> R11, durante o terceiro ensaio, no smoothie de manga com três valores diferentes de pH ao longo de 42 dias de armazenamento.	45
Figura 14 - Variação dado numero de células viáveis (Log (CFU) / mL)) do <i>L. rhamnosus</i> R11, durante o terceiro ensaio, no smoothie de banana com três valores diferentes de pH ao longo de 42 dias de armazenamento.	46
Figura 15 – Simulação da passagem do smoothie probiótico de banana no trato GI, simulando uma digestão rápida para o smoothie de banana. (■ - células viáveis presentes no smoothie ◆ - células viáveis após exposição ao ambiente ácido ● - células viáveis após exposição aos sais biliares).....	47
Figura 16 - Simulação da passagem do smoothie probiótico de banana no trato GI, simulando uma digestão lenta para o smoothie de banana. (■ - células viáveis presentes no smoothie ◆ - células viáveis após exposição ao ambiente ácido ● - células viáveis após exposição aos sais biliares).....	48
Figura 17 - Simulação da passagem do smoothie probiótico de manga no trato GI, simulando uma digestão rápida para o smoothie de manga (■ - células viáveis presentes no smoothie ◆ - células viáveis após exposição ao ambiente ácido ● - células viáveis após exposição aos sais biliares).....	48
Figura 18 - Simulação da passagem do smoothie probiótico de manga no trato GI, simulando uma digestão lenta para o smoothie de manga (■ - células viáveis presentes no smoothie ◆ - células viáveis após exposição ao ambiente ácido ● - células viáveis após exposição aos sais biliares).....	48

Figura 19 - Variação do pH ao longo de 100 dias (1º ensaio) para os smoothies probióticos de banana, banana-morango e de manga.....	51
Figura 20 – Variação do pH ao longo de 150 dias (2º ensaio) para os smoothies probióticos de banana e de manga.	51
Figura 21 - Variação do pH obtidos, durante o terceiro ensaio, para o smoothie probióticos de manga com três valores diferentes de pH, ao longo de 42 dias.....	52
Figura 22 - Variação do pH obtidos, durante o terceiro ensaio, para o smoothie probióticos de banana com três valores diferentes de pH, ao longo de 42 dias.....	53
Figura 23 – Variação da luminosidade (L) nos smoothies probióticos ao longo de 150 dias de armazenamento (terceiro ensaio). Os valores obtidos são a média de 3 observações e a barra de erro corresponde ao desvio padrão.	58
Figura 24 - Variação da tonalidade (Hº) nos smoothies probióticos ao longo de 150 dias de armazenamento, referente ao terceiro ensaio. Os valores obtidos são a média de 3 observações e a barra de erro corresponde ao desvio padrão.	59
Figura 25 - Variação chroma nos smoothies probióticos ao longo de 150 dias de armazenamento, referente ao terceiro ensaio. Os valores obtidos são a média de 3 observações e a barra de erro corresponde ao desvio padrão.	59
Figura 26 – Resultados obtidos no teste triangular, utilizando o smoothie de banana probiótico, com três tempos diferentes de inoculação, e o smoothie padrão de banana da marca Fru. Número de provadores que identificou correctamente e que não identificou correctamente as diferenças entre produtos (n=30).....	65
Figura 27 - Resultados obtidos no teste triangular, utilizando o smoothie de manga probiótico, com três tempos diferentes de inoculação, e o smoothie padrão de banana da marca Fru. Número de provadores que identificou correctamente e que não identificou correctamente as diferenças entre produtos (n=30).....	65
Figura 28 – Distribuição dos resultados do teste de aceitabilidade para duas versões do smoothie de manga probiótico (acidificada e normal) com três tempos diferentes de inoculação (0, 14 e 28 dias).	68
Figura 29 - Distribuição dos resultados do teste de aceitabilidade para duas versões do smoothie de banana probiótico (acidificada e normal) com três tempos diferentes de inoculação (0, 14 e 28 dias).	68
Figura 30 - Fluxograma do processo industrial	82
Figura 31 - Diagrama do processo industrial	83

Índice Tabelas

Tabela 1- Distribuição da flora microbiana no trato gastrointestinal (adaptado de Coudeyras, 2010).....	8
Tabela 2 – Estirpes probióticas mais usadas pela indústria (adaptado de Badaró, 2009; Champagne, 2005; Prado 2008; Saarela, 2000; Vasiljevic, 2008).	9
Tabela 3 – Tipos de fermentação das bactérias lácteas (adaptado de Ukeyuma, 2010).	12
Tabela 4- Benefícios associados ao uso de probióticos.	13
Tabela 5 – Gama de lançamento de produtos probióticos de 2005 a 2010 (Innova, 2011).	18
Tabela 6- Formulação dos smoothies de manga.	30
Tabela 7 - Formulação dos smoothies de banana.	30
Tabela 8 - Formulação dos smoothies de banana-morango.....	31
Tabela 9- Formulação dos smoothies de manga para pH = 3,2.	31
Tabela 10- Formulação dos smoothies de manga para pH = 3,4.	32
Tabela 11- Formulação dos smoothies de manga para pH = 3,6.	32
Tabela 12 - Formulação dos smoothies de banana para pH = 3,2.....	32
Tabela 13 - Formulação dos smoothies de banana para pH = 3,4.....	32
Tabela 14 - Formulação dos smoothies de banana para pH = 3,6.....	32
Tabela 15- Condições usadas na simulação do sistema GI.	35
Tabela 16 - Datas de início, fim e denominação atribuída aos ensaios efectuados.	40
Tabela 17 – Variação do número de células viáveis (Log (CFU) / mL) de <i>L. rhamnosus</i> . R11 nos diferentes smoothies ao longo do período de armazenamento do primeiro ensaio.	42
Tabela 18 - Variação da média número de células viáveis (Log (CFU's) / mL) de <i>L. rhamnosus</i> R11 nos smoothies de manga e banana ao longo de 150 dias, correspondente ao segundo ensaio.	42
Tabela 19 – Quantidade de ácidos orgânicos presentes no smoothie de banana com três pH's diferentes (adaptado de Souci, 2008).....	43
Tabela 20 - Quantidade de ácidos orgânicos presentes no smoothie de manga a três valores de pH diferentes (adaptado de Souci, 2008).....	44
Tabela 21 – Número de células viáveis e respectivos decréscimos durante a simulação de uma digestão lenta e rápida, após exposição ao ambiente ácido e sais biliares, para o smoothie de banana.	49
Tabela 22 – Número de células viáveis e respectivos decréscimos durante a simulação de uma digestão lenta e rápida, após exposição ao ambiente ácido e sais biliares, para o smoothie de manga.	49
Tabela 23 - Valores de °Brix obtidos, durante o primeiro ensaio, para os smoothies probióticos de manga, banana e banana morango ao longo de 100 dias.	54
Tabela 24 - Variação de °Brix obtidos, durante o segundo ensaio, para os smoothies probióticos de manga e de banana ao longo de 150 dias.	54
Tabela 25 – Variação de °Brix obtidos, durante o terceiro ensaio, para o smoothie probióticos de manga com três valores diferentes de pH, ao longo de 42 dias.	55
Tabela 26 - Variação de °Brix obtidos, durante o terceiro ensaio, para o smoothie probióticos de banana com três valores diferentes de pH, ao longo de 42 dias.	55

Tabela 27 - Variação da a_w obtidos, durante o segundo ensaio, para os smoothies probióticos de manga e de banana ao longo de 150 dias.	56
Tabela 28 - Variação da a_w obtidos, durante o terceiro ensaio, para o smoothie probióticos de manga com três valores diferentes de pH, ao longo de 42 dias.	57
Tabela 29 - Valores de a_w obtidos, durante o terceiro ensaio, para o smoothie probióticos de banana com três valores diferentes de pH, ao longo de 42 dias.	57
Tabela 30 – Variação dos valores da luminosidade (L), tonalidade (H^p) e croma (C) no início e no fim do período de armazenamento dos smoothies probiótico, durante o primeiro ensaio.....	58
Tabela 31 – Variação do chroma, durante 42 dias, para o smoothie de manga, para três valores de pH diferentes.	60
Tabela 32 - Variação da luminosidade (L), durante 42 dias, para o smoothie de manga, para três valores de pH diferentes.	60
Tabela 33 - Variação da tonalidade (H^p), durante 42 dias, para o smoothie de manga, para três valores de pH diferentes.	60
Tabela 34 - Variação do chroma, durante 42 dias, para o smoothie de banana, para três valores de pH diferentes.	61
Tabela 35 - Variação da luminosidade (L), durante 42 dias, para o smoothie de banana, para três valores de pH diferente.	61
Tabela 36 - Variação da tonalidade (H^p), durante 42 dias, para o smoothie de banana, para três valores de pH diferente.	61
Tabela 37 - Valores médios da viscosidade (cp) no início e no fim do período de armazenamento dos smoothies probióticos, para o primeiro ensaio.	63
Tabela 38 - Valores médios da viscosidade (cp) no início e no fim do período de armazenamento dos smoothies probióticos, para o primeiro ensaio.	63
Tabela 39 - Variação da viscosidade (cp), durante 42 dias, para o smoothie de banana, para três valores de pH diferente.	63
Tabela 40 – Variação da viscosidade (cp), durante 42 dias, para o smoothie de manga, para três valores de pH diferente.	64
Tabela 41 – Valores iniciais de pH e °Brix para os smoothies usados nos testes de aceitabilidade e preferência.	67
Tabela 42 – Valores obtidos no teste aceitabilidade, utilizando a marcação na escala para os diferentes smoothies.	67
Tabela 43 – Resultados expressos em percentagem obtidos pelos descritores da escala de FACT para o smoothie de banana, com três tempos diferentes de inoculação, com duas versões distintas, pH acidificado e pH normal.	69
Tabela 44 - Resultados expressos em percentagem obtidos pelos descritores da escala de FACT para o smoothie de manga, com três tempos diferentes de inoculação, com duas versões distintas, uma com pH acidificado e outra com o pH normal.....	70

Tabela 45 – Classificação atribuída pelos provadores (n=54) às duas versões (normal e acidificado) de cada smoothie smoothies no final do *shelf life* do produto. *Least significant ranked difference* (LSRD) de 104,92 com 53 graus de liberdade: $t[(NK(K+1)/6)]^{1/2}$, com K = nº de amostras, N = nº de provadores e t = t-value. 71

Tabela 46 – Contagem de células viáveis de *L. rhamnosus* R11 no smoothie de manga ao longo de 150 dias.
..... 86

Tabela 47 - Contagem de células viáveis de *L. rhamnosus* R11 no smoothie de banana ao longo de 150 dias.
..... 87

Lista de Símbolos e Abreviaturas

Abreviatura	Descrição
<i>B.</i>	<i>Bifidobacterium</i>
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
C	Croma
DNP	Desenvolvimento de novos produtos
FOSHU	Food for specified health use
GI	Gastrointestinal
GRAS	Generally recognized as safe
I&D	Inovação e desenvolvimento
FACT	Food Action Rating Scales
HCL	Ácido clorídrico
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
MRS	de Man, Rogosa, Sharpe
NaOH	Hidróxido de sódio
RCF	Força Centrífuga Relativa
RPA	Reactor perfeitamente agitado
SBU	<i>Strategic business unit</i>

1 Introdução

O mercado dos alimentos funcionais, nomeadamente dos probióticos, encontra-se em clara expansão a nível mundial, cabendo às empresas a missão de inovar desenvolvendo novas matrizes que lhes possibilitem competir com os produtos já existentes. No âmbito da dissertação de Mestrado em Biotecnologia Alimentar, a empresa Frulact propôs um estágio no qual se pretendia desenvolver e otimizar um novo tipo de smoothie probiótico, que consiste numa bebida 100% fruta à base de polpas e concentrados.

A Frulact constitui um grupo empresarial fundado no ano de 1987, actuando na concepção, desenvolvimento e produção de preparados de fruta para a indústria alimentar, nomeadamente aplicações em lacticínios, pastelaria industrial, gelados e bebidas. A par da actividade *core*, o Grupo Frulact lançou, acerca de dois anos, uma nova SBU (*strategic business unit*) na produção de bens para os mercados de consumo, designada Frulact Nutrição.

A Frulact está presente industrialmente com seis unidades industriais, três localizadas em Portugal (Ferro, Maia e Tortosendo), e três internacionalmente, nomeadamente na Argélia, França e Marrocos, tendo uma capacidade de produção anual de 60 mil toneladas de preparados de fruta, originando um volume de negócios de 70 milhões de euros. Estes valores fazem da empresa, líder no seu sector de actividade/na actividade *core*, em alguns dos mercados internacionais onde actua. O Grupo Frulact serve directamente as maiores marcas mundiais e locais – DANONE, NESTLÈ, YOPLAIT, SENOBLE, PASCUAL, LACTALIS, NOVANDIE, EMMY, IPARLAT, LACTOGAL, entre muitas outras.

O objectivo geral do presente trabalho consistiu no desenvolvimento de um *smoothie* probiótico através da incorporação de uma cultura probiótica comercial que apresentasse uma boa estabilidade ao longo do período de armazenamento do produto.

Os objectivos específicos abrangeram a optimização e preparação de diferentes smoothies da marca FRU (manga, banana e banana-morango) com base em fórmulas previamente desenvolvidas na Frulact Nutrição. Foi testada a viabilidade e a estabilidade da estirpe probiótica comercial *Lactobacillus rhamnosus* R11 nos

diferentes smoothies. A sobrevivência da estirpe foi avaliada durante o período de armazenamento, em conjunto com a monitorização de parâmetros físico-químicos.

Este trabalho encontra-se dividido em cinco partes. A primeira parte refere-se à introdução geral e a segunda ao estado de arte. Neste ponto será abordado o estado da arte relativamente às bactérias probióticas, definição, uma breve contextualização histórica, utilizações, seus benefícios para a saúde, o mercado associado e, de forma mais particular, o processo de desenvolvimento de um smoothie probiótico.

A parte experimental abrange os capítulos seguintes, nomeadamente a metodologia utilizada (Capítulo 3) e os resultados e discussão (Capítulo 4). Na terceira parte são apresentados os detalhes da metodologia utilizada experimentalmente: análise da viabilidade das culturas probióticas, parâmetros físico químicos, análise sensorial e análise estatística.

A quarta parte do trabalho apresenta os resultados obtidos e a respectiva discussão dos mesmos. Por último, no capítulo seis, são tecidas as conclusões mais relevantes obtidas no presente estudo.

2 Estado da arte

2.1 Alimentos Funcionais

A sociedade actual mostra-se cada vez mais interessada na relação entre os alimentos que consome e o seu efeito na sua saúde, de forma a otimizar a sua performance e diminuir os riscos de aparecimento de doenças. Estas preocupações provêm já da Grécia antiga, onde se acreditava que uma alimentação adequada seria uma pré-condição para o bem-estar corporal e intelectual (Diplock, 1999; Gobbetti 2010). Foi neste contexto que surgiu pela primeira vez no Japão, ano de 1984, a designação “alimento funcional” ou “food for specified health use” (FOSHU), como resultado final do desenvolvimento de alimentos que possuíssem algum valor adicional para o benefício da saúde e bem-estar. Dada a elevada expectativa de vida neste país, o desenvolvimento deste tipo de produtos poderia levar a uma diminuição do custo da saúde pública (Champagne, 2005; Diplock, 1999; Gobbetti, 2010).

Nos dias de hoje, utiliza-se o termo *alimentos funcionais* como alimentos que possuem efeitos benéficos para a saúde, para além dos seus efeitos nutricionais básicos, promovendo a saúde e bem-estar dos consumidores, devendo os seus efeitos estar associados a doses que possam fazer parte de uma dieta normal (Badaró, 2009; Champagne, 2005; Gobbetti, 2010; FAO/WHO, 2002; Vesiljevic, 2008). Para um alimento se tornar funcional é necessário aumentar a biodisponibilidade ou incorporar determinados constituintes, surgindo neste contexto que surgem os alimentos com culturas probióticas incorporadas (Gobbetti, 2010).

2.2 Alimentos probióticos

Os alimentos probióticos são uma das principais categorias de alimentos funcionais. Em 1907, o prémio Nobel russo, Eli Metchnikoff, fez a primeira observação de efeitos positivos de determinadas bactérias no organismo humano (FAO/WHO, 2001; Vasiljevic, 2008). A preservação de alimentos através da fermentação láctica e a longa longevidade de camponeses búlgaros, que atingiam, à data, a média de vida de 87 anos, poderia estar associada ao consumo de grandes quantidades de leite fermentado, levaram a sugerir que a modelação da microflora intestinal poderia produzir um conjunto de efeitos benéficos na saúde, afirmando que a dependência da flora intestinal dos alimentos tornava possível a adopção de medidas para modificar a flora humana,

substituindo as bactérias nocivas por bactérias úteis (Coudeyras, 2010; Vasiljevic, 2008).

Ao mesmo tempo, no ano de 1908, o pediatra francês Henry Tissier observou um baixo número de bactérias em forma de Y presente nas crianças que apresentavam diarreia, e que estas "bífido" bactérias eram abundantes em indivíduos saudáveis. Ele sugeriu que estas bactérias poderiam ser administradas a pacientes com diarreia para ajudar a restaurar a flora intestinal saudável (Coudeyras, 2010; FAO/WHO, 2001; Vasiljevic, 2008).

As observações de Metchnikoff e Tissier foram tão atraentes que a exploração comercial seguiu imediatamente os seus trabalhos científicos. No entanto, o conceito de probióticos não foi aprovado cientificamente, face aos resultados inconclusivos, e a investigação sobre o tema abrandou.

Foi no Japão, em 1930, que Minoru Shirota reconheceu a importância da medicina preventiva e da modulação da microflora intestinal isolando de forma eficiente uma estirpe de *Lactobacillus* (Shirota) capaz de resistir à passagem pelo trato gastrointestinal. Com essa estirpe iniciou a produção de leites fermentados com o nome "Yakult", nome que atribuiu à empresa que fundou em 1935 (Badaró, 2009; Champagne, 2005; FAO/WHO, 2001; FAO/WHO, 2002; Vesiljevic, 2008).

Com o período conturbado da guerra entre as décadas 30 e 50, o interesse pelos probióticos abrandou novamente. No final da década de 50 e início de 60, com o aumento da procura por compostos aromáticos, enzimas e vitaminas para a indústria alimentar, verificou-se um crescente interesse na microflora intestinal. Tal facto levou à introdução do conceito de *probiótico*, nome que deriva do Grego e significa "para a vida" (Coudeyras, 2010; FAO/WHO, 2002), inicialmente definidos como antónimo de antibiótico. Definem-se probióticos como organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002; Vasiljevic, 2008; Badaró, 2009).

De acordo com o *International Life Science Institute* (ILSI) um alimento pode ser considerado funcional se demonstrar possuir de forma satisfatória efeitos benéficos em funções específicas para o organismo (Prado, 2010). Para um alimento se tornar funcional é necessário adicionar ou aumentar a concentração e/ou a biodisponibilidade de um determinado composto com efeitos benéficos conhecidos para a saúde e bem-estar, sendo neste contexto que surgem os probióticos (Kailasapathy, 2008). Um grande número de benefícios encontram-se associados aos probióticos, uns encontram-se bem

documentados e estabelecidos, enquanto outros se encontram em fase de estudo, tendo um potencial promissor. As espécies probióticas mais usadas pertencem aos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, sendo que algumas estirpes de *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* e *Propionibacterium* são também considerados probióticos devido aos seus efeitos benéficos para a saúde (Rivera-Espinoza, 2010). Garantir a sua sobrevivência ao longo do sistema digestivo é fundamental, necessitando alcançar populações suficientemente elevadas (tipicamente acima de 10^7 CFU/ mL ou g de produto, para ter impacto fisiológico no consumidor, de forma a serem obtidos os efeitos benéficos a que se propõem (Prado, 2008).

2.2.1 Enquadramento legal dos alimentos funcionais

O Japão é o único país que possui legislação específica, desde 1991, para o uso de alimentos funcionais, formulando uma regulamentação para a sua aprovação com o estatuto legal de FOSHU (Prado, 2010).

Nos Estados Unidos e na Europa não existe legislação específica uma vez que a legislação é mais restritiva em relação a alegações de saúde, colocando dificuldades legais aos alimentos funcionais. A nível europeu, os alimentos funcionais são abrangidos pelo regulamento (CE) n.º 258/97 do Parlamento Europeu e do Conselho de 27 de Janeiro de 1997 que se encontram classificados como “novos alimentos”. Existem características que estes alimentos devem seguir, nomeadamente, não induzir o consumidor em erro nem apresentar riscos para a sua saúde. Esta regulação não pondera as propriedades nutricionais ou fisiológicas dos alimentos, nem alegações para a saúde (Wright, 2005). Mais recentemente, o Regulamento (CE) n.º 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho veio regular as alegações nutricionais e de saúde efectuadas sobre os alimentos na União Europeia. Alguns países apresentam legislações específicas como é o caso do Reino Unido, Suécia e Holanda, nos quais os probióticos são aprovados como benéficos para a saúde humana (Saxelin, 2008), mas coerentes com o Regulamento (CE) n.º 1924/2006.

Nos Estados Unidos têm sido propostas definições para alimentos funcionais pelo *Internacional Food Information Council* (IFIC) e pelo *Institute of Food Technologists* (IFT). O IFIC considera alimentos funcionais, um alimento ou componente alimentar, que possui benefícios básicos para além da nutrição básica. Por

sua vez, o IFT define alimentos funcionais como alimentos ou componentes alimentares que possuem benefícios básicos para além da nutrição básica, fornecendo nutrientes essenciais adicionais relativamente às quantidades necessárias para a manutenção normal, crescimento e desenvolvimento, e/ou outras componentes das actividades biológicas que transmitem efeitos benéficos ou efeitos fisiológicos desejáveis (Hasler, 2009).

No Canadá, define-se alimento funcional como um alimento similar na aparência, ou seja, um alimento convencional consumido como parte de uma dieta normal, que possui benefícios comprovados a nível fisiológico, e/ou reduz o risco de doenças crónicas além das suas funções nutricionais (Hasler, 2009).

2.3 Bactérias utilizadas como probióticos

A flora bacteriana humana é constituída por cerca de 10^{14} células por indivíduo, um número dez vezes superior ao de células (10^{13}), com uma enorme diversidade de espécies (400 a 1000) (Coudeyras, 2010). Este número não é constante, quer em termos de espécies quer em número, contribuindo para este fenómeno diversos factores endógenos (genótipo, hormonas e idade) e exógenos (stress e alimentação) (Coudeyras, 2010).

É possível encontrar bactérias em diversos órgãos do corpo humano, como é o caso do nariz, olhos, pele e trato gastrointestinal. É no trato gastrointestinal, segunda maior superfície do corpo humano com 400 m^2 , que se pode encontrar uma maior variedade de espécies, cerca de 400 espécies diferentes (Tabela 1), estando a elas associadas um grande número de importantes reacções físico-químicas (Gupta, 2009; Coudeyras, 2010). O uso de antibióticos, terapia imunossupressora e radiação, bem como outro tipo de tratamentos, pode causar alterações prejudiciais na composição e afectar a flora microbiana. A introdução de estirpes benéficas no trato gastrointestinal é uma opção atractiva para restabelecer a flora microbiana prevenindo doenças (Gupta, 2009).

Tabela 1- Distribuição da flora microbiana no trato gastrointestinal (adaptado de Coudeyras, 2010).

Zona do Sistema Gastrointestinal	Concentração (UFC/g)	Stress Físico-Químico	Género/Espécie
Esófago	10^2 - 10^4	Movimentos peristálticos	<i>Streptococcus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Prevotella</i>
Estômago	10^4	Acidez, enzimas gástricas, muco	<i>Helicobacter pylori</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Rothia</i>
Duodeno	10^4	Movimentos peristálticos, muco, suco pancreático, sais bilíares	<i>Streptococcus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Bacteroides</i>
Jejuno	10^5 - 10^7	Movimentos peristálticos, muco, suco pancreático, sais bilíares, baixa oxigenação	<i>Streptococcus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Bacteroides</i>
Íleo	10^8	Movimentos peristálticos, muco, sais bilíares, anaerobiose.	<i>Bacteroides</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , Enterobactérias.
Cólon	10^{10} - 10^{12}	Muco, anaerobiose, metabólitos bacterianos (acidez)	<i>Bacteroides</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , Enterobactérias.

Apenas 10% a 50% destas espécies bacterianas encontradas no corpo humano podem ser cultivadas, e assim estudadas de forma mais aprofundadas, sendo a sua

recolha em alguns casos complexa, requerendo métodos invasivos, factor limitante dado os danos causados ao hospedeiro (Coudeyras, 2010).

Os efeitos benéficos que os probióticos exercem sobre a microflora humana, e principalmente sobre a flora intestinal, desencadearam um maior interesse por parte da indústria, no sentido de um aprofundamento do estudo e selecção de estirpes potenciais. A colonização do intestino dá-se após o nascimento através do leite materno que contém bactérias dos géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Bifidobacterium*, *Acinetobacter*, *Bacteroides*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Haemophilus* e *Veillonella*, colonizando o intestino em quantidades de 10^6 bactérias por mililitro de leite materno (Coudeyras, 2010; Vasiljevic, 2008).

As culturas mais usadas no desenvolvimento de novos alimentos funcionais são as bactérias lácticas, em particular as pertencentes ao género *Lactobacillus*, e as bifidobactérias ou seja as bactérias pertencentes ao género *Bifidobacterium*. Espécies pertencentes ao género *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Sacharomyces* (levedura) e *Propionibacterium* também são considerados probióticos, devido ao seu efeito na promoção da saúde e bem-estar. As estirpes são, normalmente, isoladas de intestinos humanos saudáveis, por permitirem uma maior possibilidade de sobrevivência, maximizando a ligação e compatibilidade com a microflora humana (Rivera-Espinoza, 2010). Na tabela 2 encontram-se indicadas as principais culturas probióticas usadas em aplicações comerciais.

Tabela 2 – Estirpes probióticas mais usadas pela indústria (adaptado de Badaró, 2009; Champagne, 2005; Prado 2008; Saarela, 2000; Vasiljevic, 2008).

Estirpes de <i>Lactobacillus</i>	Estirpes de <i>Bifidobacterium</i>	Outras estirpes
<i>L. acidophilus</i> La	<i>B. animalis</i> ssp. <i>Lactis</i> Bb12	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. acidophilus</i> LB (Lacteol Laboratory)	<i>B. animalis</i> DN173010 (Bioactiva)	<i>Clostridium botyricum</i>
<i>L. acidophilus</i> LAFTI® (DSM Food Specialties)	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. acidophilus</i> LA1/LA5 (Chr. Hansen)	<i>B. bifidum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. acidophilus</i> NCFM® - (Danisco)	<i>B. breve</i> strain Yakult	<i>Lactococcus lactis</i> L1A
<i>L. acidophilus</i> R0052 (Rosell-Lallemand)	<i>B.essensis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp cremoris
<i>L. acidophilus</i> SBT-20621 –	<i>B. infantis</i>	<i>Leuconostic mesenteroides</i>

Snow Brand Milk Products Co.
Ltd.

<i>L. amylovorus</i>	<i>B. lactis</i> HOWARU™/B1	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. longum</i> BB536 – Morinaga Milk Industry Co. Ltd.	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. casei</i> Immunitas - Danone	<i>B. longum</i> SBT-29281	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. casei</i> shirota - Yakult	<i>B. lactis</i> HN019 (DR10) - Fonterra	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. lactis</i> LAFTI® B94	<i>Streptococcus salivarius</i> sp <i>thermophilus</i>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> Lb12	<i>B. longum</i>	
<i>L. fermentum</i>		
<i>L. gasseri</i>		
<i>L. helveticus</i>		
<i>L. johnsonii</i> La1- Nestle		
<i>L. lactis</i>		
<i>L. paracasei</i> CRL431		
<i>L. paracasei</i> F19 - Medipharm		
<i>L. paracasei</i> LAFTI® L26		
<i>L. paracasei</i> Lpc		
<i>L. plantarum</i> 299V – Probi AB		
<i>L. reuteri</i> SD2112 - Biogaia		
<i>L. rhamnosus</i> GG1 – Valio Dairy		
<i>L. rhamnosus</i> HN001 (DR20)		
<i>L. rhamnosus</i> LB21 – Essum AB		
<i>L. rhamnosus</i> R0011 – (Rosell-Lallemand)		
<i>L. rhamnosus</i> 271		
<i>L. salivarius</i> UCC118 – University College Cork		

Nota: As empresas, às quais pertencem as estirpes probióticas comerciais apresentadas na Tabela 3 são: Lacteol Laboratory, Houdan, França; DSM Food Specialties, Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca; Danisco Copenhagen, Dinamarca; Rosell-Lallemand Birkerød, Dinamarca; Snow Brand Milk Products Co. Ltd, Tokyo, Japão; Danone, Paris, França; Yakult, Kyoto, Japão; Nestle, Vevey, Suíça; University College Cork, Cork, Irlanda; Essum AB, Umeå, Suécia; Medipharm, Lisboa, Portugal; Probi AB, Lund, Suécia; Valio, Helsinquia, Finlândia.

As bifidobactérias, género *Bifidobacterium*, são habitantes do trato gastrointestinal humano, podendo ser encontrados em locais distintos como na boca ou nas fezes, constituindo cerca de 10% da flora intestinal. Possuem a habilidade de colonizar o trato intestinal e controlar a proliferação de bactérias indesejáveis. O seu pH óptimo de crescimento situa-se entre os 6,0 e 7,0, não crescendo em ambientes com pH superior a 8,5 ou inferior a 4,5. A temperatura óptima situa-se entre os 37 °C e os 41 °C, sendo o mínimo situado entre os 25 °C e os 28 °C e o máximo entre 43 °C e 45 °C (Rivera-Espinoza, 2010; Champagne, 2005). As suas células são Gram-positivas e apresentam forma de bastonetes de várias formas e tamanhos, presentes individualmente ou em cadeias de vários tamanhos. Não formam esporos, são imóveis, anaeróbicas, sendo que algumas toleram oxigénio na presença de dióxido de carbono (Ukeyima, 2010).

As bactérias lácticas são muito usadas na indústria devido à sua capacidade fermentativa, produzindo ácido láctico, etanol e outros metabolitos, por fermentação de açúcares. Podem ser encontradas em plantas ou no trato intestinal, sendo por isso consideradas bactérias indígenas (Rivera-Espinoza, 2010; Ukeyima, 2010). Possuem dois tipos de mecanismos de fermentação, nomeadamente: homo- (ácido láctico) e heterofermentativo (ácido láctico, etanol e dióxido de carbono). O seu metabolismo permite a diminuição do pH do meio, inibindo o crescimento de microrganismos potencialmente patogénicos. São usadas como probióticos devido à sua capacidade de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal, aderindo às células do epitélio intestinal levando à prevenção do crescimento e proliferação de bactérias patogénicas.

O género *Lactobacillus* constitui, no entanto, o género mais utilizado em aplicações probióticas. As estirpes mais usadas possuem um pH óptimo de crescimento na ordem dos 4,5 e 6,4, não crescendo a pH inferior a 3,6. A temperatura óptima situa-se entre os 35 e os 40 °C, havendo a possibilidade de crescimento a temperaturas superiores a 45 °C (Rivera-Espinoza, 2010; Saad, 2006). As suas células são, normalmente, da forma de bastonetes longos e finos, formando cadeias. São bactérias Gram-positivas, não formam esporos, são aerotolerantes, carecendo de citocromos e porfirinas e são catalase e oxidase negativas. De acordo com a sua fermentação, podem ser divididas em três grupos (Tabela 3): homofermentativas, heterofermentativas obrigatórias e facultativas (Ukeyuma, 2010). Bactérias lácticas dos géneros *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Pediococcus* também são probióticos importantes (Saad, 2006).

Tabela 3 – Tipos de fermentação das bactérias lácteas (adaptado de Ukeyuma, 2010).

	Tipo de fermentação	Produto (s) Formado (s)	Estirpe (exemplo)
Grupo 1	Homofermentativa	Ácido láctico	<i>L. acidophilus</i>
Grupo 2	Heterofermentativa facultativas	Ácido láctico, ácido acético, etanol e ácido fórmico.	<i>L. plantarum</i> <i>L. casei</i>
Grupo 3	Heterofermentativas obrigatórias	Ácido láctico, ácido acético, dióxido de carbono e possivelmente etanol.	<i>L. brevis</i> , <i>L. fermentum</i> .

2.4 Benefícios dos probióticos para a saúde humana

São atribuídos aos probióticos um grande número de benefícios para a saúde, estando a sua utilização na indústria alimentar dependente da sua eficácia em ensaios humanos. A informação documentada sobre a acção de algumas estirpes *in vitro* não é, contudo, suficiente para as descrever como probióticos, estando dependente a sua aceitação e aprovação de ensaios clínicos (FAO/WHO, 2001; Prado, 2008).

É importante referir que nenhuma estirpe irá fornecer todos os benefícios atribuídos aos probióticos, pois os efeitos são específicos para determinada estirpe, não podendo ser extrapolado para outras estirpes, inclusivamente dentro da mesma espécie. A selecção deve ser feita de forma a satisfazer o objectivo terapêutico e o público-alvo a que se destina (FAO/WHO, 2001). A acção de cada estirpe varia de individuo para individuo e para o mesmo individuo a eficácia poderá ser diferente face ao estado fisiológico em que se encontra (Kailasapathy, 2008; Saad, 2006).

Para serem obtidos os benefícios propostos pelos probióticos é necessário ingerir um número mínimo de células que varia de acordo com a estirpe usada e o benefício pretendido. Não é bem claro o número de células necessário, de tal forma que não é consensual por parte da comunidade científica a quantidade a ser ingerida, mas a dose diária é descrita como sendo um valor compreendido entre as 10^8 e as 10^9 CFU/g produto, devendo sobreviver ao trato gastrointestinal, colonizando o intestino delgado e o cólon. Devem ser capazes de sobreviver ao suco gástrico (ácido clorídrico), suco pancreático e aos sais biliares, sobrevivendo em condições ácidas (estômago) e básicas (duodeno) (Gupta, 2009). A matriz usada é considerada um elemento importante quando se trata de aplicação em produtos alimentares para actuar como veículo do

probiótico (s) que também influencia o nível de actividade, uma vez que irá afectar a sobrevivência no ambiente gástrico intestinal (Champagne, 2005; Champagne, 2008; Rivera-Espinoza, 2010).

O produto deve conter informação detalhada sobre a estirpe, ou estirpes, presentes bem como a quantidade mínima necessária e o tempo de utilização para que sejam conferidos os benefícios propostos para a saúde (Prado, 2008; FAO/WHO, 2001).

Os benefícios, mais importantes, atribuídos aos probióticos encontrando-se sumariados na tabela 4.

Tabela 4- Benefícios associados ao uso de probióticos.

Desordem	Exemplo de Estirpes usadas no tratamento	Referência
Aumento da resposta imune	<i>Lactobacillus</i> + <i>Bifidobacterium</i>	Saad, 2006
Cancro	Lactobacilli	Gupta, 2009
Doenças Cardiovasculares	<i>Lactobacillus</i> spp.	Prado, 2010 FAO/WHO, 2001
Doença de Crohn	<i>L. rhamnosus</i> GG	Saarela, 2000
Eczema atópico	<i>L. rhamnosus</i> GG	Coudeyras, 2010 FAO/WHO, 2001
Infecção provocada por <i>Helicobacter pylori</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. johnsonii</i>	Coudeyras, 2010 Vasiljevic, 2008
Imunidade das mucosas	<i>L. Shirota</i> , <i>Lb rhamnosus</i> HN001, <i>L. acidophilus</i> HN017	Prado, 2010 FAO/WHO, 2001
Infecção respiratória	<i>L. rhamnosus</i>	Coudeyras, 2010
Intolerância à lactose	<i>L. delbrueckii bulgaricus</i> + <i>Streptococcus thermophilus</i>	Coudeyras, 2010 Saad, 2006
Infecções cirúrgicas	<i>L. fermentum</i> RC-14 <i>L. plantarum</i> 299 <i>L. GR-1</i> , RC-14, B-54	Gupta, 2009 Prado, 2010
Infecção do trato urinário	<i>L. acidophilus</i>	FAO/WHO, 2001 Coudeyras, 2010
Problemas de inflamação intestinal crónica	<i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>L. rhamnosus</i> GG	Coudeyras, 2010
Redução do risco de mutagenicidade e carcinogenicidade	<i>L. acidophilus</i> LA-2, <i>Bifidobacterium</i> spp. <i>L. casei shirota</i>	Vasiljevic, 2008 Prado, 2010
Síndrome do cólon irritável	<i>L. rhamnosus</i> (GG+LC705)	Coudeyras, 2010
Sintomas de diarreia	<i>L. rhamnosus</i> GG	Coudeyras, 2010

	<i>B. animalis</i> Bb-12	Vasiljevic, 2008
Tratamento e prevenção de alergias	<i>L. rhamnosus</i> GG, <i>B. lactis</i> BB-12.	Coudeyras, 2010
		Vasiljevic, 2008
		Prado, 2010
Vaginite bacteriana	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> GG.	Prado, 2010
		Coudeyras, 2010

Tal como observado na tabela acima, os probióticos podem actuar sobretudo de duas formas distintas: contribuindo para o melhoramento do metabolismo e/ou para melhoramento do sistema imunitário (Coudeyras, 2010).

A nível metabólico, podem estimular a absorção de determinados nutrientes, como o cálcio, ou produção de metabolitos que irão produzir efeitos benéficos, como é o caso de compostos anti-cancerígenos ou da enzima β -D-galactosidase (Vasiljevic, 2008; Badaró, 2009) responsável pela hidrólise da lactose a nível intestinal (FAO/WHO, 2001; Coudeyras, 2010).

A utilização de culturas probióticas tem um efeito inibidor sobre microrganismos potencialmente patogénicos, proveniente da produção de compostos com actividade anti-microbiana (bacteriocinas), diminuição do pH do meio (produção de ácido) ou competição por locais de adesão e nutrientes, ajudando a recompor a flora intestinal. São responsáveis por reforçar as defesas naturais, estimulando tanto a resposta imunitária específica, como a não específica, aumentando os níveis de anticorpos e macrófagos (Saad, 2006; Kailasapathy, 2008).

2.5 Efeitos adversos dos probióticos

Estudos clínicos usando *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* não revelaram nenhum tipo de efeito adverso em humanos, podendo os alimentos contendo estas bactérias ser classificadas como GRAS (“*Generally recognized as safe*”, ou seja, geralmente reconhecidos como seguros)), na terminologia da *Food and Drug Administration*, EUA (Prado, 2010). No entanto alguns estudos revelam que algumas estirpes de *Lactobacillus* demonstraram resistência a antibióticos, não sendo esta resistência moderada por plasmídios. Por sua vez estirpes de *Enterococcus*, resistentes à vancomicina demonstraram resistência moderada por plasmídios. No caso de a resistência ser moderada por plasmídios, as bactérias não devem ser usadas como

probióticos, devido à sua capacidade de transferência dos factores de resistência a bactérias potencialmente patogénicas (Saad, 2006).

Apesar das culturas de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* serem consideradas seguras, são necessários testes toxicológicos prévios para garantir a segurança do consumidor antes do lançamento e divulgação de qualquer produto no mercado (Badaró, 2009).

2.6 Mercado probiótico

O principal papel da alimentação passa por garantir os nutrientes necessários às funções metabólicas básicas, sendo que nos últimos anos este conceito tem vindo a alterar-se, atribuindo-se à alimentação um papel preponderante no funcionamento do organismo, que vai para além do seu papel nutricional (Prado, 2010; Stanton 2001). De facto, o paradigma da saúde e da nutrição mudou drasticamente nas duas últimas décadas; os alimentos já não são vistos unicamente como um veículo para os nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento, mas também como uma via para o bem-estar, cabendo aos alimentos funcionais um papel cada vez mais activo na sociedade actual (Hasler, 2009). As tendências “natural”, “funcional” e “saudável” estão para perdurar e perspectiva-se que continuem a crescer, havendo um aumento cada vez maior em termos de gama e patentes de produtos.

A nível europeu o mercado probiótico duplicou o volume de vendas (respectivamente de 800 mil e 1,5 mil milhões de euros) (RTS, 2005), sendo este mercado dominado pela Alemanha, França, Finlândia e Reino Unido, como se pode verificar na figura 1.

Entre os anos 2002 e 2005 foi observado um crescimento de 12% nas vendas de alimentos funcionais, tendo algumas categorias, como é o caso dos produtos *Bio* e fortalecidos, atingido para o mesmo período, um crescimento superior a 50% (Delloite).

O mercado dos alimentos funcionais, para mesmo período, obteve um volume de vendas na ordem dos 30 a 60 mil milhões de dólares constituindo o Japão, EUA, Reino Unido, França, Alemanha e Finlândia os principais mercados de consumo para estes alimentos (RTS, 2005).

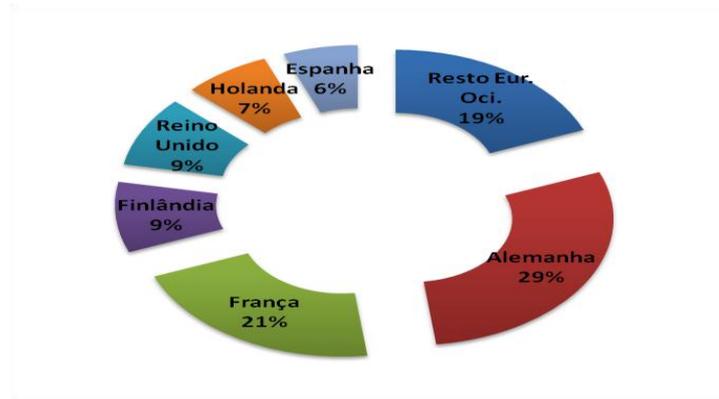


Figura 1 – Distribuição do consumo de alimentos probióticos na Europa em 2005 (RTS, 2010)

Entre os anos de 2006 e 2010 verificou-se um aumento significativo no número de lançamentos de produtos probióticos, como se pode verificar na figura 2.

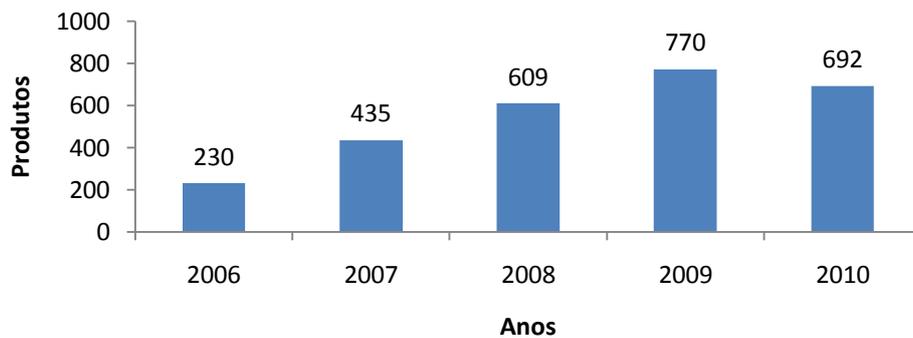


Figura 2 – Número de produtos probióticos lançados anualmente a nível mundial entre 2006 e 2010 (Innova, 2011).

O grupo Danone domina os lançamentos desta gama de produtos (figura 3) através da marca Actimel® a sua principal referência. A estirpe *L. casei Imunitass* é a mais utilizada na elaboração dos seus produtos.

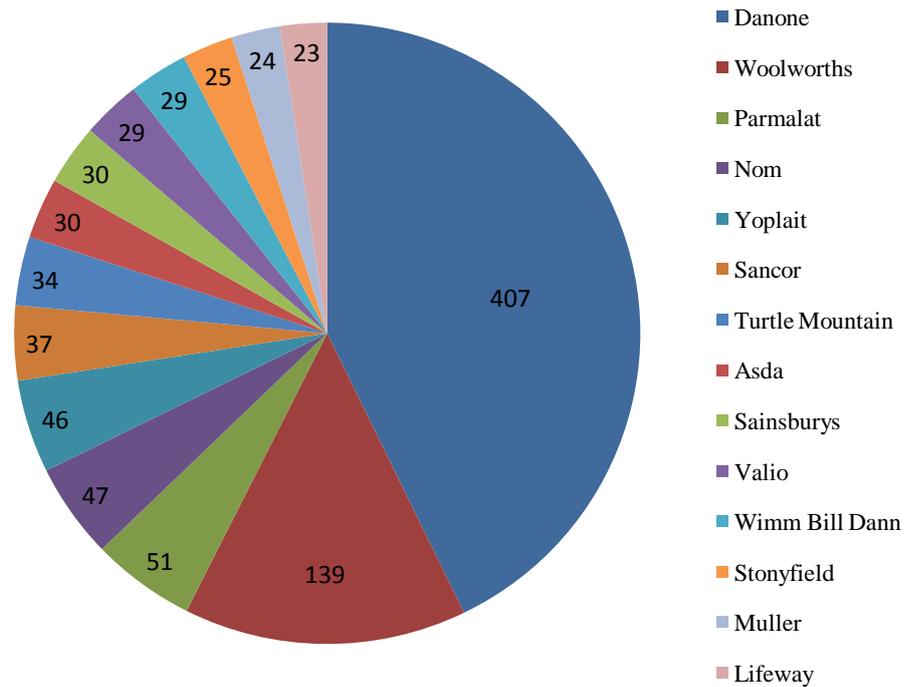


Figura 3 - Produtos probióticos lançados pelas principais empresas mundiais (top14) entre os anos de 2006 e 2010 (Innova, 2011).

A América do Norte e a Europa Ocidental são as principais zonas de lançamento de novos produtos probióticos como se observa na figura 4. A Austrália e o Médio Oriente representam zonas onde estes lançamentos são menos visíveis.

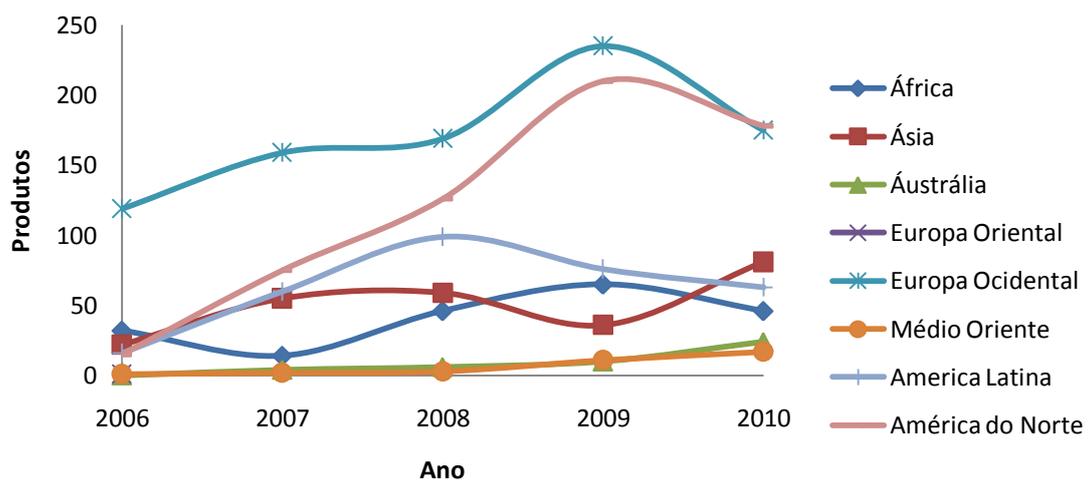


Figura 4 – Número de novos produtos probióticos lançados entre os anos de 2006 e 2010 em diferentes regiões geográficas (Innova, 2011).

As principais marcas de produtos probióticos a serem vendidas no mercado Europeu são os lácteos Actimel® (Danone), LC1® (Nestlé) e o Yakult®, sendo que este foi o primeiro produto probiótico a ser lançado no mercado Europeu (1996). A Woolworths, Müller, Orchard Maid, Onken Dairy, Parmalat, Yoplait e a Rowan Glen Dairy são outros actores reconhecidos neste mercado (RTS 2011, Innova 2011).

Os probióticos devem estar associados a uma gama de produtos seleccionados de fácil aceitação e consumo por parte do consumidor, existindo centenas de produtos rotulados como probióticos, contendo uma ou mais estirpes definidas, sendo o grupo dos lacticínios o que apresenta maior desenvolvimento, como se pode ver na figura 5 e na tabela 5 (Badaró, 2009; Rivera-Espinoza, 2010).

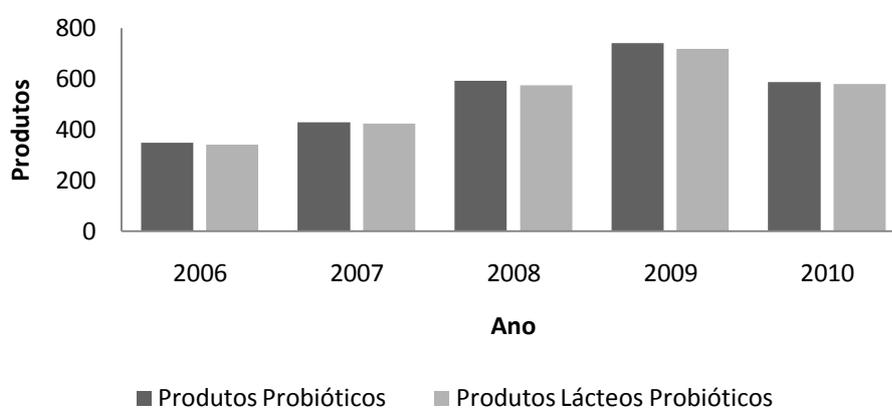


Figura 5 - Lançamento de produtos probióticos a nível mundial de 2006 até ao primeiro semestre de 2010 (Innova, 2011).

Tabela 5 – Gama de lançamento de produtos probióticos de 2005 a 2010 (Innova, 2011).

Mercado	Nº de Produtos
Lácteos	2618
Refrigerantes	140
Sobremesas e gelados	62
Confeitaria	42
Padaria	17

. O consumo de leites fermentados entre a Europa e os EUA são muito distintos, sendo o Europeu (35-45 L/pessoa/ano) muito superior ao dos EUA (4-5L/pessoa/ano). As doses individuais são as mais usadas a nível Europeu, facto este associado à natureza destes produtos (Saxalin, 2008).

As culturas podem estar presentes nos alimentos permitindo o seu consumo directo, vendidas em supermercados, ou sob a forma de suplementos alimentares, encontrados essencialmente em farmácias:

- Alimentos: iogurtes, leites fermentados, sobremesas à base de leite, leite em pó, queijos, sumos.
- Suplementos: tabletes, cápsulas, saquetas, suspensão em óleo.

No mercado, são encontrados produtos que formam pequenos “nichos”, sendo um mercado pouco desenvolvido e selecto, como é o caso da maionese, alimentos fermentados de origem vegetal, doces e pastilhas elásticas (Badaró, 2009; Madureia, 2005; Saxalin, 2008).

2.7 Desenvolvimento de um novo alimento probiótico

O desenvolvimento de novos produtos (DNP) é usado como uma estratégia competitiva e financeira para as empresas manterem o sucesso no mercado alimentar (Costa, 2006). Face ao estado actual do mercado alimentar, inovar mais do que uma opção, tornou-se uma necessidade. São muitos os aspectos que alteraram significativamente as escolhas dos consumidores actuais. A saúde pública, desenvolvimento e sustentabilidade são alguns dos exemplos que levam as indústrias a adaptarem-se às novas necessidades do mercado (Costa, 2006).

O mercado dos alimentos funcionais teve um crescimento considerável nos últimos anos, como observado e descrito atrás, tendo as suas vendas duplicado entre os anos de 2000 e 2005, encorajando as empresas a optarem por um desenvolvimento neste tipo de produtos (RTS, 2011).

O desenvolvimento de alimentos funcionais é um processo que envolve o cruzamento de conhecimento científico, comercial e regulamentar, cuja aceitabilidade por parte do consumidor se torna o factor determinante no sucesso do produto. O processo inicia-se com o aparecimento de um conceito científico, que após transformação num produto real e verificação dos seus efeitos biológicos, pode tornar-se, ou não, num alimento funcional (Gobbetti, 2010).

A busca do consumidor por alimentos probióticos aliada à evolução do mercado probiótico é uma prova da evolução das indústrias alimentares. Nos últimos anos a crescente tendência que tem sido verificada de lançamento de novos produtos

probióticos, aliada ao aumento do uso de diferentes estirpes probióticas e a busca por novas matrizes para a inoculação das culturas, dá ao mercado probiótico um futuro brilhante e promissor (Prado, 2010; Ukeyima, 2010).

2.7.1 Metodologia de Desenvolvimento de Novos Produtos Alimentares

O DNP pode ser definido como um processo organizacional no qual as informações sobre o mercado e os agentes são reunidos, difundidos, assimilados, resultando na forma de um novo produto ou serviço. Desta maneira, conhecimentos técnicos e de mercado são fundamentais para o desenvolvimento de novos produtos (Costa, 2006). A figura 6 demonstra o procedimento geral utilizado para o desenvolvimento de um novo produto probiótico.

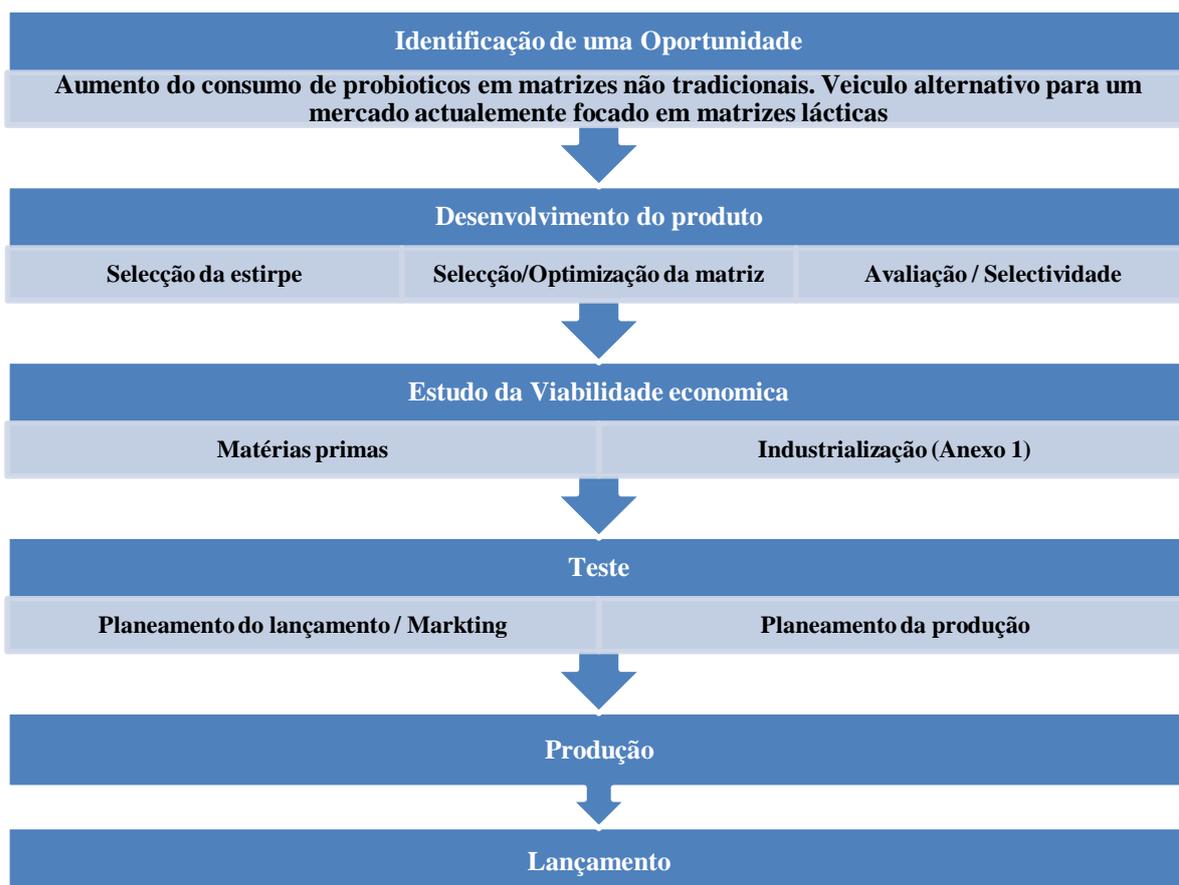


Figura 6 – Diagrama de desenvolvimento do produto probiótico.

2.7.2 Identificação da oportunidade

A identificação da oportunidade é um passo fundamental pois visa definir os mercados-alvo em que a empresa espera desenvolver esforços para criar ideias de produtos rentáveis que possam competir no mercado (Costa, 2006).

O mercado dos alimentos funcionais, nomeadamente dos alimentos contendo bactérias probióticas, promotoras da saúde e bem-estar, está em claro crescimento e desenvolvimento (figura 2), havendo uma forte investigação associada a este tema (Prado, 2008).

A venda de alimentos probióticos encontra-se centrada, como já foi referido, em alimentos lácteos, havendo uma grande pesquisa voltada para esta área. Actualmente verifica-se uma grande procura de alimentos com matriz não láctea, como se pode verificar na figura 7, sendo o segmento das bebidas e suplementos o que apresenta maior número de lançamentos, como demonstra a figura 8 (Rivera-Espinoza, 2010). Os sumos de fruta podem ser uma alternativa para a incorporação de probióticos uma vez que são ricos em nutrientes e açúcares e promovem uma imagem saudável (Shah, 2010).

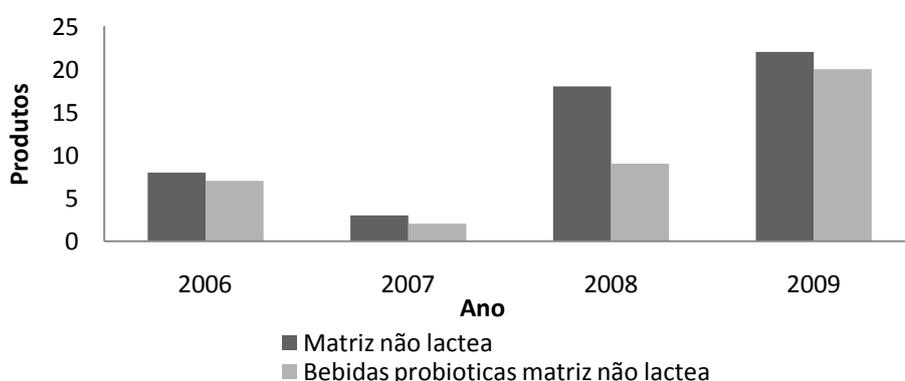


Figura 7- Lançamento de produtos probióticos de matriz não láctea vs. bebida matriz não láctea a nível mundial, de 2006 até 2009 (Innova, 2011).

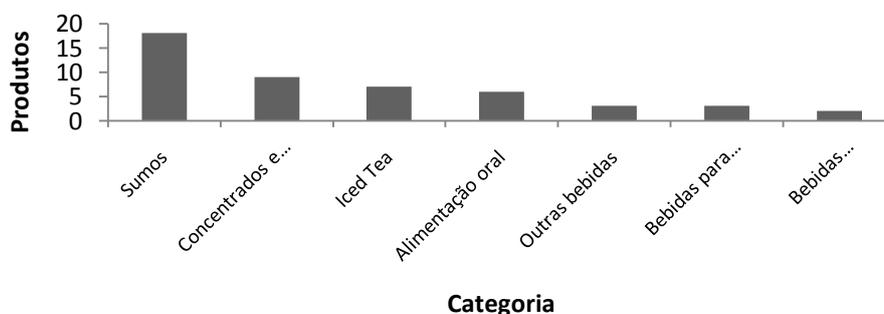


Figura 8 - Lançamento de produtos probióticos de matriz não láctea por categoria de mercado a nível mundial, de 2006 até 2009 (Innova, 2011).

As limitações das matrizes lácteas são uma oportunidade para o desenvolvimento de matrizes não-lácteas como veículo para probióticos.

A formulação da matriz alimentar usada é o factor tecnológico com mais influência na funcionalidade dos probióticos (Champagne, 2005). As indústrias probióticas encontram-se, actualmente, focadas principalmente nas matrizes à base de produtos lácteos, pois o leite apresenta uma excelente composição e qualidade nutricional, sendo uma fonte importante de alguns nutrientes como é o caso do cálcio, proteínas, fósforo e riboflavinas, tornando-se assim uma excelente matriz para o crescimento probiótico. De facto, o leite e os produtos derivados da sua fermentação têm uma grande contribuição para a dieta humana, sendo considerados bons produtos para a aceitação de probióticos por parte do consumidor (Rivera-Espinoza, 2010).

A fermentação constitui uma tecnologia de baixo custo que permite aumentar o tempo de conservação dos alimentos, aumentando o seu valor nutricional e as suas propriedades sensoriais. As bactérias lácticas são o grupo mais importante de microrganismos fermentativos presentes na fermentação láctica, sendo uma grande parte delas consideradas probióticos (Prado, 2008).

Os leites fermentados apresentam grandes benefícios para a saúde humana: para além de apresentar um grande número de bactérias fermentativas vivas apresenta, também, um elevado número de metabolitos da sua fermentação. Outros produtos fermentados têm sido usados como veículo para os probióticos, como é o caso do *boza*, *bushera*, *mahewu*, *pozol*, *togwa* e *kombucha* (Prado, 2008).

Como já foi referido, o maior volume de vendas de produtos probióticos encontra-se centrado, essencialmente, nas matrizes lácteas, na forma de leites fermentados e iogurtes, no entanto estas têm vindo a apresentar alguns inconvenientes face às matrizes não-lácteas (Rivera-Espinoza, 2010). O aumento do número de vegetarianos nos países desenvolvidos levou as indústrias a apostar em produtos vegetarianos como veículo para os probióticos.

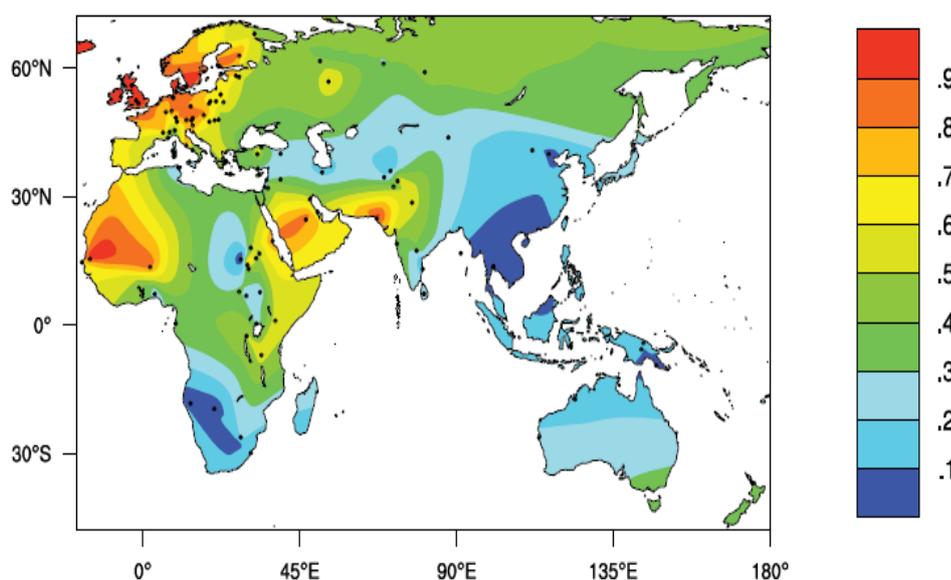


Figura 9 – Distribuição da população por índice de tolerância à lactose (Ital, 2010)

Alguns consumidores não ingerem produtos lácteos, ou por opção, por inacessibilidade dos produtos ou por impossibilidade como os intolerantes à lactose. O conteúdo de lactose e colesterol são dois inconvenientes para a saúde das matrizes lácteas. Como se pode verificar, a nível mundial 65% da população é intolerante à lactose, e nos países Asiáticos e Sul-Africanos este problema chega a atingir 90% da população (figura 9) (Ital, 2010; Prado, 2008; Rivera-Espinoza, 2010).

A evolução na indústria alimentar permitiu proceder a alterações estruturais em matrizes de fruta, tornando-as bons substratos para probióticos. Na sua constituição encontram-se nutrientes benéficos: minerais, vitaminas, fibras e antioxidantes. Há um grande interesse por parte das indústrias em desenvolver sumos de frutas funcionais com adição de probióticos, uma vez que, para além das desvantagens apresentadas anteriormente das matrizes lácteas, o seu perfil de consumo estende-se a um grande grupo etário, apelando ao consumo por todas as idades, estando associado a uma alimentação saudável e nutricionalmente correcta (Rivera-Espinoza, 2010). Tradicionalmente as matrizes de fruta são consideradas microbiologicamente seguras devido ao seu baixo pH e temperaturas de refrigeração e armazenamento, sendo estes dois factores importantes, agindo como barreira ao desenvolvimento e sobrevivência de bactérias patogénicas (Sheehan, 2007).

Os probióticos necessitam de um vasto conjunto de aminoácidos e vitaminas para crescerem, pelo que algumas estirpes possuem a capacidade de crescer em matrizes de fruta. Esta capacidade está dependente de algumas características, quer da cultura

probiótica, quer da fruta usada, como é o caso da estirpe, conteúdo de oxigénio, acidez do produto e substâncias anti-microbianas presentes (Rivera-Espinoza, 2010).

2.7.3 Smoothies

Uma dieta rica em fruta e vegetais é benéfica para a saúde e bem-estar, sendo sugerido um consumo de 5 a 6 porções por dia. Dificuldades no acesso e preparação são barreiras que levam a que estas quantidades de consumo não sejam realizadas considerando um estilo de vida essencialmente urbano. Uma forma alternativa de consumir fruta é através de bebidas, como por exemplo, os *smoothies*. A definição de smoothie ainda não se encontra bem definida, podendo-se definir smoothie como bebidas compostas por uma mistura de ingredientes incluindo polpa e sumo concentrado de fruta e em algumas circunstâncias gelo, leite e iogurte, sendo cada vez maior o seu consumo e popularidade. Em países como a República da Irlanda, o consumo de smoothies aumentou 214% entre 2002 e 2006, e no ano de 2008 o mercado dos smoothies correspondia a um valor de 354 milhões de euros.

Os smoothies encontram-se agrupados em três grandes grupos: fruta, fruta e leite e funcionais. A gama de smoothies funcionais encontra-se associada ao uso de probióticos, recentemente lançados no mercado, levando à criação de um *pipeline* de smoothies com valor acrescentado (Safe Food, 2009).

2.8 Selecção da estirpe probiótica

No mercado encontram-se disponíveis estirpes isoladas ou mistura de estirpes, estando o processo de optimização do crescimento dependente de cada estirpe. Diferentes microrganismos exibem diferentes padrões de sensibilidade a condições externas. O pH, acidificação, metabolitos, temperatura, secagem, armazenamento e sobrevivência ao trato gastrointestinal são algumas dessas condições (Champagne, 2005).

Os testes *in vitro* são muito úteis para a aquisição de conhecimentos a nível do mecanismo de acção e comportamento das bactérias. Por serem mais simples, constituem o primeiro passo no processo de avaliação de uma estirpe candidata potencial a probiótico. É possível prever a sua acção no corpo humano em inúmeros

aspectos como a resistência a sais biliares e adesão a células epiteliais, necessário para determinar a sua sobrevivência e mecanismo de acção (Saarela, 2000).

A selecção da estirpe probiótica que será adicionada ao produto, independentemente da sua natureza, é um passo crucial no seu desenvolvimento. A condição óptima de crescimento de uma estirpe probiótica situa-se entre uma temperatura de 35 °C e 40 °C e um pH de 4,5 a 6,4. Face a algumas condições desfavoráveis das matrizes usadas é possível promover a criação de uma barreira física como é o caso do alginato. Alguns estudos demonstraram que matrizes de fruta, como é o caso da maçã e do ananás, fornecem protecção aos probióticos em ambientes ácidos e ao vácuo. A selecção da estirpe usada, normalmente, encontra-se associada a testes prévios de selecção, nomeadamente a nível de sobrevivência. (Rivera-Espinoza, 2010; Saarela, 2000).

Existe um conjunto de critérios microbiológicos usados na selecção da estirpe, referindo-se a aspectos de segurança, tecnológicos, funcionais e critérios fisiológicos desejáveis (Saarela, 2000; Ukeyima, 2010; Vasiljevic, 2008):

Aspectos de segurança

- Origem
 - Estirpes preferencialmente de origem humana
 - Isoladas de tratos gastrointestinais saudáveis
- Patogenicidade (estatuto GRAS)
- Toxicidade
- Factores de virulência
 - Genes de resistência a antibióticos, actividade metabólica.

Aspectos Funcionais

- Tolerância ao Sistema Gastrointestinal (GI):
 - Tolerância ao ácido e ao suco gástrico - necessária para que o microrganismo passe o estômago no estado vivo.
 - Tolerância aos sais biliares - propriedade importante para a sobrevivência no intestino delgado.
- Aderência às células epiteliais e persistência ao trato gastrointestinal

- Efeitos benéficos para a saúde devidamente documentados.

Aspectos Tecnológicos

- Boas propriedades sensorias/aceitação sensorial
- Estabilidade
- Resistência a bacteriófagos
- Viabilidade durante o armazenamento
- Viabilidade no produto durante o armazenamento (baixas temperaturas, liofilização)
- Produção em larga escala/Fácil reprodutibilidade

Critérios fisiológicos desejáveis

- Imunomodulação
- Metabolismo da lactose
- Metabolismo do colesterol
- Propriedades anticarcinogênicas e antimutagênicas.
- Propriedades anti-bacterianas

No fabrico de alimentos probióticos, as culturas podem ser adicionadas juntamente com as culturas do processo fermentativo, como é o caso dos *Lactobacillus acidophilus*, ou adicionados posteriormente como aditivos alimentares, ex. *Bifidobacterium* spp., dado que a sua presença pode aumentar os níveis de segurança dos alimentos, face a contaminações externas. O número de células adicionadas deve ser superior ao final, para prevenir eventuais perdas durante o processamento e armazenamento (Champagne, 2005). Numa primeira abordagem, os probióticos são seleccionados com base não só em critérios funcionais, mas também considerando aspectos tecnológicos como o potencial rendimento durante o cultivo à escala industrial e a sobrevivência durante a concentração celular e liofilização (Vasiljevic, 2008). A estirpe probiótica usada irá afectar a qualidade final do produto dependendo do tipo e da quantidade de ácido e outros metabolitos que produziu (Kailasapathy, 2008).

Quando os probióticos são adicionados aos alimentos alguns factores que poderão afectar a sobrevivência ou actividade devem ser tidos em consideração:

- O estado fisiológico em que se encontra o microrganismo, fase exponencial ou estacionária;
- A concentração no momento de consumo;
- As condições físicas durante o armazenamento e conservação do produto;
- Composição do produto que será inoculado: pH, a_w , oxigenação, composição;
- Interação dos probióticos com as culturas já existentes (culturas de arranque).

O número de probióticos presente no alimento deve ser superior ao sugerido para que se verifique os efeitos benéficos a que se propõem. A compensação de eventuais perdas durante o processamento e o armazenamento dos alimentos, bem como a perda durante a passagem pelo trato gastrointestinal é fundamental (Vasiljevic, 2008). Para aumentar a sobrevivência e preservação das culturas podem ser adicionados ao meio compostos protectores, como crioconservantes e solutos compatíveis (Donkor, 2007; Vasiljevic, 2008).

2.9 Análise sensorial

A análise sensorial tem sido aplicada no desenvolvimento e optimização dos produtos, no controlo da qualidade, em estudos de armazenamento e no desenvolvimento de processos (Lawness, 1998). A análise sensorial obteve uma grande evolução na segunda metade do século XX com a evolução da indústria alimentar, para a obtenção de características sensoriais sobre os seus produtos. É um método científico usado para medir, analisar e interpretar as respostas ao produto como ele é perceptivo pelos sentidos: visão, olfacto, tacto, paladar e audição (Lawness, 1998).

As propriedades sensoriais dos alimentos são muito importantes, uma vez que em conjunto com os parâmetros químicos e microbiológicos determinam a aceitação do consumidor (Murray, 2001). Os métodos sensoriais podem ser classificados da seguinte forma (Lawness, 1998; Koeflerli, 1998):

- Testes discriminativos: usados para medir diferenças entre um conjunto de amostras, método analítico;
- Teste descritivo: usado para descrever e quantificar diferenças e similaridades entre as amostras nas suas características sensoriais, método analítico;
- Testes afectivos ou de preferência: determina a preferência e os dados hedónicos, bem como as expectativas do produto, método hedónico.

Dentro dos testes discriminativos, realce é dado aos testes triangulares, no qual é feita uma discriminação do produto que apresente uma característica diferente, num total de três amostras (Lawness, 1998). A norma associada a este tipo de testes é a ISO 4120.

Algumas estirpes probióticas, ao serem adicionadas a sumos podem desenvolver um conjunto de aromas e *flavours* indesejáveis (*off-flavours*). Um caso é o estudo sensorial realizado por Rivera-Espinoza (2010) em que os consumidores mostraram preferência pelos sumos convencionais face aos sumos probióticos. No entanto, curiosamente, quando informados sobre os efeitos benéficos dos produtos probióticos suas preferências recaíram sobre o sumo probiótico.

3 Material e Métodos

3.1 Preparação da cultura probiótica

Um pré-inoculo da cultura *L. rhamnosus* R11 (Institut Rossell, Lallemand Inc., Montreal, QC; Canada) foi inicialmente preparado, transferindo 0,1 g de células liofilizadas para 100 mL de meio selectivo de Man, Rogosa e Sharp (MRS) (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Itália), suplementado com 0,1 % Tween 80 (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Itália), em condições de assepsia (câmara de fluxo laminar). Efectuaram-se duas transferências prévias (5% v/v) no mesmo meio para preparação do meio de cultura final, incubando a 37 °C durante 18 horas. As células foram centrifugadas (HETTICH Universal 320R; 3,875 RCF, 15 min, 4 °C) e lavadas duas vezes em ¼ solução de Ringer (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.2 Preparação dos smoothies

A formulação dos smoothies usados foi desenvolvida pela Frulact Nutrição, sendo comercializados sob a marca FRU. A sua constituição encontra-se presente nas tabelas 6, 7 e 8. Estes smoothies foram utilizados nos estudos destinados a avaliar a viabilidade da estirpe.

Tabela 6- Formulação dos smoothies de manga.

Ingredientes	Percentagem
Água fria	58,87
Concentrado puro de manga	22,00
Polpa banana acidificada asséptica	12,00
Concentrado sumo maçã	4,00
Concentrado sumo laranja	2,54
Concentrado sumo limão	0,59

Tabela 7 - Formulação dos smoothies de banana.

Ingredientes	Percentagem
Água fria	58,53
Polpa banana acidificada asséptica	30,00
Concentrado sumo maçã	7,60
Concentrado sumo laranja	3,87

Tabela 8 - Formulação dos smoothies de banana-morango.

Ingredientes	Porcentagem
Água fria	37,66
Polpa banana acidificada asséptica	20,00
Concentrado sumo maçã	5,28
Concentrado sumo laranja	1,70
Concentrado sumo groselha negra	0,36
Morango IQF> 25MM	35,00

Nota: IQF> 25MM, o morango inteiro é passado num crivo, para que no final os pedaços não excedam o tamanho de 25 mm.

Após pesagem dos ingredientes, considerando um volume total de 3 Litros por smoothie, procedeu-se à homogeneização com varinha eléctrica antes da transferência para o reactor perfeitamente agitado (RPA), com uma capacidade máxima de 10 L de volume. No RPA o preparado foi agitado e homogeneizado durante 2-3 minutos pasteurizando a $95^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$, com 3-5 minutos de tempo de *holding*. No total, prepararam-se triplicados de cada smoothie (200 mL/garrafa), em condições de assepsia. Os smoothies foram arrefecidos em água fria, mantendo-os a $37^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ até à inoculação.

3.2.1 Análise da viabilidade por variações de pH

Foi testada a viabilidade da estirpe para três versões diferentes do smoothie, procedendo-se à determinação da variação do pH (versão padrão da marca FRU, 3,2 e 3,6). Foram utilizados smoothies com pH 3,4 para a realização de uma análise sensorial. Os smoothies foram preparados de acordo com o ponto anterior, procedendo a alterações na formulação, como pode ser observado nas tabelas 9-14.

Tabela 9- Formulação dos smoothies de manga para pH = 3,2.

Ingredientes	Porcentagem
Água fria	59,17
Concentrado puro de manga	21,00
Polpa Banana acidificada asséptica	12,06
Concentrado sumo maçã	2,50
Concentrado sumo laranja	1,54
Concentrado sumo limão	3,73

Tabela 10- Formulação dos smoothies de manga para pH = 3,4.

Ingredientes	Percentagem
Água fria	58,69
Concentrado puro de manga	22,00
Polpa banana acidificada asséptica	11,97
Concentrado sumo maçã	3,00
Concentrado sumo laranja	2,44
Concentrado sumo limão	1,90

Tabela 11- Formulação dos smoothies de manga para pH = 3,6.

Ingredientes	Percentagem
Água fria	58,70
Concentrado puro de manga	22,00
Polpa banana acidificada asséptica	12,01
Concentrado sumo maçã	3,56
Concentrado sumo laranja	2,54
Concentrado sumo limão	1,19

Tabela 12 - Formulação dos smoothies de banana para pH = 3,2.

Ingredientes	Percentagem
Água fria	60,45
Polpa banana acidificada asséptica	27,45
Concentrado sumo maçã	5,00
Concentrado sumo laranja	3,00
Concentrado sumo limão	4,10

Tabela 13 - Formulação dos smoothies de banana para pH = 3,4.

Ingredientes	Percentagem
Água Fria	59,73
Polpa banana acidificada asséptica	28,45
Concentrado sumo maçã	6,11
Concentrado sumo laranja	3,51
Concentrado sumo limão	2,20

Tabela 14 - Formulação dos smoothies de banana para pH = 3,6.

Ingredientes	Percentagem
Água fria	58,78
Polpa banana acidificada asséptica	29,61
Concentrado sumo maçã	6,10
Concentrado sumo laranja	3,87
Concentrado sumo limão	1,64

3.3 Inoculação e armazenamento dos smoothies

Cada smoothie de 200 mL (figura 10) foi inoculado, assepticamente, com 2 mL (1% v/v) de inóculo de *L. rhamnosus* R11, concentrado por centrifugação de forma a garantir uma concentração final de 10^8 - 10^9 CFU/mL. Após agitação manual uniformizada, procedeu-se ao armazenamento a 5 ± 2 °C durante 40 dias. Em períodos regulares (dias 0, 14, 28, 42, 80, 100 e 150) foram retiradas amostras de cada smoothie em triplicado para as análises físico-químicas e microbiológicas.



Figura 10 - Preparação dos smoothies para inoculação.

3.4 Análises microbiológicas

3.4.1 Quantificação de células viáveis

A contagem de células viáveis foi determinada através da contagem de CFU, obtidas pela preparação de diluições decimais seriadas em $\frac{1}{4}$ de solução Ringer e subsequentemente plaqueadas em meio selectivo MRS (duplicado), utilizando a técnica da gota de Miles and Misra (1938). A figura 11 mostra a preparação do material para a realização das diluições decimais e plaqueamento das bactérias viáveis. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 / 48 h.



Figura 11 - Preparação do material para realização de diluições decimais e parqueamento da cultura.

3.4.2 Simulação do trato gastro-intestinal

Os smoothies probióticos (banana e manga), inoculados previamente com a cultura probiótica (2% v/v), foram diluídos (10% v/v) utilizando como meio de diluição solução de Ringer (Merck, Darmstadt, Alemanha), sendo posteriormente agitados durante 2 minutos no vortex (VWR International, West Chester, EUA). Procedeu-se ao ajuste do pH para valores compreendidos entre 1,5-2,0 (Tabela 15) por adição de uma solução de ácido clorídrico 10 M (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os homogeneizados foram incubados a 37 °C, durante 60 minutos e 120 minutos, simulando, respectivamente, uma digestão estomacal mais rápida e uma lenta. Inicialmente, retirou-se uma amostra para contagem de células viáveis e determinação do pH. A contagem de células viáveis foi determinada através da preparação de diluições decimais seriadas em $\frac{1}{4}$ de solução Ringer, subseqüentemente plaqueadas em meio selectivo MRS (duplicado), utilizando a técnica da gota (Miles and Misra, 1938). As placas foram incubadas a 37 °C durante 24-48 h. A determinação do pH foi realizada utilizando um potenciômetro pH 210 (HANNA Instruments, USA).

Decorridos os tempos de exposição às condições gástricas, adicionou-se aos homogeneizados uma solução estéril (por filtração) de sais biliares 0.3 % (w/v) (Bile salts No.3, Difco, Kansas, EUA), ajustando o pH para valores entre 6,0 - 6,2 (tabela 15) utilizando uma solução de hidróxido de sódio 1 M (AppliChem, Darmstadt, Alemanha). Os homogeneizados previamente sujeitos a ambiente ácido, foram incubados por mais 120 minutos a 37 °C. Procedeu-se à contagem de células viáveis e determinação do pH

tal como descrito anteriormente. Os ensaios foram realizados em duplicado para cada amostra.

Tabela 15- Condições usadas na simulação do sistema GI.

Comportamento	Condições	pH Final	Tempo (minutos)	Adaptado de:
Estômago	HCl 1,0 M	1,5 – 2,0	60	Aura <i>et al.</i> (2005)
(37°C)			120	
Duodeno	Solução de sais biliares [0.3%]	6,0 – 6,2	120	Laurent <i>et al.</i> (2007)
(37°C)				

3.5 Análises físico-químicas

3.5.1 Determinação do pH e teor de sólidos solúveis

O pH e o teor de sólidos solúveis (TSS), medido em °Brix, foram medidos em todas as amostras. Para medir o pH foi usado o potenciômetro pH 210 (HANNA Instruments, USA). Para determinação do TSS foi utilizado com um refractômetro automático GPR 12-70 (Index Instruments, Kissimme, USA). As análises foram realizadas em triplicado.

3.5.2 Determinação da actividade da água

A actividade da água foi determinada usando um medidor Hygrolab 3 (Rotronic, Bassersdorf, Suíça) equipado com uma sonda AW-DI0. As amostras foram climatizadas em copos de 40 mL (Wp-40), à temperatura ambiente (20±2 °C).

3.5.3 Determinação da cor

A avaliação da cor foi realizada utilizando um colorímetro ColorQuest XE (Hunter Associates Laboratory, Virgínia, USA) ligado a um computador pessoal (Pentium III, 868 MHz) equipado com o software Easymatch QC v3.84. Foram obtidos os parâmetros L (luminosidade), a e b (coordenadas de cromaticidade). As coordenadas

de cromaticidade, a e b, referem-se respectivamente a: +a está na direcção do vermelho, -a está na direcção do verde, +b está na direcção do amarelo e -b está na direcção do azul. O centro (0,0) é acromático e à medida que os valores de a e b alteram-se há uma movimentação do ponto para fora do centro, aumentando saturação da cor (figura 12). O valor de L indica a luminosidade, que varia entre valores de 0 e 100, sendo denominado “preto” e “branco” respectivamente (Minolta, 1994). Esta análise foi realizada em triplicado para cada smoothie. As coordenadas a e b foram convertidas em croma e tonalidade através das fórmulas: $h^\circ = \arctan b^*/a^*$ e $C^* = (a^2 + b^2)^{1/2}$.

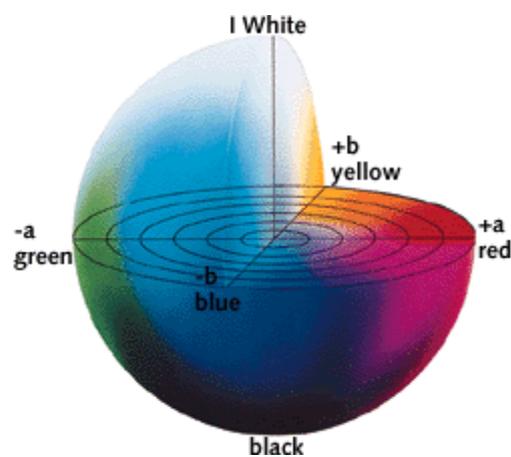


Figura 12 – A esfera de cores CIELAB (retirado de www.linocolor.com)

3.5.4 Determinação da viscosidade

A viscosidade aparente foi medida em aproximadamente 150 mL de smoothie probiótico, à temperatura ambiente com um viscosímetro digital DV – II Pro (Brookfield Engineering Laboratories, Stoughton, USA) equipados com uma *spindle* no.5 com uma velocidade constante de 20 rpm. Os dados da viscosidade foram obtidos através de um computador pessoal (Pentium III, 860 MHz) equipado com o software Wingather v2.5. Foram realizadas três leituras independentes.

3.1 Análise sensorial

3.1.1 Teste triangular

Os smoothies foram submetidos à avaliação sensorial por um painel de 30 provadores não treinados no Laboratório de Inovação e Desenvolvimento (I&D) da Frulact, de acordo com a norma ISO 4120. Neste teste foi utilizada apenas uma apresentação das amostras com duas unidades da versão A (versão não probiótica) e uma unidade da versão B (probiótica), sendo as amostras apresentadas em três sequencias diferentes BAA, ABA e AAB. Foram apresentadas aos provadores três amostras codificadas por três algarismos aleatórios variáveis entre os diferentes provadores, como se apresenta no anexo 1, sendo-lhes indicado que uma seria diferente das outras duas. Os provadores receberam aproximadamente 20 mL de cada amostra, servidas a uma temperatura entre 4 - 8 °C em copos de plástico descartáveis com capacidade para 50 mL. Foi solicitada a identificação da amostra diferente.

Foram realizados três testes, sendo utilizada a formulação padrão com três tempos diferentes de inoculação (0, 14, 28).

3.1.2 Teste preferência

Para verificar a aceitabilidade dos smoothies por parte do consumidor foi realizado um teste de *ranking*. O teste de preferência foi realizado por um painel não treinado de 54 provadores na Universidade de Aveiro.

Foram apresentadas aos provadores, 4 amostras diferentes contendo 2 versões diferentes do smoothie probiótico de manga e banana (padrão e com pH de 3,4) com 28 dias de inoculação, codificadas por uma sequência de 3 números aleatórios, contendo aproximadamente 20 mL de cada amostra, servidas a uma temperatura entre 4 - 8°C em copos de plástico branco descartáveis com capacidade para 50 mL. Foi pedido aos provadores que procedessem ao preenchimento de um questionário (Anexo 2 – Questionários da análise sensorial).

3.1.3 Teste de aceitabilidade

O teste de aceitabilidade dos smoothies foi realizado também na Universidade de Aveiro, utilizando um painel não treinado de 80 provadores.

Foram realizados 6 testes, sendo apresentado aos provadores 2 amostras, contendo 2 versões do smoothie de manga e de banana, uma padrão e uma acidificada, com três diferentes tempos de inoculação (0, 14, 28). As amostras encontravam-se codificadas por uma sequência de 3 números aleatórios, contendo aproximadamente 20 mL de cada amostra, servidas a uma temperatura entre 4 - 8°C em copos de plástico descartáveis com capacidade para 50 mL. Foi pedido aos provadores que procedessem ao preenchimento de um questionário (Anexo 2 – Questionários da análise sensorial).

3.2 Análise estatística

Os dados foram sujeitos a análise de variância (ANOVA) com um factor para avaliar o efeito da variável independente (tipo de smoothie) nos atributos físico-químicos e microbiológicos. A separação de médias foi efectuada através do teste de Duncan para o nível $\alpha=0.05$. A análise foi realizada com recurso ao programa SPSS (versão 19.0, Chicago, IL, USA). Os valores apresentados são a média e os respectivos desvios padrões.

4 Resultados e discussão

Para verificar a viabilidade da cultura e a sua influência nos parâmetros físico-químicos e sensoriais nos smoothie foram realizados 4 ensaios com objectivos distintos (tabela 16).

Tabela 16 - Datas de início, fim e denominação atribuída aos ensaios efectuados.

	Início	Fim	Denominação do Ensaio
1º Ensaio	11 de Outubro de 2010	25 de Janeiro de 2011	Preliminar
2º Ensaio	13 de Dezembro de 2010	27 de Abril de 2011	Viabilidade
3º Ensaio	17 de Março de 2011	28 de Abril de 2011	Acidificação
4º Ensaio	5 de Abril de 2011	3 de Maio de 2011	Análise sensorial

Inicialmente foi realizado um ensaio preliminar, no qual se pretendeu obter resultados indicativos referentes à viabilidade da cultura e aos parâmetros físico-químicos dos smoothies probióticos utilizando duas matrizes com a formulação da marca FRU, manga e morango-banana, e uma matriz com uma formulação nova, ou seja banana.

Face aos resultados obtidos, foi realizado um segundo ensaio no qual se pretendeu, não só testar a viabilidade e monitorizar os parâmetros físico-químicos ao longo de 150 dias, mas também a resistência ao sistema GI simulado e a realização de uma análise sensorial prévia (teste triangular, smoothies probiótico *versus* smoothies não inoculados) durante o período de *shelf life* do produto. Neste ensaio abdicou-se, por uma questão de logística, da matriz de morango-banana.

Os smoothies apresentaram uma diferença significativa, ao longo do tempo, no sabor, devido ao processo fermentativo realizado pelo *L. rhamnosus* R11. Procedeu-se à realização de um terceiro ensaio, variando o pH dos smoothies, através da combinação de polpas e concentrados de fruta, de forma a tentar mascarar o sabor provocado pela fermentação. Neste ensaio foram monitorizados os parâmetros físico-químicos e a viabilidade das culturas em três ambientes com valores pH's distintos: $3,2 \pm 0,1$; $3,4 \pm 0,1$ e normal de cada smoothies (banana $4,1 \pm 0,2$ e manga $3,7 \pm 0,2$).

O quarto ensaio teve como objectivo obter uma avaliação da aceitabilidade e preferência que os smoothies reuniam junto dos possíveis consumidores, sendo conduzidos dois tipos de testes sensoriais: preferência e aceitabilidade, utilizando os smoothies de manga e banana com dois valores de pH diferentes (3,4 e o normal de cada smoothie) com três tempos distintos de inoculação (0, 14 e 28 dias).

4.1 Análise Microbiológica

4.1.1 Quantificação de células viáveis

A estirpe *L. rhamnosus* R11, inoculada nos smoothies da marca FRU, apresentou uma estabilidade na viabilidade ao longo de quarenta e dois dias de armazenamento, tempo correspondente ao primeiro ensaio (tabela 17). Inicialmente o ensaio pretendia ter a duração de 42 dias, representando mais 12 dias do que o pretendido para o *shelf-life* dos smoothies, mas face aos resultados de viabilidade obtidos e sendo este um ensaio preliminar, optou-se por adiar as análises microbiológicas e físico-químicas do smoothie de banana-morango para uma data posterior, aproximadamente ao fim de 100 dias após a inoculação.

A taxa de inoculação, valor de CFU / mL correspondente à quantidade de cultura probiótica viável inoculada, correspondente ao T0 na tabela 17, foi significativamente diferente entre os smoothies ($P > 0,05$), sendo superior no smoothie de banana-morango, com uma taxa de inoculação $1,51 \times 10^9$ CFU/mL, seguindo-se o de banana com $5,54 \times 10^8$ CFU/mL, e por fim o de manga com $1,95 \times 10^8$ CFU/mL.

A estirpe presente nos smoothies de banana e manga manteve o número celular estável, apresentando uma flutuação máxima de 0,2 Log, ao longo dos 42 dias de armazenamento. Observou-se a perda de 1,14 ciclos logarítmicos ao fim de 100 dias por parte da cultura inoculada no smoothie de banana-morango, tendo ocorrido esta perda após 28 dias da inoculação.

Yoon (2005) afirma que o produto deve conter um número significativo de bactérias viáveis para obter os efeitos benéficos máximos, sendo esse número superior a 10^6 CFU/mL. Os resultados preliminares mostraram que os smoothies contêm a estirpe probiótica em número suficiente para promover os efeitos terapêuticos máximos a que se propõem para a saúde do consumidor, mesmo após 42 dias de armazenamento, mais 12 dias do que o pretendido para o tempo de vida útil do produto (Rivera, 2010).

Tabela 17 – Variação do número de células viáveis (Log (CFU) / mL) de *L. rhamnosus*. R11 nos diferentes smoothies ao longo do período de armazenamento do primeiro ensaio.

Tempo (dias)	Manga	Banana	Banana - Morango
0	8,27 ± 0,15 ^c	8,74 ± 0,08 ^b	9,18 ± 0,03 ^a
7	8,13 ± 0,10 ^c	8,82 ± 0,15 ^b	9,16 ± 0,02 ^a
14	8,18 ± 0,15 ^c	8,84 ± 0,02 ^b	9,08 ± 0,09 ^a
21	8,38 ± 0,50 ^c	8,94 ± 0,02 ^b	9,02 ± 0,09 ^a
28	8,22 ± 0,02 ^c	8,83 ± 0,00 ^b	9,12 ± 0,02 ^a
42	8,24 ± 0,40 ^c	8,71 ± 0,13 ^b	-
100	-	-	8,14 ± 0,15 ^a

Valores da mesma linha seguidos da mesma letra não são estatisticamente diferentes ao nível $\alpha=0.05$, pelo teste de separação de média de Duncan.

No segundo ensaio promoveu-se a validação dos resultados da viabilidade obtidos no primeiro ensaio. A viabilidade foi testada ao longo de 150 dias nas matrizes de manga e banana. Verificou-se que a taxa de inoculação foi novamente superior no smoothie de banana, 9,05 Log (CFU) / mL, apresentando o smoothie de manga um valor de 8,79 Log (CFU) / mL. No anexo 3 encontram-se as médias e os desvios padrões das contagens realizadas ao longo do tempo de armazenamento para as duas matrizes probióticas.

Tabela 18 - Variação da média número de células viáveis (Log (CFU's) / mL) de *L. rhamnosus* R11 nos smoothies de manga e banana ao longo de 150 dias, correspondente ao segundo ensaio.

Tempo (dias)	Manga	Banana
0	8,79 ± 0,05	9,05 ± 0,05
14	8,77 ± 0,02	9,40 ± 0,06
28	9,12 ± 0,07	9,30 ± 0,14
42	9,14 ± 0,10	9,29 ± 0,05
80	9,08 ± 0,10	8,98 ± 0,05
100	9,02 ± 0,11	8,83 ± 0,07
150	8,33 ± 0,10	7,85 ± 0,06

As matrizes de fruta podem criar um efeito antimicrobiano sobre algumas estirpes bacterianas. Nas tabelas 19 e 20 apresenta-se uma estimativa à quantidade de ácidos presentes nos smoothies de fruta, com variações do pH, tendo em consideração a percentagem de cada fruta presente nos smoothies, obtido a partir de uma fonte bibliográfica (Souci, 2008). Verifica-se a presença de uma grande concentração de ácidos, sendo o ácido málico e o cítrico os ácidos que se encontram em maior

quantidade nos smoothies. A estirpe revelou estabilidade à presença destes ácidos durante 150 dias, revelando-se robusta para este tipo de matrizes, mantendo a sua viabilidade durante os 150 dias de armazenamento. Yoon (2004) comentam que a redução do pH do meio e a produção e acumulação de ácidos orgânicos provenientes da fermentação são os principais factores que contribuem para a perda da viabilidade das estirpes probióticas, sendo que para esta estirpe nas duas matrizes de usadas não se verificou esta acção.

Tabela 19 – Quantidade de ácidos orgânicos presentes no smoothie de banana com três pH's diferentes (adaptado de Souci, 2008).

Ácido	Maçã	Banana	Laranja	Limão	Smoothie de banana		
					pH 3,2	pH 3,4	Normal
Málico (mg/100g)	420,00	360,00	89,00	200,00	293,02	306,55	327,82
Cítrico (mg/100g)	30,00	201,00	1027,00	4683,00	1351,68	873,73	309,04
Oxálico (mg/100g)	0,50	0,00	0,00	0,00	0,16	0,19	0,24
Clorogénico (mg/100g)	7,80	0,00	0,00	0,00	2,44	2,98	3,71
Ferúlico (mg/100g)	0,60	0,00	1,00	1,40	0,69	0,61	0,51
Cafeico (mg/100g)	8,00	0,00	5,00	2,10	3,88	4,36	4,94
<i>p</i> -Coumárico (mg/100g)	2,00	0,00	0,50	0,60	0,86	0,94	1,06
Salicílico (mg/100g)	0,31	0,00	2,40	0,18	0,56	0,64	0,70
Acético (mg/100g)	0,00	7,80	0,00	0,00	2,14	2,22	2,34

Tabela 20 - Quantidade de ácidos orgânicos presentes no smoothie de manga a três valores de pH diferentes (adaptado de Souci, 2008).

Ácido (mg/100g)	Maçã	Banana	Manga	Laranja	Limão	Smoothie de manga		
						pH 3.2	pH 3.4	Normal
Málico (mg/100g)	420,00	360,00	74,00	89,00	200,00	190,66	188,91	199,41
Cítrico (mg/100g)	30,00	201,00	264,00	1027,00	4683,00	1227,30	801,46	426,02
Oxálico (mg/100g)	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,09	0,13
Clorogénico (mg/100g)	7,80	0,00	0,00	0,00	0,00	1,22	1,46	1,95
Ferúlico (mg/100g)	0,60	0,00	0,00	1,00	1,40	0,48	0,41	0,34
Cafeico (mg/100g)	8,00	0,00	0,00	5,00	2,10	2,15	2,45	2,81
Para-Coumárico (mg/100g)	2,00	0,00	0,00	0,50	0,60	0,49	0,51	0,59
Salicílico (mg/100g)	0,31	0,00	0,11	2,40	0,18	0,35	0,47	0,49
Acético (mg/100g)	0,00	7,80	0,00	0,00	0,00	0,94	0,93	0,94
Succínico (mg/100g)	0,00	0,00	40,00	0,00	0,00	16,80	17,60	17,60
Glicólico (mg/100g)	0,00	0,00	61,00	0,00	0,00	25,62	26,84	26,84

A temperatura de inoculação da cultura (37 ± 2 °C) pode estar na origem da manutenção da viabilidade da cultura ao longo do período de armazenamento. As estirpes probióticas apresentam melhores índices de viabilidade se inoculadas a uma temperatura próxima da sua temperatura óptima de crescimento (Champagne, 2008).

Champagne (2008), utilizando como matriz um sumo comercial denominado “Oásis”, testou a viabilidade de várias estirpes comerciais probióticas. As estirpes *L. acidophilus* LB2 e *L. acidophilus* LB3 revelaram possuir uma baixa estabilidade, sendo que ao fim de 80 dias de armazenamento o número de células viáveis havia sido reduzido em 5 Log, aproximadamente. As estirpes *L. rhamnosus* LB11, *L. reuteri* LB38 e *L. plantarum* LB42 por seu lado apresentaram uma maior viabilidade (contagem média acima de 10^6 CFU/mL) ao longo de 80 dias de armazenamento a 4 °C no mesmo sumo. A estirpe *L. rhamnosus* LB1, que face à sua origem e denominação será a mesma

utilizada neste trabalho, foi a que apresentou maior viabilidade na matriz ao longo do período de armazenamento.

Champagne e tal (2008) estudaram a viabilidade de *L. rhamnosus* R11 num sumo de fruto feito à base de maçã. Ao fim de 4 semanas armazenadas, com refrigeração, a estirpe presente no sumo mantinha a sua viabilidade, com valores tipicamente acima de 10^9 CFU/mL, sendo que a viabilidade diminuía ao longo das semanas seguintes.

A viabilidade de *L. acidophilus* em matrizes de fruta foi testada por Burit (2007). Este observou que ao longo do período de refrigeração a viabilidade diminui, observando que a adição de frutas a matrizes probióticas deve ser correctamente realizada, uma vez que estas podem exercer um efeito antimicrobiano sobre as estirpes.

Yoon (2005) avaliou a viabilidade de três espécies de *Lactobacillus* (*casei*, *plantarum* e *delbrueckii*) num sumo fermentado de beterraba. Após armazenamento a 4 °C, a viabilidade das estirpes ia diminuindo, mas mantendo contagens superiores a 10^8 CFU/mL.

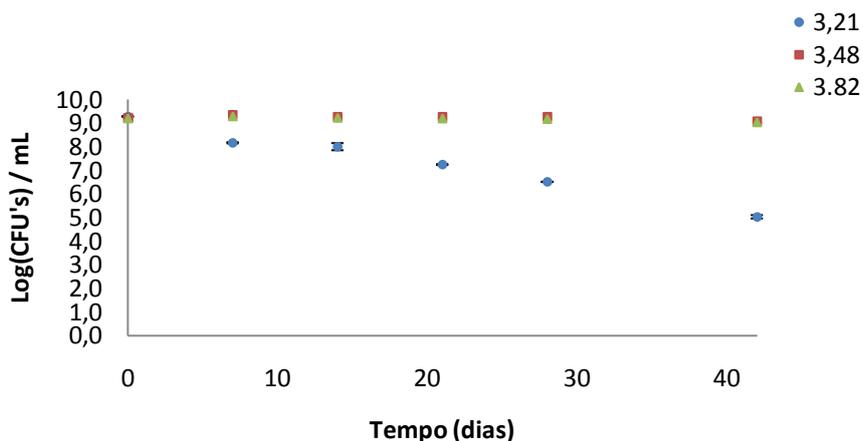


Figura 13 – Variação dado número de células viáveis (Log (CFU) / mL) do *L. rhamnosus* R11, durante o terceiro ensaio, no smoothie de manga com três valores diferentes de pH ao longo de 42 dias de armazenamento.

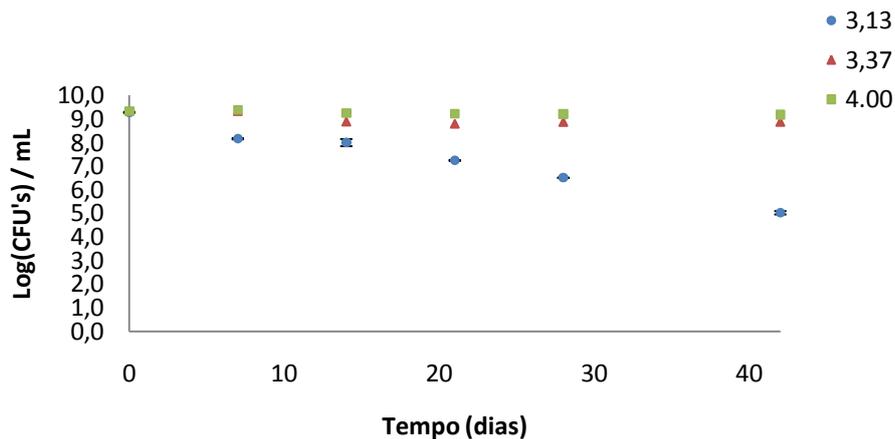


Figura 14 - Variação do número de células viáveis (Log (CFU) / mL) do *L. rhamnosus* R11, durante o terceiro ensaio, no smoothie de banana com três valores diferentes de pH ao longo de 42 dias de armazenamento.

De forma a testar a viabilidade da estirpe *L. rhamnosus* R11 a diferentes valores de pH, sendo os smoothies reformulados de forma a obterem-se três valores diferentes de pH, valores que deveriam ser próximos de 3,2; 3,4 e o valor normalmente apresentado pelo smoothie (controlo). O valor para o pH foi escolhido face ao decréscimo do pH obtido nas análises físico-químicas. O pH apresenta um decréscimo até valores compreendidos entre 3,2 e 3,4 estabilizando nestes valores ao longo do tempo de armazenamento.

As figuras 13 e 14 representam a viabilidade da estirpe ao longo de 42 dias de armazenamento. A viabilidade não sofreu alterações significativas ($P > 0,05$) para o pH de 3,4 e normal (3,82 manga e 4,00 banana), sendo que a 3,2 a estirpe apresentou perda de viabilidade significativa. No smoothie de manga esta perda foi de 4,2 ciclos logarítmicos e na banana esta perda foi de 4,3 ciclos (figuras 13 e 14).

Sheehan (2007) testou a viabilidade de 5 estirpes de *Lactobacillus* e uma de *Bifidobacterium* em duas matrizes de sumos, laranja e ananás, diferindo entre si no pH, 3,65 e 3,40 respectivamente. Apenas a estirpe *L. paracasei* NFBC 43338 apresentou um comportamento semelhante nas duas matrizes, sendo que as restantes estirpes apresentaram uma redução da viabilidade mais acentuada na matriz ananás, que possuía o pH mais baixo.

4.1.2 Simulação do trato gastrointestinal (GI)

Os smoothies probióticos contendo a estirpe *L. rhamnosus* R11 foram submetidos a dois tipos diferentes de simulação de digestões: uma rápida e uma lenta. Inicialmente os smoothies foram colocados em contacto com um ambiente ácido, simulando a presença no estômago, sendo no tempo de exposição a este ambiente que se encontra a diferença dos dois tipos de digestão (rápida e lenta). Posteriormente o meio foi alcalinizado, seguindo-se a adição de sais biliares, simulando a exposição ao ambiente encontrado no duodeno, nomeadamente a libertação dos sais biliares.

Antes de chegarem ao intestino, as bactérias devem ser capazes de sobreviver às condições rigorosas de pH (1,5 – 2,0) apresentadas no estômago e à presença dos sais biliares segregados pelo fígado. As figuras 15-18 mostram a variação no número de células viáveis da estirpe em contacto com um pH de valor aproximadamente 2,0, e dos sais biliares (0.3%), a um valor de pH de 6,0-6,2.

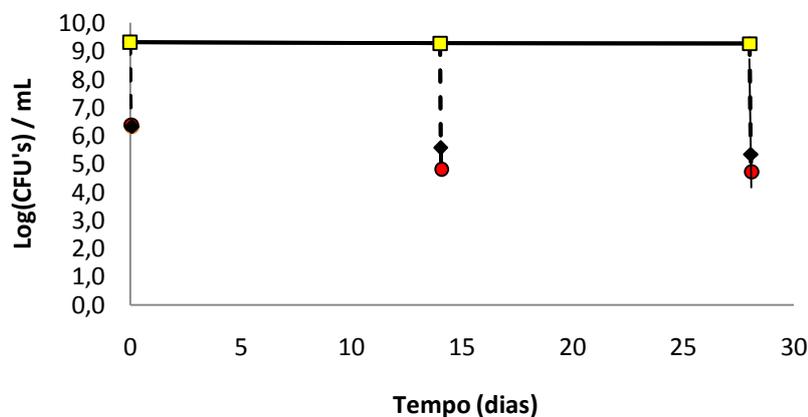


Figura 15 – Simulação da passagem do smoothie probiótico de banana no trato GI, simulando uma digestão rápida para o smoothie de banana. (■ - células viáveis presentes no smoothie ◆ - células viáveis após exposição ao ambiente ácido ● - células viáveis após exposição aos sais biliares).

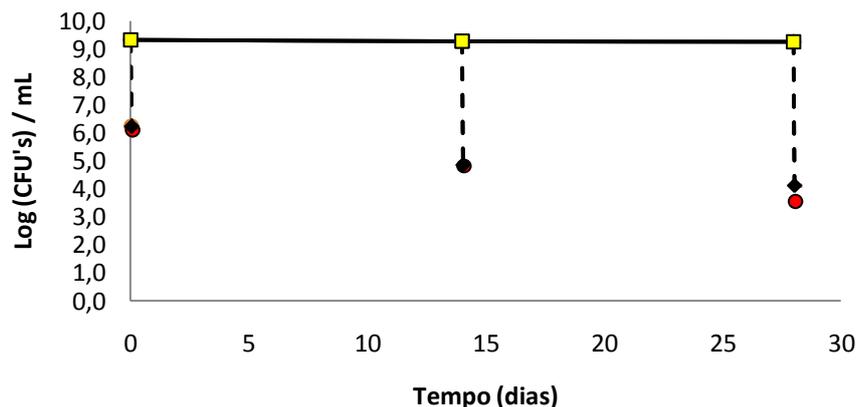


Figura 16 - Simulação da passagem do smoothie probiótico de banana no trato GI, simulando uma digestão lenta para o smoothie de banana. (■ - células viáveis presentes no smoothie ◆ - células viáveis após exposição ao ambiente ácido ● - células viáveis após exposição aos sais biliares).

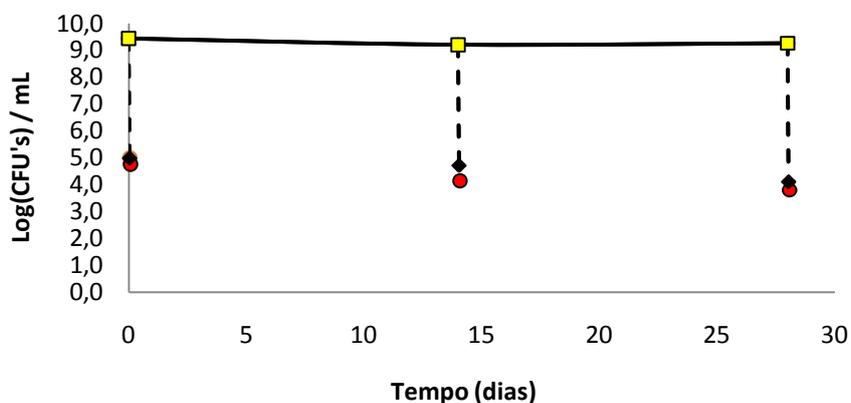


Figura 17 - Simulação da passagem do smoothie probiótico de manga no trato GI, simulando uma digestão rápida para o smoothie de manga (■ - células viáveis presentes no smoothie ◆ - células viáveis após exposição ao ambiente ácido ● - células viáveis após exposição aos sais biliares).

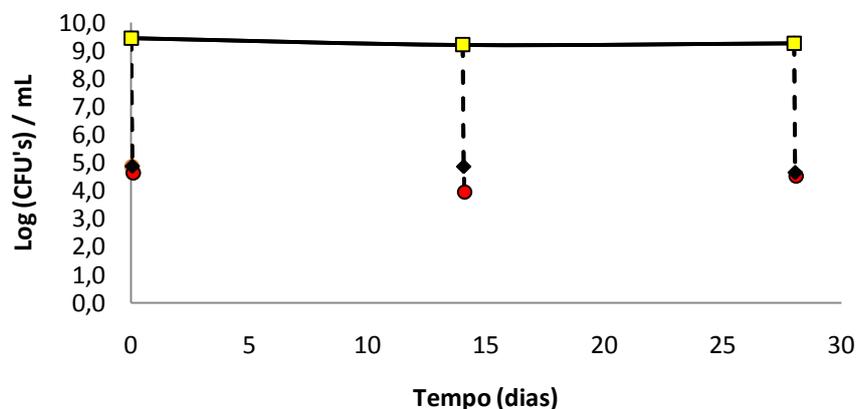


Figura 18 - Simulação da passagem do smoothie probiótico de manga no trato GI, simulando uma digestão lenta para o smoothie de manga (■ - células viáveis presentes no smoothie ◆ - células viáveis após exposição ao ambiente ácido ● - células viáveis após exposição aos sais biliares).

As figuras 15 e 17 representam o número de células viáveis após a simulação a uma digestão rápida para os smoothies de manga e banana respectivamente. É possível verificar que a exposição ao ambiente ácido é a principal causa para a perda da viabilidade. Nas figuras 16 e 18 encontram-se representados o número de células viáveis após a simulação a uma digestão lenta para os smoothies de manga e banana respectivamente, onde mais uma vez se verifica a influência do ambiente ácido na viabilidade. A passagem pelo sistema GI representa uma perda de 41% e 38% da viabilidade para o smoothie de banana considerando uma digestão rápida e lenta respectivamente, ao fim de 28 dias de armazenamento (tabela 21). No caso da manga verifica-se uma perda de 49% e 43% da viabilidade, considerando uma digestão rápida e lenta respectivamente (tabela 22).

Tabela 21 – Número de células viáveis e respectivos decréscimos durante a simulação de uma digestão lenta e rápida, após exposição ao ambiente ácido e sais biliares, para o smoothie de banana.

Dias	Rápida (log (CFU's) / ml)		Decréscimo		Lenta (log (CFU's) / ml)		Decréscimo	
	Ácido	Sais Biliares	Ácido	Sais Biliares	Ácido	Sais Biliares	Ácido	Sais Biliares
0	6,39	6,32	2,93	0,07	6,25	6,15	3,07	0,10
14	5,58	4,81	3,70	0,76	4,85	4,82	4,35	0,03
28	5,33	4,72	3,93	0,61	4,14	3,57	5,12	0,57

Tabela 22 – Número de células viáveis e respectivos decréscimos durante a simulação de uma digestão lenta e rápida, após exposição ao ambiente ácido e sais biliares, para o smoothie de manga.

	Rápida (log (CFU's) / ml)		Decréscimo		Lenta (log (CFU's) / ml)		Decréscimo	
	Ácido	Sais Biliares	Ácido	Sais Biliares	Ácido	Sais Biliares	Ácido	Sais Biliares
T0	4,86	4,72	4,57	0,14	4,98	4,65	4,45	0,22
T14	4,85	4,00	4,36	0,84	4,71	4,14	4,72	0,57
T28	4,64	4,53	4,79	0,11	4,14	3,94	5,29	0,20

Champagne (2008), trabalhando com um sumo comercial inoculado com *L. rhamnosus* R11, durante 35 dias, verificaram que simulando a passagem pelo trato GI, a perda de viabilidade no ambiente ácido era de 2,8 (log (CFU's) / ml), e na exposição ao ambiente do duodeno era de 0,3 (log (CFU's) / ml), sendo os resultados obtidos concordantes.

A literatura sugere que células que tenham sido mantidas em ambientes ácidos adquiriam resistência à mudança para ambientes ácidos, mas o mesmo não foi

verificado neste trabalho. Há uma maior perda de viabilidade nas bactérias com 28 dias de inoculação do que as que haviam sido inoculadas no dia da simulação, estando portanto, mais tempo em contacto com o ambiente ácido dos smoothies. Champagne (2008) fez a mesma observação quando comparado com sumos com duas horas e 35 dias de inoculação.

A cultura presente no smoothie de manga apresentou maior perda de viabilidade do que a cultura presente no smoothie de banana, mesmo apresentando esta um valor mais baixo de pH. Este facto pode dever-se ao efeito protector das fibras da banana, como a inulina, presentes de na sua constituição (prebiótico). Nualkaekul (2011) sugere que fibras dietéticas podem proteger as estirpes probióticas durante o processamento e armazenamento de produtos probióticos.

4.2 Propriedades físico-químicas dos smoothies

4.2.1 Evolução do pH durante o período de prateleira

A avaliação do pH é de extrema importância no desenvolvimento de alimentos probióticos, uma vez que é o factor que mais condiciona à viabilidade das estirpes (Yoon, 2004). Como se poder observar nas figuras 19 e 20, o pH ao longo do período de armazenamento vai diminuindo, até atingir valores próximo de 3,40.

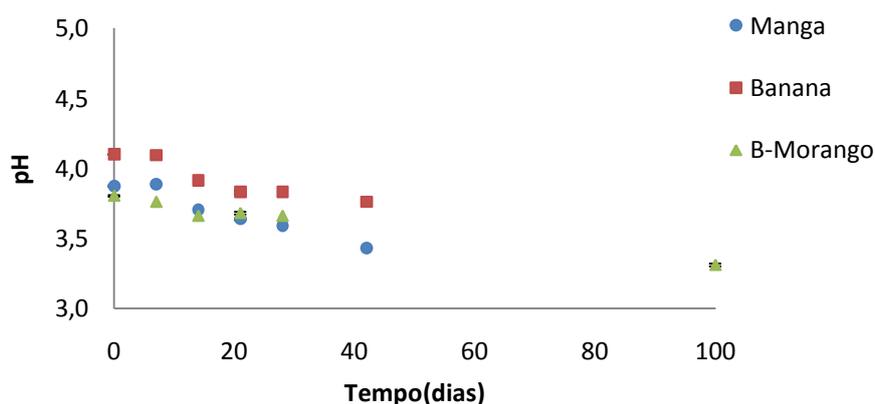


Figura 19 - Variação do pH ao longo de 100 dias (1º ensaio) para os smoothies probióticos de banana, banana-morango e de manga.

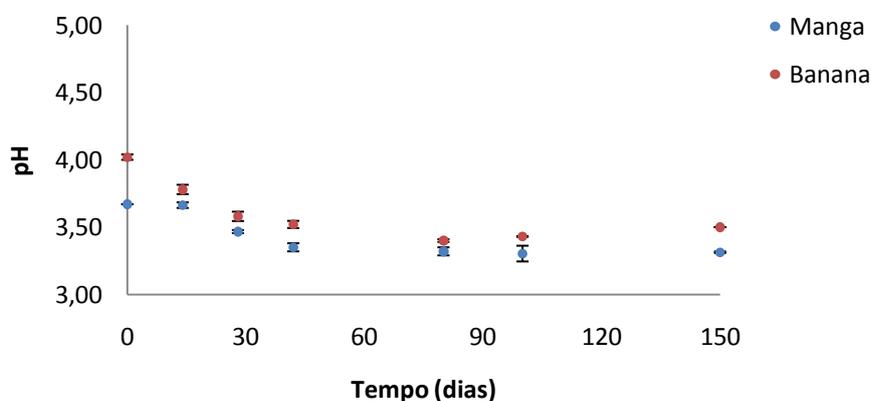


Figura 20 – Variação do pH ao longo de 150 dias (2º ensaio) para os smoothies probióticos de banana e de manga.

Durante os primeiros 28 dias de armazenamento verifica-se uma diminuição mais acentuada nos valores do pH. Este decréscimo é mais acentuado nos smoothies de banana, uma vez que o pH inicial dos smoothies de manga é inferior. A partir do dia 28, o pH dos smoothies vai diminuindo de forma mais lenta e gradual, até que estabilizam a valores de pH compreendidos entre os 3,2 e os 3,4. De acordo com Ukeyuma (2010) os

Lactobacillus fermentam açúcares, produzindo ácidos lácticos como principal produto do metabolismo. Devido ao seu metabolismo as estirpes probióticas produtoras de ácido lácteo acidificam o meio, baixando o pH, impedindo o crescimento e proliferação de bactérias indesejáveis, aumentando o período de conservação dos produtos.

Champagne (2008) observou que a estirpe *L. rhamnosus* R11 apresentava maior taxa de crescimento entre valores de pH de 3,8 e 4,2, inoculados numa matriz de sumo. Para os mesmos valores de pH, as estirpes probióticas *L. plantarum* LB 42, *L. fermentum* LB32 apresentaram maiores taxas de crescimento.

Yoon (2004) ao estudar a fermentação do sumo de tomate por *L. casei* observou que após 72 horas de fermentação, o pH decresceu de 4,1 para valores inferiores a 3,5.

Yoon (2005) estudou o comportamento de estirpes probióticas no sumo de beterraba, verificou que as estirpes *L. acidophilus* e *L. plantarum* reduziram o pH inicial (6,3) do sumo para valores inferiores a 4,5 após 48 horas de fermentação, enquanto as estirpes *L. casei* e *L. delbrueckii* reduziam até 5,0 após 72 horas. Estas diferenças devem-se a uma menor capacidade de produção de ácido láctico.

Face aos valores de pH obtidos, verificou-se que estes decresciam até 3,40 estabilizando próximo deste valor. Assim, procedeu-se à alteração da constituição dos smoothies de forma a testar a viabilidade, nas mesmas matrizes, mas com três valores de pH diferentes. Assim, foram realizadas duas reformulações, pH próximo do valor no qual estabilizava o pH e outra utilizando um pH inferior, próximo de 3,20, de forma a estudar o seu impacto na cultura inoculada. Foi utilizado também o smoothie com a formulação padrão como controlo. As figuras 21 e 22 mostram a variação do pH observada ao longo do terceiro ensaio.

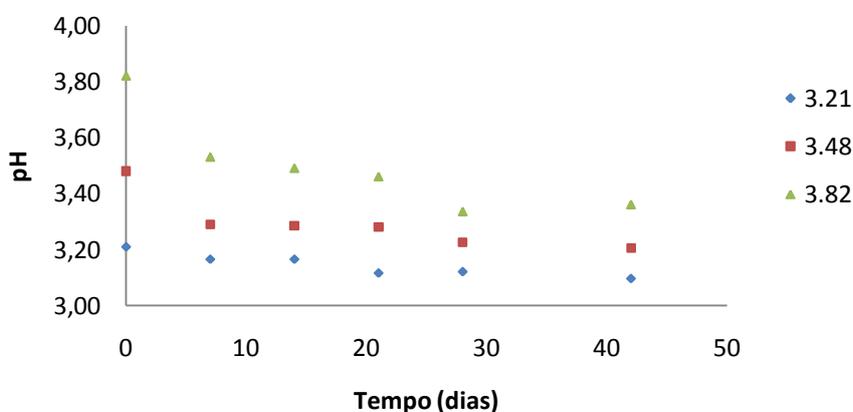


Figura 21 - Variação do pH obtidos, durante o terceiro ensaio, para o smoothie probiótico de manga com três valores diferentes de pH, ao longo de 42 dias.

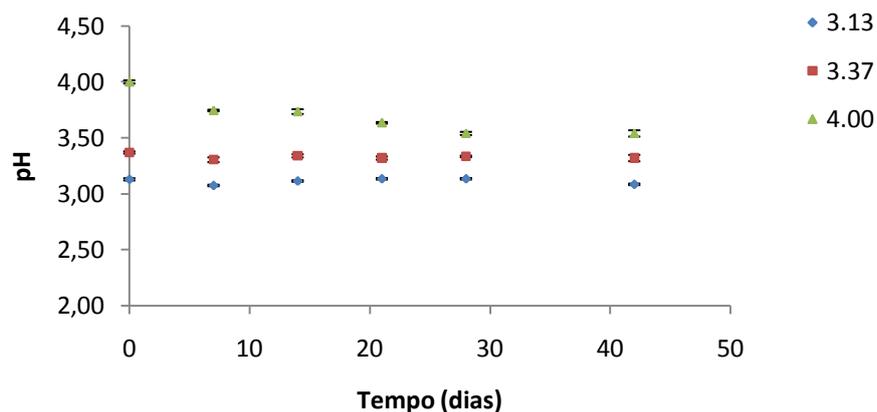


Figura 22 - Variação do pH obtidos, durante o terceiro ensaio, para o smoothie probióticos de banana com três valores diferentes de pH, ao longo de 42 dias

Foi possível observar que, nos smoothies com valores de pH próximos do 3,2, não há alterações significativas do valor de pH ao longo do período de armazenamento, independentemente das matrizes. O mesmo se verificou no smoothie de manga que possuía um pH de 3,37. No caso do smoothie de banana, o valor de pH usado foi superior ao pretendido, 3,48 em vez de 3,40. Neste ensaio verificou-se um declínio para o valor de 3,40, tal como nos ensaios anteriores. Os smoothies utilizados, com os valores padrões de pH, foram utilizados como controlo, mostrando uma vez mais a tendência do decréscimo dos valores de pH para valores compreendidos entre 3,2 e 3,4.

4.2.2 Variação do teor de sólidos solúveis durante o período de prateleira

Um dos critérios básicos na produção e desenvolvimento de bebidas de fruta é o °Brix, indicando a percentagem de sólidos solúveis em água, que num sumo pode ser influenciado por diversos factores relacionados com o fruto usada: variedade, região de crescimento, ano de crescimento e nível de maturidade dos frutos (Turkmen, 2011)

Tabela 23 - Valores de °Brix obtidos, durante o primeiro ensaio, para os smoothies probióticos de manga, banana e banana morango ao longo de 100 dias.

Tempo (dias)	Manga	Banana	Banana Morango
0	13,77 ± 0,06 ^b	15,33 ± 0,06 ^a	11,87 ± 0,01 ^c
7	13,80 ± 0,00 ^b	15,30 ± 0,00 ^a	11,90 ± 0,01 ^c
14	13,33 ± 0,15 ^b	15,27 ± 0,06 ^a	11,67 ± 0,01 ^c
21	13,40 ± 0,00 ^b	15,00 ± 0,00 ^a	11,60 ± 0,01 ^c
28	13,45 ± 0,07 ^b	15,20 ± 0,00 ^a	11,85 ± 0,03 ^c
42	13,50 ± 0,00 ^b	15,15 ± 0,07 ^a	-
100	-	-	11,70 ± 0,02 ^c

Valores da mesma linha seguidos da mesma letra não são estatisticamente diferentes ao nível $\alpha=0.05$, pelo teste de separação de média de Duncan.

Tabela 24 - Variação de °Brix obtidos, durante o segundo ensaio, para os smoothies probióticos de manga e de banana ao longo de 150 dias.

Tempo	Manga	Banana
0	13,63 ± 0,06	15,47 ± 0,06
14	13,60 ± 0,10	15,30 ± 0,10
28	13,40 ± 0,00	15,27 ± 0,06
42	13,33 ± 0,12	15,17 ± 0,12
80	13,20 ± 0,00	15,10 ± 0,00
100	13,27 ± 0,29	15,00 ± 0,10
150	13,10 ± 0,10	14,80 ± 0,00

Podemos verificar através dos valores presentes nas tabelas 23 e 24 que a quantidade de sólidos solúveis presentes nos smoothies inoculados não depende do tempo de armazenamento, mas sim da matriz usada, apresentando entre si diferenças significativas ($P < 0,05$). A matriz de banana é a que apresenta um valor de °Brix maior, seguindo-se a manga e por último a banana morango.

Shaha (2010) estudou a variação do °Brix ao longo de seis semanas num sumo inoculado com três estirpes diferentes: *L. rhamnosus* HN001, *B. Lactis*, *L. paracasei* Lpc-37. Ao longo das seis semanas o °Brix diminuiu, passando de valores de 11,8 para 9,0. O mesmo se verificou Alegre (2011), que analisou o °Brix de fatias de maçã inoculadas com *L. rhamnosus* GG, verificando que os valores diminuíram de 14,4 para 13,1 ao longo de 28 dias de armazenamento.

Tabela 25 – Variação de °Brix obtidos, durante o terceiro ensaio, para o smoothie probióticos de manga com três valores diferentes de pH, ao longo de 42 dias.

Dias	3,21	3,48	3,82
0	11,55 ± 0,07 ^c	12,60 ± 0,00 ^b	13,50 ± 0,00 ^a
7	10,95 ± 0,07 ^c	12,10 ± 0,00 ^b	13,10 ± 0,00 ^a
14	11,55 ± 0,07 ^c	12,45 ± 0,07 ^b	13,45 ± 0,07 ^a
21	11,50 ± 0,00 ^c	12,25 ± 0,07 ^b	13,20 ± 0,00 ^a
28	11,55 ± 0,07 ^c	12,25 ± 0,07 ^b	13,20 ± 0,14 ^a
42	11,55 ± 0,07 ^c	12,15 ± 0,07 ^b	13,10 ± 0,00 ^a

Valores da mesma linha seguidos da mesma letra não são estatisticamente diferentes ao nível $\alpha=0.05$, pelo teste de separação de média de Duncan.

Tabela 26 - Variação de °Brix obtidos, durante o terceiro ensaio, para o smoothie probióticos de banana com três valores diferentes de pH, ao longo de 42 dias.

Dias	3,13	3,37	4,00
0	13,70 ± 0,00 ^c	14,50 ^b ± 0,00 ^b	15,05 ± 0,07 ^a
7	13,30 ± 0,00 ^c	14,40 ^b ± 0,00 ^b	14,60 ± 0,14 ^a
14	13,60 ± 0,00 ^c	14,40 ^b ± 0,00 ^b	14,80 ± 0,14 ^a
21	13,65 ± 0,07 ^c	14,50 ^b ± 0,00 ^b	14,70 ± 0,14 ^a
28	13,70 ± 0,00 ^c	14,40 ^b ± 0,14 ^b	14,75 ± 0,07 ^a
42	13,60 ± 0,14 ^c	14,25 ^b ± 0,07 ^b	14,50 ± 0,14 ^a

Valores da mesma linha seguidos da mesma letra não são estatisticamente diferentes ao nível $\alpha=0.05$, pelo teste de separação de média de Duncan.

Os valores do °Brix diferem nos smoothies de banana e manga de acordo com o pH apresentado como se pode verificar nas tabelas 25 e 26. Quanto maior o pH maior o °brix apresentado. Este facto deve-se à alteração nas formulações usadas. Para diminuir o valor do pH foi usado concentrado de sumo de limão, diminuindo-se a quantidade de concentrado de laranja e maçã, sendo este último rico em açúcares.

4.2.3 Actividade da água

A actividade da água é uma característica que afecta o crescimento e sobrevivência microbiana nos alimentos. A actividade da água é definida como o rácio da pressão de vapor de água numa matriz (p) e a pressão do vapor de água pura (p_o), à mesma temperatura:

$$a_w = p/p_o$$

O estudo da actividade da água em alimentos probióticos é de extrema importância pois esta irá influenciar o crescimento dos microrganismos, sendo ainda de maior importância esta medição na produção de alimentos dependentes de processos fermentativos (Valik, 1995; Decagon 2022).

Ao longo de 150 dias de armazenamento os valores da actividade da água não sofreram alterações significativas nas duas matrizes. Para haver um crescimento de bactérias os valores da actividade da água devem ser iguais ou superiores a 0,91. Podem ser observados na tabela 27 valores ligeiramente inferiores nas medições, cem e cento e cinquenta dias após a inoculação, podendo estes valores estarem relacionados com falta de sensibilidade do aparelho de medição (Decagon 2022).

Tabela 27 - Variação da a_w obtidos, durante o segundo ensaio, para os smoothies probióticos de manga e de banana ao longo de 150 dias.

Dias	Manga	Banana
0	0,92 ± 0,00	0,94 ± 0,01
14	0,94 ± 0,02	0,93 ± 0,01
28	0,91 ± 0,00	0,93 ± 0,01
42	0,91 ± 0,00	0,91 ± 0,00
80	0,91 ± 0,00	0,91 ± 0,00
100	0,89 ± 0,00	0,90 ± 0,00
150	0,90 ± 0,01	0,90 ± 0,00

Tabela 28 - Variação da a_w obtidos, durante o terceiro ensaio, para o smoothie probióticos de manga com três valores diferentes de pH, ao longo de 42 dias.

Dias	3,21	3,48	3,82
0	0,90 ± 0,00 ^a	0,91 ± 0,00 ^a	0,91 ± 0,00 ^a
7	0,89 ± 0,01 ^a	0,90 ± 0,00 ^a	0,90 ± 0,01 ^a
14	0,91 ± 0,00 ^a	0,91 ± 0,00 ^a	0,91 ± 0,00 ^a
21	0,91 ± 0,00 ^a	0,91 ± 0,00 ^a	0,90 ± 0,00 ^a
28	0,92 ± 0,01 ^a	0,92 ± 0,00 ^a	0,91 ± 0,01 ^a
42	0,89 ± 0,00 ^a	0,90 ± 0,01 ^a	0,91 ± 0,00 ^a

Valores da mesma linha seguidos da mesma letra não são estatisticamente diferentes ao nível $\alpha=0.05$, pelo teste de separação de média de Duncan.

Tabela 29 - Valores de a_w obtidos, durante o terceiro ensaio, para o smoothie probióticos de banana com três valores diferentes de pH, ao longo de 42 dias.

Dias	3,13	3,37	4,00
0	0,90 ± 0,00 ^a	0,91 ± 0,00 ^a	0,91 ± 0,00 ^a
7	0,91 ± 0,00 ^a	0,90 ± 0,00 ^a	0,90 ± 0,01 ^a
14	0,90 ± 0,00 ^a	0,90 ± 0,00 ^a	0,90 ± 0,00 ^a
21	0,91 ± 0,01 ^a	0,90 ± 0,00 ^a	0,90 ± 0,00 ^a
28	0,89 ± 0,01 ^a	0,90 ± 0,00 ^a	0,91 ± 0,00 ^a
42	0,91 ± 0,00 ^a	0,90 ± 0,00 ^a	0,91 ± 0,00 ^a

Valores da mesma linha seguidos da mesma letra não são estatisticamente diferentes ao nível $\alpha=0.05$, pelo teste de separação de média de Duncan.

A a_w não foi influenciada pelo pH das matrizes, como é visível nas tabelas 28 e 29. A alteração da constituição das matrizes não alterou de forma significativa os valores da actividade da água ($P < 0,05$). Ao longo de 42 dias, os valores da a_w mantêm-se estáveis para as duas matrizes, com três valores de pH diferentes.

4.2.4 Cor dos smoothies ao longo do armazenamento

Para avaliar as variações na cor foram medidos os parâmetros L, a e b. Os valores, no primeiro ensaio, foram medidos no início e fim do ensaio, sendo que no segundo e terceiro ensaio foram retirados com a mesma periodicidade dos restantes parâmetros para analisar possíveis variações na cor.

Os valores de a foram positivos (+a), direcção ao vermelho e os valores de b foram igualmente positivos (+b), em direcção ao amarelo. Os valores de a e b foram posteriormente convertidos em H° e croma para uma mais fácil percepção da cor.

Tabela 30 – Variação dos valores da luminosidade (L), tonalidade (H°) e croma (C) no início e no fim do período de armazenamento dos smoothies probiótico, durante o primeiro ensaio.

	Manga		Banana		Morango - Banana	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
L	50,80±0.63	52,22±0.63	63,23±0.00	64,01±0.46	36,71±0.05	38,96±0.42
H°	72.23±0.15	71.30±0.17	82,99±0.00	80,95±0.30	21,54±0.03	23,37±0.42
C	24,79±0.57	26,01±0.41	23,11±0.41	22,51±0.00	19,39±0.10	19,55±0.82

A tabela 30 é referente ao primeiro ensaio; num contexto geral os valores de L, H° e Chroma não apresentam diferenças significativas considerando P <0,05.

Normalmente o aumento do valor de L está associado ao aumento da biomassa, tornando os meios mais claros (Raimundo, 2007).

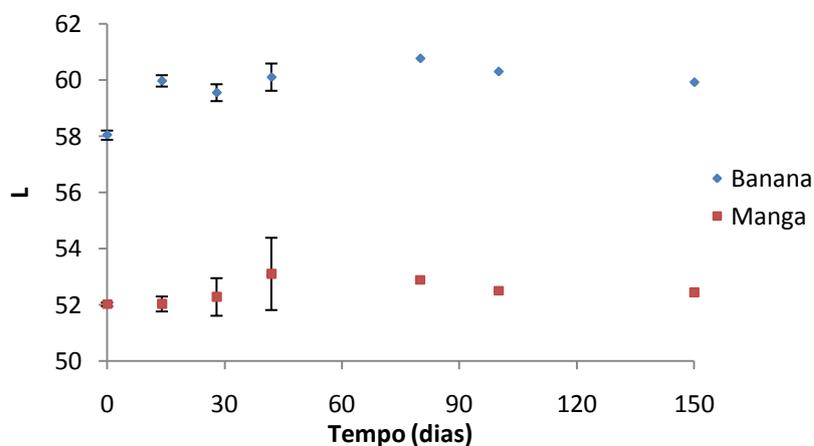


Figura 23 – Variação da luminosidade (L) nos smoothies probióticos ao longo de 150 dias de armazenamento (terceiro ensaio). Os valores obtidos são a média de 3 observações e a barra de erro corresponde ao desvio padrão.

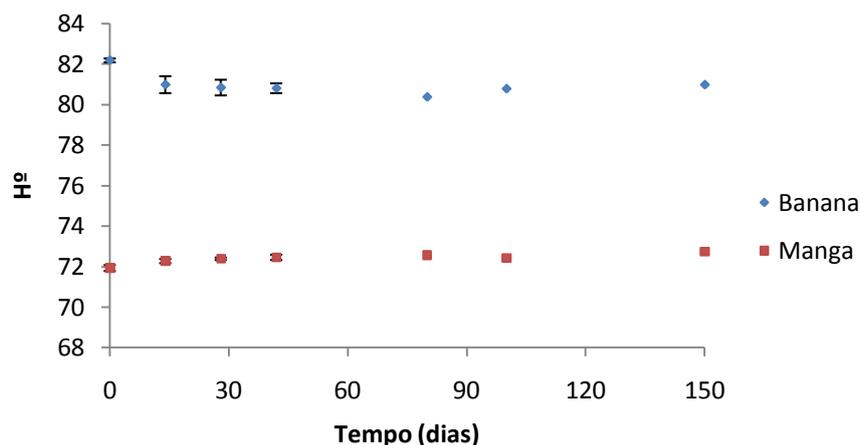


Figura 24 - Variação da tonalidade (H°) nos smoothies probióticos ao longo de 150 dias de armazenamento, referente ao terceiro ensaio. Os valores obtidos são a média de 3 observações e a barra de erro corresponde ao desvio padrão.

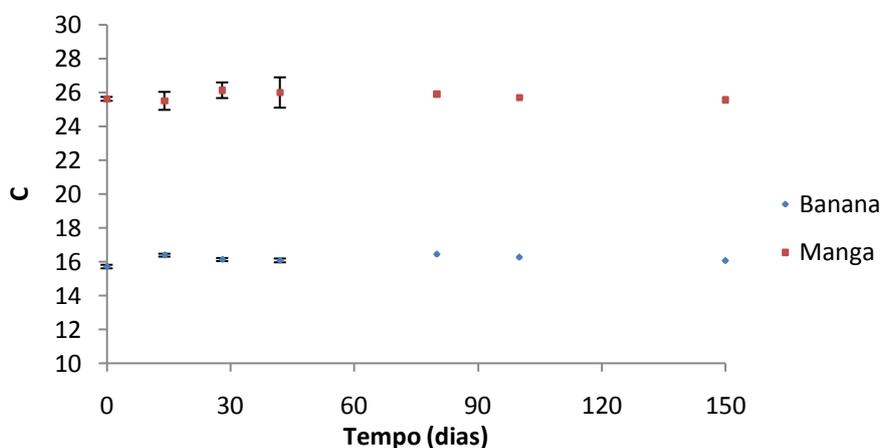


Figura 25 - Variação chroma nos smoothies probióticos ao longo de 150 dias de armazenamento, referente ao terceiro ensaio. Os valores obtidos são a média de 3 observações e a barra de erro corresponde ao desvio padrão.

No segundo ensaio, ao longo de 150 dias, não houve diferença significativa entre os valores observados de L, H° e chroma ($P < 0,05$) nas duas matrizes dos smoothies probióticos (figuras 23-25).

Tabela 31 – Variação do chroma, durante 42 dias, para o smoothie de manga, para três valores de pH diferentes.

Dias	3,21	3,48	3,82
0	25,56±0,22 ^a	24,33±0,61 ^b	25,25±0,03 ^{ab}
7	24,89±0,14 ^a	24,27±0,92 ^b	25,29±0,29 ^{ab}
14	25,77±0,10 ^a	25,00±0,01 ^b	25,24±0,01 ^{ab}
21	26,37±0,25 ^a	25,54±0,34 ^b	25,75±0,15 ^{ab}
28	26,15±0,10 ^a	25,28±0,02 ^b	25,50±0,32 ^{ab}
42	26,10±0,20 ^a	24,97±0,34 ^b	25,66±0,018 ^{ab}

Valores da mesma linha seguidos da mesma letra não são estatisticamente diferentes ao nível $\alpha=0.05$, pelo teste de separação de média de Duncan.

Tabela 32 - Variação da luminosidade (L), durante 42 dias, para o smoothie de manga, para três valores de pH diferentes.

Dias	3,21	3,48	3,82
0	50,80 ± 0,24 ^a	50,49 ± 0,92 ^a	51,73 ± 0,04 ^a
7	52,31 ± 0,30 ^a	50,90 ± 0,53 ^a	52,18 ± 0,33 ^a
14	52,34 ± 0,19 ^a	51,49 ± 0,02 ^a	51,79 ± 0,02 ^a
21	53,27 ± 0,49 ^a	52,45 ± 0,18 ^a	52,81 ± 0,26 ^a
28	53,34 ± 0,19 ^a	52,55 ± 0,03 ^a	52,63 ± 0,24 ^a
42	53,08 ± 0,01 ^a	51,79 ± 0,58 ^a	52,83 ± 0,14 ^a

Valores da mesma linha seguidos da mesma letra não são estatisticamente diferentes ao nível $\alpha=0.05$, pelo teste de separação de média de Duncan.

Tabela 33 - Variação da tonalidade (H°), durante 42 dias, para o smoothie de manga, para três valores de pH diferentes.

Dias	3,21	3,48	3,82
0	72,65 ± 0,01 ^b	73,00 ± 0,10 ^a	72,29±0,11 ^b
7	72,61 ± 0,27 ^b	73,35 ± 0,20 ^a	72,82±0,00 ^b
14	72,13 ± 0,19 ^b	73,06 ± 0,04 ^a	72,67±0,03 ^b
21	72,00 ± 0,15 ^b	73,10 ± 0,52 ^a	72,81±0,09 ^b
28	72,59 ± 0,12 ^b	73,54 ± 0,24 ^a	72,63±0,06 ^b
42	72,51 ± 0,17 ^b	73,61 ± 0,04 ^a	72,92±0,16 ^b

Valores da mesma linha seguidos da mesma letra não são estatisticamente diferentes ao nível $\alpha=0.05$, pelo teste de separação de média de Duncan.

Tabela 34 - Variação do chroma, durante 42 dias, para o smoothie de banana, para três valores de pH diferentes.

Dias	3,13	3,37	4,00
0	15,59 ± 0,14 ^b	16,16 ± 0,19 ^a	15,78 ± 0,06 ^a
7	15,65 ± 0,11 ^b	16,27 ± 0,12 ^a	16,21 ± 0,06 ^a
14	14,85 ± 0,00 ^b	16,19 ± 0,00 ^a	16,13 ± 0,01 ^a
21	15,75 ± 0,04 ^b	16,49 ± 0,03 ^a	16,69 ± 0,13 ^a
28	15,62 ± 0,14 ^b	16,08 ± 0,50 ^a	16,44 ± 0,02 ^a
42	15,46 ± 0,22 ^b	16,43 ± 0,02 ^a	16,22 ± 0,05 ^a

Valores da mesma linha seguidos da mesma letra não são estatisticamente diferentes ao nível $\alpha=0.05$, pelo teste de separação de média de Duncan.

Tabela 35 - Variação da luminosidade (L), durante 42 dias, para o smoothie de banana, para três valores de pH diferente.

Dias	3,13	3,37	4,00
0	57,66 ± 0,04 ^a	57,54 ± 0,01 ^a	55,93 ± 0,17 ^a
7	58,54 ± 0,16 ^a	58,55 ± 0,04 ^a	57,19 ± 0,08 ^a
14	56,27 ± 0,04 ^a	58,51 ± 0,02 ^a	56,67 ± 0,07 ^a
21	58,98 ± 0,21 ^a	59,40 ± 0,18 ^a	58,62 ± 0,86 ^a
28	58,82 ± 0,34 ^a	58,07 ± 1,85 ^a	57,71 ± 0,18 ^a
42	58,11 ± 0,67 ^a	59,40 ± 0,18 ^a	57,50 ± 0,33 ^a

Valores da mesma linha seguidos da mesma letra não são estatisticamente diferentes ao nível $\alpha=0.05$, pelo teste de separação de média de Duncan.

Tabela 36 - Variação da tonalidade (H°), durante 42 dias, para o smoothie de banana, para três valores de pH diferente.

Dias	3,13	3,37	4,00
0	80,83 ± 0,16 ^a	80,79 ± 0,14 ^b	81,71 ± 0,10 ^b
7	80,92 ± 0,04 ^a	80,87 ± 0,04 ^b	81,43 ± 0,15 ^b
14	81,01 ± 0,00 ^a	80,56 ± 0,02 ^b	81,14 ± 0,03 ^b
21	80,76 ± 0,08 ^a	80,63 ± 0,11 ^b	80,43 ± 0,15 ^b
28	80,64 ± 0,03 ^a	80,58 ± 0,24 ^b	80,92 ± 0,19 ^b
42	80,26 ± 0,11 ^a	80,49 ± 0,06 ^c	81,01 ± 0,15 ^b

Valores da mesma linha seguidos da mesma letra não são estatisticamente diferentes ao nível $\alpha=0.05$, pelo teste de separação de média de Duncan.

As tabelas 31 a 36 são referentes ao terceiro ensaio. Para os dois smoothies não há diferença significativa do L para os três pH's apresentados ($P < 0,05$).

Na manga, o chroma apresenta diferença significativa entre pH 3,21 e 3,48; enquanto na banana existe diferença significativa entre o pH 3,13 e 3,37 e 4,00 ($P < 0,05$).

A tonalidade, na manga, apresenta valores significativamente diferentes a pH 3,48; enquanto na banana esta situação verifica-se para pH de 3,37 ($P < 0,05$).

Estas diferenças devem-se essencialmente a alterações efectuadas nas formulações para alterar o pH dos smoothies, alterando a quantidade de concentrados e polpas adicionadas.

4.2.5 Viscosidade dos smoothies

O comportamento reológico dos sumos de frutas e de concentrados é influenciado pela sua composição, especialmente o tipo de frutas e tratamentos realizados durante o seu processamento tecnológico. Factores como temperatura e concentração influenciam as propriedades reológicas destes produtos.

Na tabela 37 é possível observar as variações da viscosidade nos três smoothies. Inicialmente pretendia-se obter os valores iniciais e finais da viscosidade, optando-se no terceiro ensaio por uma leitura regular, acompanhando as restantes análises físico-químicas. É possível verificar uma diminuição dos valores da viscosidade ao longo dos 42 dias, 100 no caso da banana-morango, para os smoothies.

A tabela 38, referente ao segundo ensaio, revela resultados opostos, aumentando a viscosidade ao longo do período de armazenamento.

Tabela 37 - Valores médios da viscosidade (cp) no início e no fim do período de armazenamento dos smoothies probióticos, para o primeiro ensaio.

	Manga	Banana	Morango - Banana
Inicial	745,30±162,00	292,00±104,61	1212,00±206,96
Final	468,00±0,00	212,00±226,27	959,00±140,01

Tabela 38 - Valores médios da viscosidade (cp) no início e no fim do período de armazenamento dos smoothies probióticos, para o primeiro ensaio.

	Manga	Banana
Inicial	467,3 42,44	413,33± 46,19
Final	738,00 ± 34,70	616 ± 24,33

Tabela 39 - Variação da viscosidade (cp), durante 42 dias, para o smoothie de banana, para três valores de pH diferente.

Dias	3,13	3,37	4,00
0	278,89 ± 17,45 ^a	294,44 ± 15,04 ^{ab}	320,00 ± 18,15 ^b
7	304,44 ± 8,56 ^a	336,67 ± 20,86 ^{ab}	357,78 ± 21,57 ^b
21	183,33 ± 7,67 ^a	335,56 ± 8,56 ^{ab}	323,33 ± 7,67 ^b
28	195,00 ± 8,89 ^a	291,00 ± 10,21 ^{ab}	279,00 ± 4,47 ^b
35	214,00 ± 37,33 ^a	248,00 ± 10,05 ^{ab}	321,00 ± 21,98 ^b

Valores da mesma linha seguidos da mesma letra não são estatisticamente diferentes ao nível $\alpha=0.05$, pelo teste de separação de média de Duncan.

Tabela 40 – Variação da viscosidade (cp), durante 42 dias, para o smoothie de manga, para três valores de pH diferente.

Dias	3,21	3,48	3,82
0	574,00 ± 29,81 ^a	537,00 ± 18,67 ^a	570,0 ± 31,46 ^a
7	517,00 ± 22,73 ^a	506,00 ± 13,14 ^a	551,00 ± 30,07 ^a
21	497,00 ± 44,62 ^a	506,00 ± 49,03 ^a	637,00 ± 29,22 ^a
28	502,00 ± 23,31 ^a	504,00 ± 26,63 ^a	669,00 ± 30,07 ^a
42	601,00 ± 43,76 ^a	549,00 ± 30,07 ^a	728,00 ± 33,34 ^a

Valores da mesma linha seguidos da mesma letra não são estatisticamente diferentes ao nível $\alpha=0.05$, pelo teste de separação de média de Duncan.

As tabelas 39 e 40 mostram a variação da viscosidade para os smoothies de manga e banana, com variações de pH, ao longo do período de armazenamento. Os valores obtidos para o smoothie de banana são significativamente diferentes, considerando $P > 0,05$, para valores de pH de 3,13 e 4,00. Nos smoothies de manga, os valores não são significativamente diferentes entre si. Ao longo do período de armazenamento, os valores apresentados revelam-se pouco coerentes, ocorrendo oscilações entre as medições. Uma incorrecta utilização do viscosímetro, ou uma má calibração do mesmo podem estar na origem das variações dos valores.

4.3 Análise sensorial aos smoothies probióticos

4.3.1 Teste triangular

A avaliação do impacto sensorial das estirpes probióticas nas matrizes de fruta é de extrema importância a nível comercial de forma a direccionar o desenvolvimento da formulação do novo produto (Luckow, 2004). Os testes triangulares são provas utilizadas para determinar diferenças sensoriais entre dois ou mais produtos. Pretendeu-se analisar as diferenças sensoriais perceptíveis entre os smoothies de manga e os smoothies de banana, com três tempos diferentes de inoculação, face aos smoothies padrão da marca FRU, sem adição da cultura probiótica.

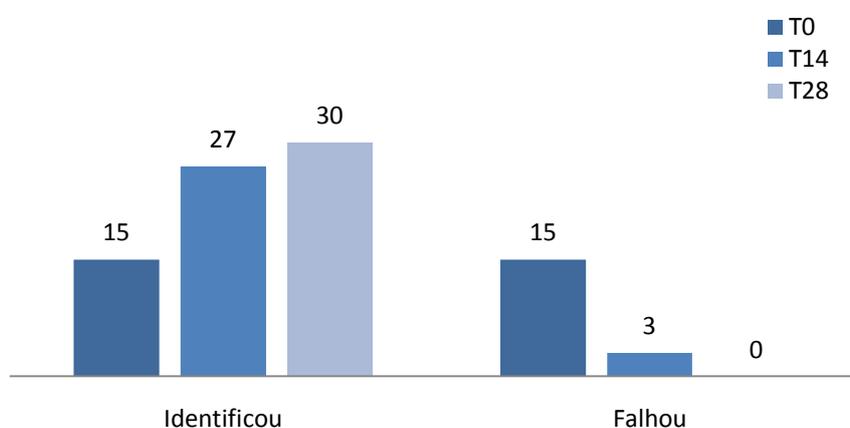


Figura 26 – Resultados obtidos no teste triangular, utilizando o smoothie de banana probiótico, com três tempos diferentes de inoculação, e o smoothie padrão de banana da marca Fru. Número de provadores que identificou correctamente e que não identificou correctamente as diferenças entre produtos (n=30).

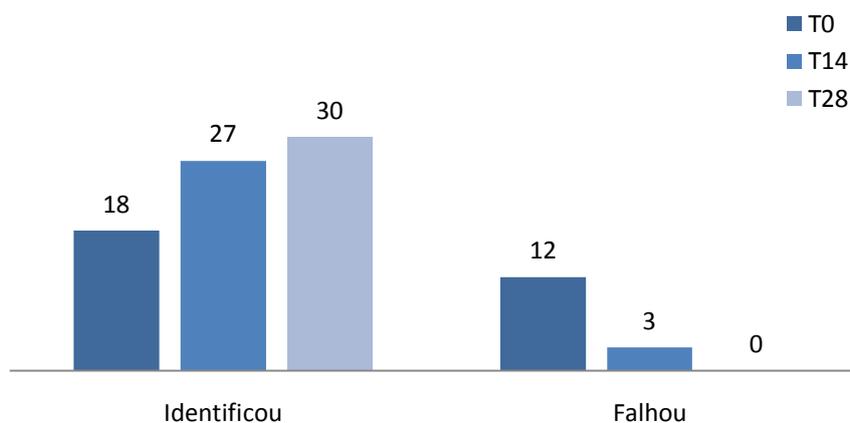


Figura 27 - Resultados obtidos no teste triangular, utilizando o smoothie de manga probiótico, com três tempos diferentes de inoculação, e o smoothie padrão de banana da marca Fru. Número de provadores que identificou correctamente e que não identificou correctamente as diferenças entre produtos (n=30).

De acordo com os testes triangulares realizados, com os resultados expressos nas Figura 26 e Figura 27, observou-se que smoothies probióticos apresentam uma diferença sensorial significativa face aos smoothies não probióticos.

No momento da inoculação, essa perceptibilidade não foi tão notória, sendo de 50% na banana e de 60% na manga, sendo que ao longo do período de armazenamento com o inóculo torna-se mais notória estas diferenças, 90% ao fim de 14 dias e 100 ao fim de 28 dias após a inoculação.

O sabor dos alimentos funcionais, nomeadamente os probióticos, está normalmente associado a sabores menos apelativos do que as versões convencionais, sendo normalmente associado, pelo consumidor, o sacrifício do sabor de forma a alcançar uma dieta saudável (Luckow 2004a).

Os *Lactobacillus* são bactérias produtoras de CO₂, ácido láctico e derivados de diacetilo que podem induzir odores fortes e um gosto característico aos smoothies. A produção destes compostos pode estar na origem da discriminação dos smoothies por parte do painel de provadores (Raimundo, 2007).

Luckow (2004b) verificou que os consumidores eram capazes de distinguir sumos de laranja funcionais enriquecidos com pró e prebióticos e as suas versões convencionais. As bebidas funcionais eram descritas como tendo sabores “medicinais”, “lácteos” e “sujos”. Os *off-flavors* perceptíveis, produzidos durante o processo de fermentação das culturas probióticas, poderiam ser mascarados adicionando 10% (v/v) de sumo de frutos tropicais à bebida probiótica

De forma a avaliar as diferenças sensoriais entre duas versões de sumo de groselha, convencional e probiótica (inoculada com *L. plantarum* 299v), Luckow (2004a) observou que a versão probiótica foi descrita como “perfumada” e com sabor a leite em odor e como “azedada” e “saborosa” no *flavour*. Os *off-flavours* apresentados eram menos intensos no sumo de groselha do que os encontrados em sumos de laranja.

4.3.2 Teste de aceitabilidade

É necessário determinar a influência que a fortificação com culturas probióticas irá exercer sobre as matrizes não-lácteas, tendo as indústrias um grande interesse no desenvolvimento de produtos que sejam facilmente aceites pelo consumidor. Para verificar a aceitabilidade dos smoothies probióticos foi usado um painel não treinado de

40 provadores na Universidade de Aveiro, com idades compreendidas entre os 19 e os 41 anos. Neste teste foram usadas duas matrizes de smoothies probióticos, um de manga e um de banana, com três tempos diferentes de inoculação: 0, 14 e 28 dias. Cada um dos smoothies apresentava duas versões: um acidificado, com pH de aproximadamente 3,4, e uma versão com um pH normal, no caso da manga de aproximadamente 3,8 e na banana 4,1, como se pode verificar na Tabela 41.

Tabela 41 – Valores iniciais de pH e °Brix para os smoothies usados nos testes de aceitabilidade e preferência.

		T28		T14		T0	
		pH	°Brix	pH	°Brix	pH	°Brix
Banana	Acidificado	3,37	13,30	3,39	13,30	3,38	13,40
	Normal	4,10	14,30	4,13	14,40	4,10	14,20
Manga	Acidificado	3,37	13,30	3,36	13,30	3,35	13,00
	Normal	3,79	12,60	3,78	12,60	3,76	12,60

Foram utilizados duas modalidades diferentes de teste, apresentando-se duas escalas diferentes, um composto por descritores de acordo com o método de *Food Action Rating Scale* (FACT), adaptado de Schutz (1965) e um teste no qual se pretendia, através da marcação numa escala de 15 cm, quantificar a aceitabilidade dos diferentes smoothies.

Tabela 42 – Valores obtidos no teste aceitabilidade, utilizando a marcação na escala para os diferentes smoothies.

	Banana	Manga
T0 Normal	10,7 ± 3,2	9,8 ± 3,2
T0 Acidificada	3,7 ± 2,9	5,5 ± 3,9
T14 Normal	9,3 ± 3,3	7,1 ± 3,9
T14 Acidificada	4,7 ± 3,7	4,5 ± 2,8
T28 Normal	11,4 ± 2,1	6,6 ± 3,8
T28 Acidificada	5,1 ± 3,3	4,9 ± 3,0

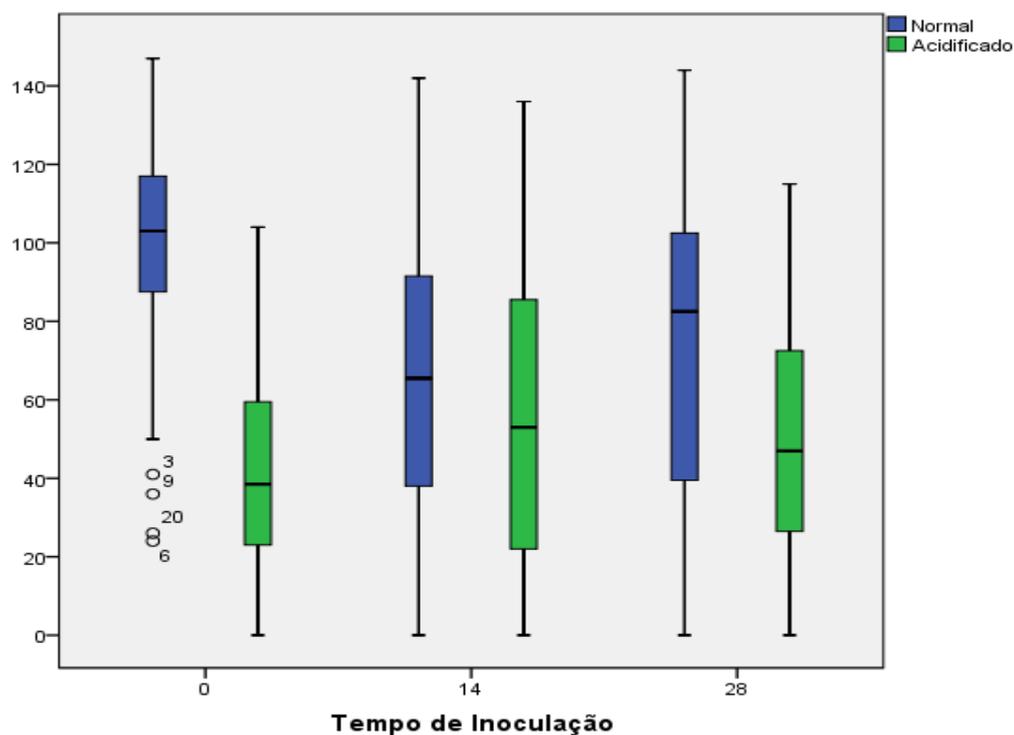


Figura 28 – Distribuição dos resultados do teste de aceitabilidade para duas versões do smoothie de manga probiótico (acidificada e normal) com três tempos diferentes de inoculação (0, 14 e 28 dias).

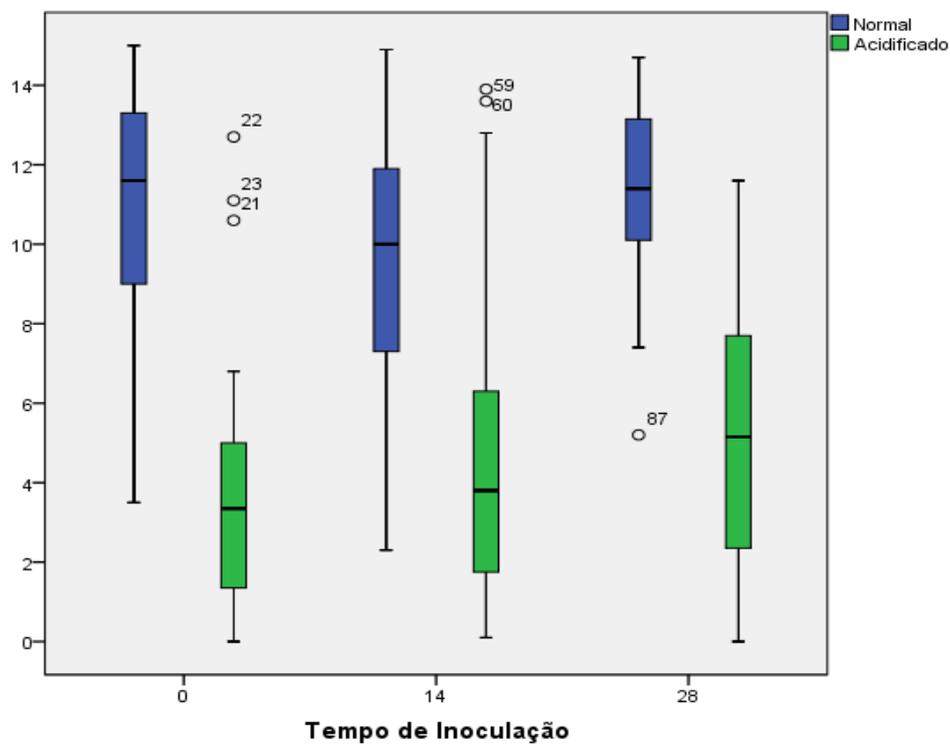


Figura 29 - Distribuição dos resultados do teste de aceitabilidade para duas versões do smoothie de banana probiótico (acidificada e normal) com três tempos diferentes de inoculação (0, 14 e 28 dias).

De acordo com o teste de aceitabilidade, utilizando a recta de 15 cm como referencia, observou-se que o smoothie que recolhe maior aceitação por parte do consumidor é o smoothie de banana, versão normal, sendo o smoothie de manga acidificado o que recolhe a menor aceitabilidade (tabela 42)

Na figura 28 é possível observar a distribuição da aceitabilidade dos provadores de acordo com os smoothies e tempos de inoculação. Os smoothies de banana com a formulação padrão recebem uma maior aceitabilidade por parte do consumidor, face à formulação acidificada independentemente do tempo de inoculação. Não sendo tão notória esta diferença nos smoothies de manga a partir dos catorze dias de inoculação. Este facto demonstra que a acidez é um factor determinante na aceitação do smoothie por parte do consumidor. Os smoothies acidificados possuem, uma grande quantidade de sumo de limão, utilizado para baixar o pH, o que os tornam mais ácidos e com um sabor mais intenso a limão.

Verifica-se que no smoothie de banana há um maior desfasamento dos resultados, comparando a versão normal à acidificada, do que na manga. O smoothie de banana com 28 dias de inoculação é o que recebe maior aceitabilidade por parte do consumidor.

Tabela 43 – Resultados expressos em percentagem obtidos pelos descritores da escala de FACT para o smoothie de banana, com três tempos diferentes de inoculação, com duas versões distintas, pH acidificado e pH normal.

	T0		T14		T28	
	N	A	A	N	N	A
Código da amostra	634	421	553	539	200	355
Consumiria o produto sempre que tivesse oportunidade	22,50	0,00	2,50	10,00	10,00	0,00
Consumiria o produto frequentemente	15,00	0,00	5,00	7,50	27,50	0,00
Consumiria o produto regularmente	10,00	2,50	0,00	20,00	17,50	2,50
Gosto do produto e consumiria ocasionalmente	35,00	5,00	15,00	25,00	40,00	17,50
Consumiria se estivesse disponível, mas não saía do meu caminho	5,00	10,00	10,00	20,00	2,50	20,00
Não gosto, mas consumiria ocasionalmente	10,00	15,00	12,50	2,50	2,50	0,00
Difícilmente consumiria	2,50	20,00	25,00	7,50	0,00	25,00
Consumiria se não tivesse outro alimento	0,00	17,50	7,50	5,00	0,00	22,50
Só consumiria o produto se fosse obrigado	0,00	30,00	22,50	2,50	0,00	12,50

Tabela 44 - Resultados expressos em percentagem obtidos pelos descritores da escala de FACT para o smoothie de manga, com três tempos diferentes de inoculação, com duas versões distintas, uma com pH acidificado e outra com o pH normal.

Código da amostra	T0		T14		T28	
	A	N	A	N	A	N
Consumiria o produto sempre que tivesse oportunidade	213	505	555	632	330	300
Consumiria o produto frequentemente	0,00	10,00	2,50	0,00	0,00	5,00
Consumiria o produto regularmente	0,00	17,50	5,00	7,50	2,50	7,50
Gosto do produto e consumiria ocasionalmente	2,50	17,50	7,50	5,00	5,00	2,50
Consumiria se estivesse disponível, mas não saía do meu caminho	12,50	35,00	15,00	20,00	15,00	17,50
Não gosto, mas consumiria ocasionalmente	10,00	12,50	12,50	5,00	15,00	20,00
Difícilmente consumiria	20,00	2,50	20,00	17,50	12,50	12,50
Consumiria se não tivesse outro alimento	35,00	0,00	17,50	15,00	20,00	20,00
Só consumiria o produto se fosse obrigado	10,00	5,00	5,00	15,00	15,00	7,50
	10,00	0,00	15,00	15,00	15,00	7,50

De acordo com o teste de aceitabilidade FACT o smoothie de banana com a formulação normal apresenta notas na zona de aceitação de 95%, 2.5% na zona de indiferença e 2.5% na zona de rejeição no final do período de *shelf life* do produto. Este foi o smoothie que recolheu maior aceitação por parte do painel de provadores (tabela 43 e 44). A formulação padrão do smoothie de manga apresenta valores de aceitação de 32,5%, indiferença de 20% e rejeição de 47,5%. As matrizes acidificadas recolhem menor aceitação por parte do público em geral. O smoothie de banana acidificado que obteve maior aceitação foi o que se encontrava inoculado há catorze dias (22,50%), sendo seguido pela inoculação com 28 dias (20,00%). Esta situação é também verificada no smoothie de manga, com 30,00% e 22,50% para catorze e vinte e oito dias respectivamente.

Luckow (2004a) estudou a preferência dos consumidores nas características sensoriais dos sumos funcionais face à sua formulação convencional. A preferência recaiu pelas formulações convencionais, mas quando informado dos benefícios das versões funcionais, a sua escolha recaiu nas versões funcionais.

4.3.3 Teste Avaliação da preferência

Apesar da idade e sexo, os consumidores esperam que os sumos de frutas probióticos sejam capazes de fornecer benefícios para a saúde sem comprometer o

sabor, não esperando que sabores desagradáveis sejam marcadores para benefícios de saúde em sucos de frutas (Luckow 2004a). A preferência por smoothies probióticos com variação do pH foi avaliada através de um teste de ranking, tendo-se pedido aos provadores que indicassem a sua preferência entre dois sabores diferentes, cada um deles com duas versões para o valor de pH, tal como referido na metodologia.

Tabela 45 – Classificação atribuída pelos provadores (n=54) às duas versões (normal e acidificado) de cada smoothie no final do *shelf life* do produto. *Least significant ranked difference* (LSRD) de 104,92 com 53 graus de liberdade: $t[(NK(K+1)/6)]^{1/2}$, com K = n° de amostras, N = n° de provadores e t = *t-value*.

Classificação	Smoothie probiótico banana		Smoothie probiótico manga	
	Normal	Acidificado	Normal	Acidificado
1	43	6	4	1
2	6	12	28	8
3	4	18	12	19
4	1	18	10	26
Rank Total	71 ^a	156 ^{ab}	136 ^{ab}	178 ^b

Os testes de preferência são usados para determinar as escolhas do consumir entre vários produtos, pretendendo-se determinar qual a melhor versão de cada smoothie no final do seu *shelf life*. Dos quatro smoothies apresentados 43 provadores escolheram o smoothie de banana com a formulação convencional como sendo o seu preferido (tabela 45), seguindo-se o smoothie com a formulação normal de manga e por ultimo os acidificados de banana e manga respectivamente.

A preferência dos provadores recai para as formulações menos ácidas, demonstrando, uma vez mais, que a acidez é um factor determinante na aceitação dos produtos. O sabor a banana revela maior aceitação do que o sabor apresentado pelo smoothie de manga.

5 Conclusão

Os smoothies de banana e manga mostraram ser uma boa matriz para inoculação da estirpe probiótica *L. rhamnosus* R11. A estirpe mostrou uma grande robustez, apresentando bons índices de viabilidade em matrizes de fruta em paralelo com uma boa resistência ao sistema gastrointestinal simulado.

A nível físico-químico, os smoothies não apresentaram alterações significativas a nível de quantidade de sólidos solúveis e actividade da água. É possível observar um decréscimo do pH para valores próximos dos 3,40, resultante da actividade metabólica do *L. rhamnosus* R11. A cor não apresentou alterações significativas.

A nível sensorial, o smoothie probiótico de banana recolheu uma grande preferência e aceitabilidade por parte dos provadores. As versões acidificadas revelaram uma menor aceitabilidade pelos consumidores face às versões padrão. Os smoothies probióticos apresentaram diferenças sensoriais significativas face aos smoothies padrão.

Considerando os resultados obtidos nas análises microbiológicas, físico-químicas e cor, o smoothie probiótico de banana tem todas as condições para ser considerada a sua industrialização, produção e comercialização para o mercado dos alimentos funcionais. O smoothie de manga necessita de melhoramento ao nível da formulação de forma a aumentar a sua aceitabilidade e preferência por parte do consumidor comum.

Mais estudos e análises podem ser realizados a fim de modificar as matrizes usadas, nomeadamente a adição de outros concentrados alternativos com vista ao aumento da relação açúcares/ácidos de forma a mascarar o sabor fermentado nos smoothies. Outras estirpes poderão ser testadas em matrizes de fruta, de forma a aumentar o leque de estirpes probióticas a serem usadas.

6 Bibliografia

1. Alegre I., Viñas I., Usall J., Anguera M., Abadias M., 2011, Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strains *Lactobacillus rhamnosus* GG, 28: 59-66.
2. Aura, A. M., 2005, *In vitro* digestion models for dietary phenolic compounds. PhD Thesis, Department of Chemical Technology, Helsinki University of Technology, Espoo, Finland: 30-37.
3. Badaró A.C.L., Guttuerres A.P.M., Rezende A.C.V., Stringheta P.C., 2009, Alimentos Probiótico: Aplicações como promotores da saúde humana - Parte 2, Revista Digital de Nutrição 3 (4): 396-416.
4. Buriti, F.C. A.; Komatsu, T. R.; Saad, S. M. I., 2007, Activity of passion fruit (*Passiflora adulis*) and guava (*Psidium guajava*) pulps on *Lactobacillus acidophilus* in refrigerated mousses, Brazil Journal of Microbiology, 38: 315-317.
5. Champagne C.P., Gardner N.J., 2005. Challenges in the Addition of Probiotic Cultures to Foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 45: 61-84.
6. Champagne C.P., Gardner N.J., 2008, Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses, Food Research International, 41: 539-543.
7. Costa A.I.A., Jongen W.M.F., 2006, New insights into consumer-led food product development, Trends in Food Science & Technology, 17: 457-465.
8. Coudeyras S., Forestier C., 2010, Microbiote et probiotiques: impact en santé Humaine, Canadian Journal of Microbiology, 56: 611-650.

9. Decagon, Fundamentals of Water Activity, Consulta do site: <http://www.labcell.com/pdf/Fundamentals.pdf> em 20 de Maio de 2011.
10. Diplock AT, Aggett PJ, Ashwell M, Bernet F, Fern EB, Roberfroid MB, 1999, Scientific concepts of functional foods in Europe consensus document, British Journal of Nutrition, 81: S1-S27.
11. Donkor O.N., Nilmini S.L.I., Stolic P., Vasiljevic T., Shah N.P., 2007, Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage, International Dairy Journal, 17: 657-665.
12. FAO/WHO, 2001, Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.
13. FAO/WHO, 2002, Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.
14. Gobbetti G., Di Cagno R., De Angelis M., 2010, Functional Microorganisms for Functional Food Quality, Food Science and Nutrition, 50: 716-727.
15. Gupta V., Garg R., 2009, Probiotics, Indian Journal of Medicinal Microbiology, 27: 202-209.
16. Hasler C.M, Brown A.C., 2009, Position of the American Dietetic Association: Funtional Foods, Journal of the American Dietetic Association, v: 109 n° 4.
17. Innova Database, Food and beverage; consulta da base de dados em <http://www.innovadatabase.com> a 13 de Abril de 2011.

18. Itan Y., Jones B. L., Ingram C.J., Swallow D.M., Thomas M.G., 2010, A worldwide correlation of lactase persistence phenotype, *BMC Evolutionary Biology*, 10:36.
19. ISO 4120, International Standard, Sensory analysis - Methodology - Triangle Test.
20. Juszczak L., Fortuna T., 2003, Viscosity of concentrated strawberry juice effect of temperature and soluble solids, *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* 6(2), 11.
21. Wright A., 2005, Regulating the safety of probiotics – The European approach, *Current pharmaceutical design*, 11: 17-23.
22. Lawless, H. T., & Heymann, H., 1998, *Sensory Evaluation of Food, Principles and Practices*. Aspen Publishers.
23. Laurent, C., Besancon, P. and Caporiccio, B, 2007, Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an *in vitro* digestion/caco-2 cell culture model. *Food Chemistry*, 100: 1704.
24. Luckow, T., Sheehan, V., Fitzgerald, G., Delahunty, C., 2006, Exposure, health information and flavor masking strategies for improving the sensory quality of probiotic juice. *Appetite* 47, 315–325.
25. Kailasapathy K., 2008, Recent Trends in the Probiotic and Prebiotic Functional Food Product Development, *Food Science and Technology: New Research*, Chapter 7.
26. Koferli C.S., Scwedler, P.P., Hong-Chen D., 1998, *Application of Classical and Novel Sensory Techniques in Product Optimization*.
27. Luckow T., Delahunty C., 2004, Which juice is “healthier”? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks, *Food Quality and Preference*, 15: 751-759.

28. Luckow T., Delahunty C., 2004, Consumers acceptance of orange juice containing functional ingredients, *Food Research International*, 37: 805-814.
29. Madureira A.R., Pereira C.I., Truszkowska K., Gomes A.M., Pintado M.E., Malcata F.X., 2005, Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract, *International Dairy Journal*, 15: 921-927.
30. Miles, O., & Misra, S. S., 1938, The estimation of the bactericidal power of the blood, *Journal of Hygiene*, 45: 41-45.
31. MINOLTA, 1994, Precise color communication: color control from feeling to instrumentation, MINOLTA Co. Ltd.
32. Murray J.M., Delahunty C.M., Baxter I.A., 2001, Descriptive sensory analysis: past, present and future.
33. Nualkaekul S., Charalampopoulos D., 2011, *International Journal of Food Microbiology*, 146: 111-117.
34. Prado F.C., Parada J.L., Pandey A., Scoccol C., 2008, Trends in non-dairy probiotic beverages, 111-123.
35. Raimundo E., Kruger R. L. Di Luccio, M. Cichoski, A. J, 2007, Cor e viscosidade de bactérias lácticas em sumo de laranja pasteurizado, submetido ao efeito da luz durante o armazenamento, *Alimentos e Nutrição*, 18: 449-456.
36. Regulamento (CE) nº258/97 do Parlamento Europeu e do Conselho de 27 de Janeiro de 1997 relativo a novos alimentos e ingredientes alimentares, *Jornal Oficial* nº L 043 de 14/02/1997, página 0001 – 0006.

37. Rivera-Espinoza Y., Gallardo-Navarro Y., 2010, Non-dairy probiotic products, *Food Microbiology*, 27: 1-11.
38. RTS Resource, consulta: <http://ingredientsdirectory.com/> em 14 de Janeiro de 2011.
39. Saad S. M. I., 2006, Probióticos e prebióticos: o estado da arte, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42: nº 1.
40. Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Matto J., Matilla-Sandholm T., 2000, Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties, *Journal of Biotechnology*, 84: 197-215.
41. Saha N. P., Ding W. K., Fallourd M. J., Leyer G., 2010, Improving the stability of probiotic bacteria in model fruit juices using vitamins and antioxidants, *Journal of Food Science*, 75: nº 5.
42. Saxelin M., 2007, Probiotic Formulations and Applications, the Current Probiotics Market, and Changes in the Marketplace: A European Perspective, *European Perspective on Probiotics*, 46: S. 2.
43. Safe Food, Smoothies, February 2009, Consumer knowledge, attitudes and beliefs around the nutritional content of smoothies, *Safe food*.
44. Sheehan V.M., Ross P. Fitzgerald G.F., 2007, Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8: 279-284.
45. Souci, S. W., Fachmann, W., Kraut, H. (2008). *Food Composition and Nutrition Tables*. MedPharm Scientific Publishers 7ed.

46. Turkmen I., Eksi A., 2011, Brix degree and sorbitol/xylitol level of authentic pomegranate, Food Chemistry.
47. Valik L., Gorner F., 1995, Effect of Water Activity Adjusted with Different Solutes on Growth and Lactic Acid Production by *Lactobacillus helveticus*, Folia Microbiol. 40 (5): 472-474.
48. Vasiljevic T., 2008, Probiotics – From Metchnikoff to bioactives, International Dairy Journal, 18: 714-728.
49. Ukeyima M. T., Enujiugha V.N., Sanni, T.A., 2010, Current applications of probiotic food in Africa, African Journal of Biotechnology, 9: 394-401.
50. Yoon, K. Y., Woodams E. E., Hang, Y. D., 2004, Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria, The Journal of Microbiology, 42: n°4: 315-318.
51. Yoon, K. Y., Woodams, E. E., Hang, Y. D., 2005, Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria, Lebensm.-Wiss. U.-technol, 28: 73-75.
52. Amárach Consulting, 2007, From Revolution to Evolution: The Eating Out Market in Ireland – A Food Futures Study for ARAMARK
Consulta:<http://www.amarach.com/assets/docs/Food%20Futures%20Report%202007.pdf>
f em 22 de Dezembro de 2010.

Anexos

Anexo 1 - Industrialização

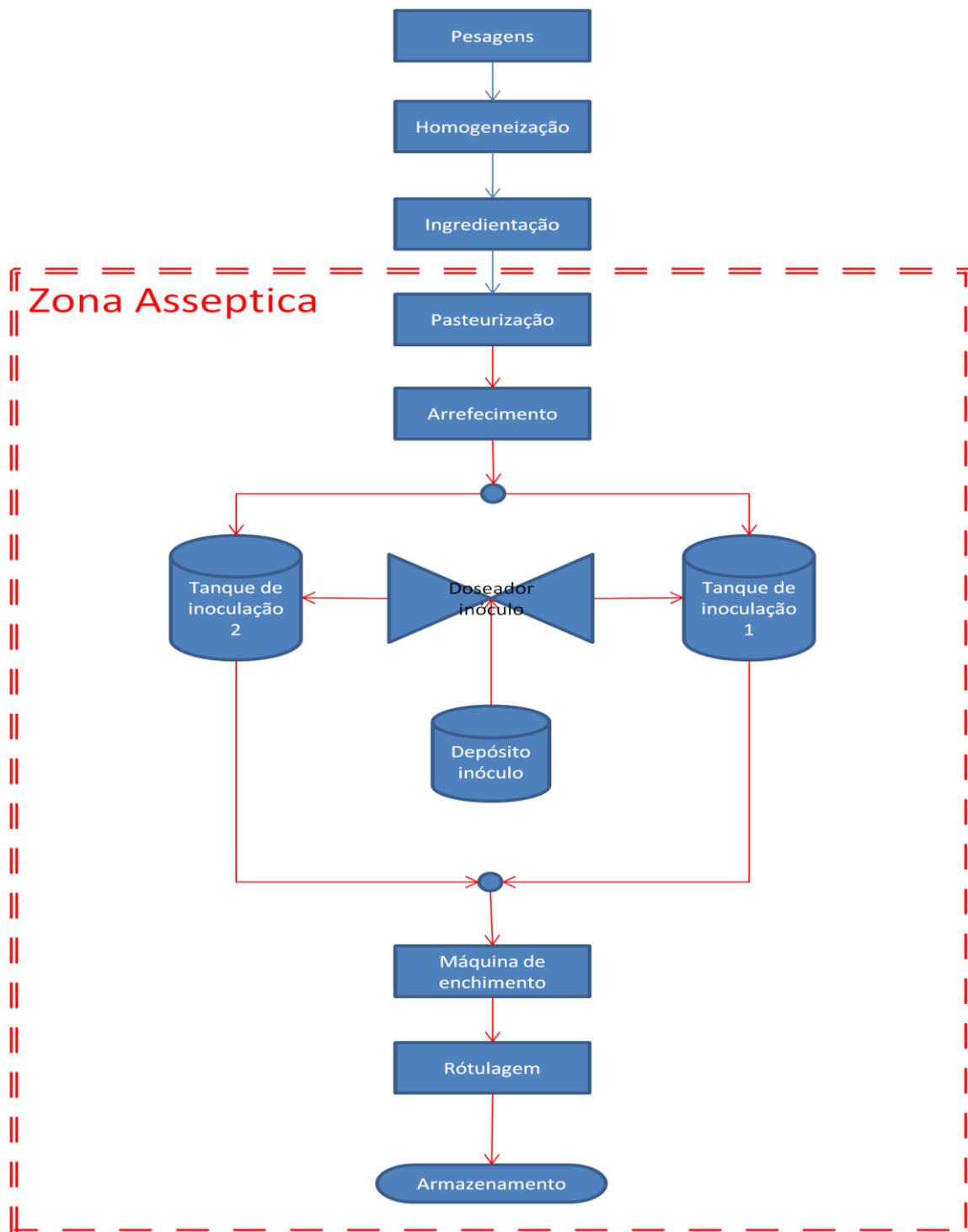


Figura 30 - Fluxograma do processo industrial

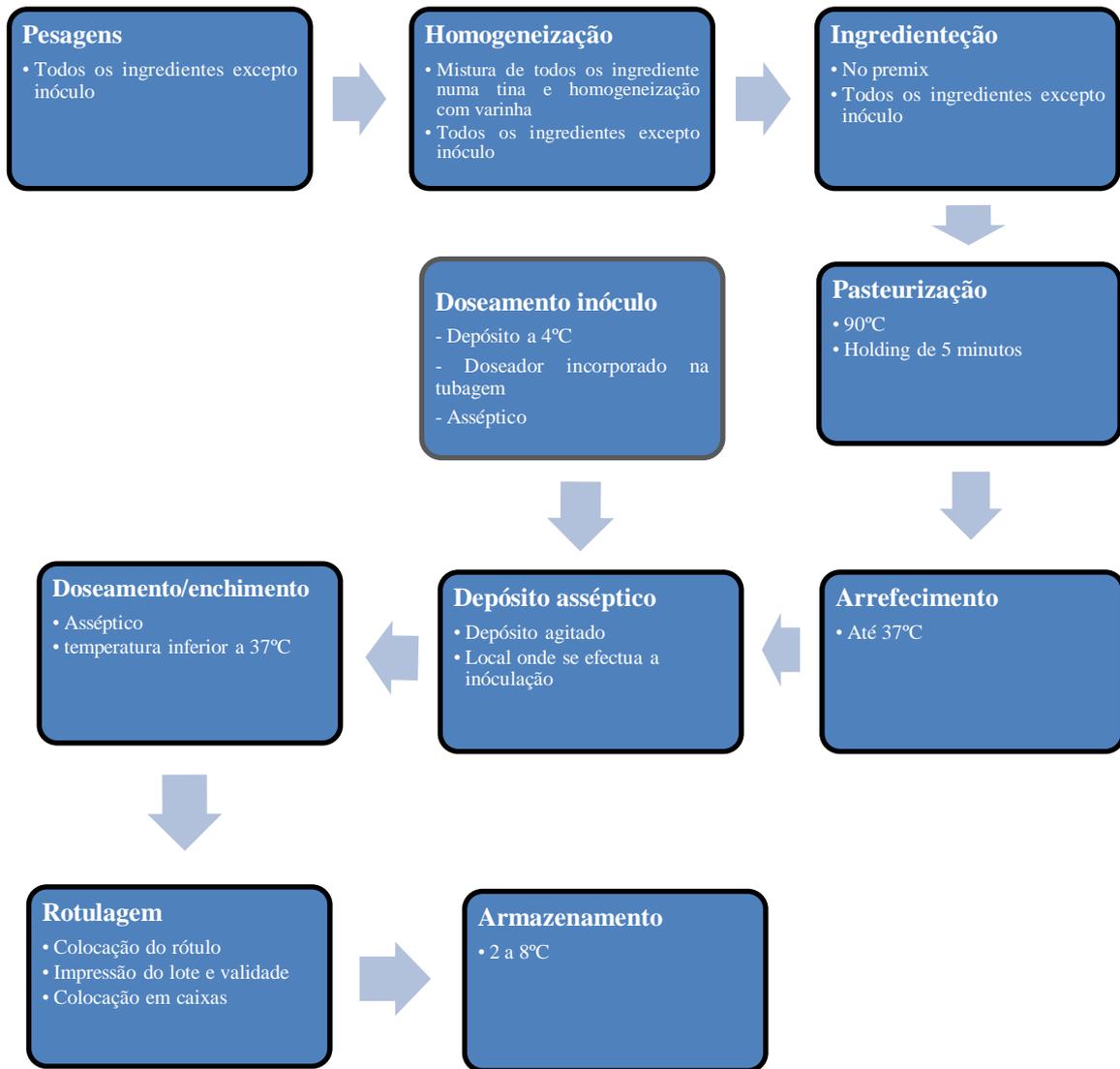


Figura 31 - Diagrama do processo industrial

Anexo 2 – Questionários da análise sensorial

Tese de aceitabilidade do *smoothie* probiótico

Sexo _____

Idade _____

Data __/__/__

Indicações Gerais:

Por favor lave a boca com água antes de começar.

À sua frente encontram-se duas amostras identificadas por 3 algarismos.

Em baixo encontra-se uma recta na qual se pretende, através da marcação de um traço e respectiva identificação da amostra, determinar a aceitabilidade de cada uma das amostras apresentadas.

Como classifica a aceitabilidade de cada uma das amostras?

Muito baixa

Muito alta

Indique, através do código que identifica cada uma das amostras, com que frequência consumiria cada um dos produtos:

- Consumiria o produto sempre que tivesse oportunidade _____
- Consumiria o produto frequentemente _____
- Consumiria o produto regularmente _____
- Gosto do produto e consumiria ocasionalmente _____
- Consumiria se estivesse disponível, mas não saía do meu caminho _____
- Não gosto, mas consumiria ocasionalmente _____
- Difícilmente consumiria _____
- Consumiria se não tivesse outro alimento _____
- Só consumiria o produto se fosse obrigado _____

Obrigado

Teste de preferência para *smoothies* probióticos

Sexo _____

Idade _____

Data __/__/__

Indicações Gerais:

Por favor lave a boca com água antes de começar e antes de cada amostra, quantas vezes necessitar.

Na sua frente encontram-se 4 amostras numeradas.

Classifique as amostras da que mais prefere (=1) à que menos lhe agrada (=4).

Pode voltar a provar quantas vezes necessitar.

Amostra	Classificação
140	_____
733	_____
488	_____
243	_____

Obrigado

Anexo 3 – Contagem de Células Viáveis

Tabela 46 – Contagem de células viáveis de *L. rhamnosus* R11 no smoothie de manga ao longo de 150 dias.

Tempo (dias)	Réplica	Células viáveis (CFU / mL)	LOG (N)	Média LOG	Desvio Padrão
0	A	5,38E+08	8,7304	8,791	0,053
	B	6,75E+08	8,8293		
	C	6,50E+08	8,8129		
14	A	5,63E+08	8,7501	8,775	0,021
	B	6,13E+08	8,7871		
	C	6,13E+08	8,7871		
28	A	1,20E+09	9,0792	9,123	0,073
	B	1,21E+09	9,0837		
	C	1,61E+09	9,2075		
42	A	1,20E+09	9,0792	9,138	0,099
	B	1,21E+09	9,0837		
	C	1,79E+09	9,2522		
80	A	1,56E+09	9,1938	9,078	0,103
	B	1,11E+09	9,0463		
	C	9,88E+08	8,9945		
100	A	8,00E+08	8,9031	9,019	0,110
	B	1,33E+09	9,1222		
	C	1,08E+09	9,0314		
150	A	2,75E+08	8,4393	8,333	0,099
	B	2,08E+08	8,3170		
	C	1,75E+08	8,2430		

Tabela 47 - Contagem de células viáveis de *L. rhamnosus* R11 no smoothie de banana ao longo de 150 dias.

Tempo (dias)	Réplica	Células viáveis (CFU / mL)	LOG (N)	Média LOG	Desvio Padrão
0	A	1,16E+09	9,0654	9,053	0,048
	B	1,00E+09	9,0000		
	C	1,24E+09	9,0925		
14	A	2,74E+09	9,4374	9,404	0,062
	B	2,15E+09	9,3324		
	C	2,78E+09	9,4433		
28	A	2,56E+09	9,4087	9,303	0,144
	B	1,38E+09	9,1383		
	C	2,30E+09	9,3617		
42	A	1,79E+09	9,2522	9,286	0,053
	B	2,23E+09	9,3473		
	C	1,81E+09	9,2583		
80	A	9,13E+08	8,9602	8,978	0,047
	B	8,75E+08	8,9420		
	C	1,08E+09	9,0314		
100	A	7,88E+08	8,8963	8,828	0,068
	B	6,75E+08	8,8293		
	C	5,75E+08	8,7597		
150	A	6,00E+07	7,7782	7,850	0,062
	B	7,75E+07	7,8893		
	C	7,63E+07	7,8822		

Manga	T0				T14				T28			
	Sexo	Idade	N	A	Sexo	Idade	N	A	Sexo	Idade	N	A
Provador 1	F	20	5,0	3,2	F	20	1,3	2,4	F	20	6,4	5,0
Provador 2	M	31	4,1	0,6	M	31	2,1	0,5	F	20	8,6	5,6
Provador 3	F	26	7,8	1,1	F	26	7,0	2,7	F	31	0,8	1,7
Provador 4	M	20	11,6	3,9	M	20	5,6	1,2	M	31	0,8	0,4
Provador 5	F	25	2,4	3,1	F	25	6,5	0,5	F	26	8,3	3,1
Provador 6	F	20	10,0	5,7	F	27	3,2	0,5	M	20	11,1	4,4
Provador 7	F	27	8,9	1,6	F	31	0,8	1,3	F	25	10,1	8,1
Provador 8	M	28	3,6	2,0	M	28	1,8	0,7	F	27	0,0	0,0
Provador 9			12,2	4,3	F	24	6,4	2,6	M	28	0,3	2,0
Provador 10	F	18	10,4	2,0	F	18	2,4	0,0	M	21	10,1	4,8
Provador 11	F	20	10,2	2,3	F	20	5,8	6,9	F	18	8,6	4,2
Provador 12	M	20	9,8	2,2	M	20	0,0	6,3	F	20	7,0	8,3
Provador 13	M	29	9,7	3,2	M	29	4,8	2,0	M	20	10,8	4,0
Provador 14	F	22	9,8	4,8	F	22	6,4	0,9	M	29	2,3	3,8
Provador 15	F	21	11,0	3,0	F	21	9,7	0,4	F	22	8,2	2,2
Provador 16	M	22	14,4	7,8	M	22	5,3	3,6	F	21	1,8	0,2
Provador 17	M	25	11,4	2,3	M	25	9,2	7,2	M	22	2,6	1,1
Provador 18	F	23	8,6	4,8	F	23	0,8	9,8	M	25	5,1	3,4
Provador 19	F	31	2,6	1,8	F	20	4,4	5,9	F	23	2,8	1,5
Provador 20	M	41	12,0	5,3	F	20	6,8	3,2	M	41	0,5	5,5
Provador 21	F	20	12,9	6,2	F	20	10,6	5,8	M	20	10,1	7,5
Provador 22	F	21	11,4	8,7	F	20	6,6	8,1	F	22	11,1	6,9
Provador 23	F	20	14,7	10,2	F	19	7,1	3,7	F	19	5,3	9,8
Provador 24	F	20	14,7	9,9	F	19	11,7	5,9	M	19	9,4	7,0
Provador 25	M	31	10,6	8,7	M	19	6,3	10,2	M	22	5,7	3,6
Provador 26	M	20	11,8	10,4	M	19	7,1	11,1	F	20	10,5	3,5
Provador 27	F	19	10,0	8,5	M	20	7,1	4,5	F	19	12,1	1,5
Provador 28	M	21	12,8	8,6	M	19	9,1	5,6	M	19	10,3	9,0
Provador 29	M	43	12,6	3,7	F	22	2,5	7,3	F	19	2,0	4,6
Provador 30	M	20	7,2	3,8	M	20	5,3	4,4	M	19	5,4	9,7
Provador 31	F	19	13,6	3,5	F	20	14,2	13,2	M	40	8,0	1,7
Provador 32	F	19	10,5	2,4	F	19	12,1	11,0	M	19	11,2	8,4
Provador 33	F	19	11,0	5,2	F	24	3,0	10,8	M	20	8,7	11,5
Provador 34	F	19	10,7	4,8	M	24	8,3	10,7	F	19	10,6	7,8
Provador 35	F	19	5,6	0,0	M	20	6,8	10,0	F	21	10,2	3,4
Provador 36	F	20	10,0	4,8	F	19	8,3	3,8	M	19	8,3	4,8
Provador 37	F	20	10,6	4,3	F	19	12,8	9,0	F	20	7,0	9,2
Provador 38	M	19	10,0	6,5	F	20	14,2	13,6	M	20	6,3	5,0
Provador 39	F	20	5,3	2,6	M	21	11,3	5,0	F	20	14,4	6,3
Provador 40	F	20	9,4	2,3	M	19	11,1	6,4	M	21	11,0	5,7

Média		23,0	9,8	4,5		21,9	6,6	5,5		22,7	7,1	4,9
Desvio Padrão		5,8	3,2	2,8		3,5	3,8	3,9		5,4	3,9	3,0

Banana	T0				T14				T28			
	Sexo	Idade	N	A	Sexo	Idade	N	A	Sexo	Idade	N	A
Provador 1	M	25	14,0	6,2	M	31	10,5	1,6	M	25	14,7	5,4
Provador 2	M	20	10,1	1,2	M	25	12,1	5,7	M	20	7,4	1,4
Provador 3	F	20	12,1	2,8	M	20	7,0	0,8	F	20	11,8	3,2
Provador 4	F	26	11,2	1,9	F	20	9,7	5,1	F	26	11,4	1,1
Provador 5	F	25	12,1	0,4	F	25	6,6	1,9	F	25	13,4	1,5
Provador 6	M	28	4,1	0,0	M	28	4,7	1,4	M	28	5,2	0
Provador 7	M	25	11,8	0,8	F	26	6,4	2,0	M	21	13,9	5,6
Provador 8	F	18	11,4	3,3	M	21	11,2	4,8	F	18	12,2	0,8
Provador 9	F	21	14,0	3,2	F	18	9,4	3,8	F	21	12	7,2
Provador 10	M	20	4,8	6,5	F	21	10,0	4,2	M	20	8,8	7,1
Provador 11	F	22	8,9	0,3	M	20	7,7	3,8	F	22	10	1,4
Provador 12	F	23	7,2	0,2	F	22	12,2	3,3	F	23	9,2	2,3
Provador 13	F	20	4,8	3,6	F	23	4,0	0,2	F	20	10,9	1
Provador 14	F	25	10,5	5,0	F	20	10,1	1,7	M	21	10	3
Provador 15	M	41	14,8	6,8	M	21	3,2	1,8	F	25	12,2	7,1
Provador 16	M	22	13,1	1,5	F	25	10,6	4,5	M	41	14,3	9,1
Provador 17	F	24	9,1	3,4	M	41	10,2	8,4	M	22	13,6	2,8
Provador 18	F	20	8,3	2,8	M	41	14,9	13,6	F	20	12	0,3
Provador 19	M	31	8,7	1,2	F	20	14,6	13,9	M	31	9,3	1,6
Provador 20	F	20	14,7	10,6	M	22	14,3	5,4	F	24	10,3	8,4
Provador 21	F	20	13,8	12,7	F	24	8,9	1,4	F	19	11,9	10,6
Provador 22	F	21	13,2	11,1	F	24	8,5	1,7	F	20	14,1	10
Provador 23	M	21	13,9	3,4	F	22	4,6	0,1	F	19	11,1	9,4
Provador 24	F	20	13,6	2,8	M	20	11,7	1,0	F	19	10,6	8,6
Provador 25	F	20	13,4	3,4	F	20	7,9	10,1	M	22	12,5	3,9
Provador 26	F	19	3,9	5,0	F	19	12,3	12,8	F	20	10,6	4,9
Provador 27	M	19	15,0	6,1	F	19	2,3	10,2	M	20	9,7	2,4
Provador 28	F	20	12,9	3,0	F	20	4,0	7,5	M	20	8,7	3,2
Provador 29	F	20	9,9	6,0	F	20	12,6	2,8	M	21	10,2	6,3
Provador 30	M	19	12,2	5,2	F	20	10,6	6,2	F	19	10,3	6,6
Provador 31	F	20	7,2	4,0	F	19	5,1	3,8	F	20	11,4	10,1
Provador 32	M	22	12,0	4,5	M	31	8,2	6,4	F	20	10,9	8,1
Provador 33	F	19	13,8	0,4	M	24	9,0	5,8	F	20	12,6	9,4
Provador 34	M	21	10,3	4,1	M	20	11,4	3,4	F	20	14,7	7,3
Provador 35	F	19	10,5	3,5	F	22	12,7	2,5	F	21	13,3	2,9
Provador 36	F	19	13,1	3,0	F	19	10,0	2,9	F	20	14,1	11,6
Provador 37	F	19	11,9	0,1	M	19	12,6	2,6	F	20	13	5,7
Provador 38	F	19	9,8	1,1	F	19	13,2	1,3	M	43	13,8	3
Provador 39	M	20	3,5	2,9	M	20	10,7	9,2	M	20	10,7	5,5
Provador 40	F	21	10,3	4,2	M	19	7,6	8,6	M	19	9,2	3,4
Média		21,9	10,7	3,7		22,8	9,3	4,7		22,4	11,4	5,1
Desvio Padrão		4,2	3,2	2,9		5,3	3,3	3,7		5,3	2,1	3,3