



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

THAÍS AMARAL FERREIRA

**VIABILIDADE DE *LACTOBACILLUS CASEI* EM LEITE FERMENTADO COM
REDUÇÃO DE AÇÚCAR E ADIÇÃO DE BIOMASSA DE BANANA VERDE**

BRASÍLIA – DF

2016

THAÍS AMARAL FERREIRA

**VIABILIDADE DE *LACTOBACILLUS CASEI* EM LEITE FERMENTADO COM
ADIÇÃO DE BIOMASSA DE BANANA VERDE E REDUÇÃO DE AÇÚCAR.**

**Monografia apresentada ao
departamento de nutrição como requisito
parcial para obtenção do título de
Nutricionista, sob orientação da prof.
Dra. Eliana dos Santos Leandro.**

BRASÍLIA – DF

2016

Monografia apresentada ao departamento de nutrição como requisito parcial para obtenção do título de Nutricionista.

THAÍS AMARAL FERREIRA

Monografia apresentada em 02/12/2016

Orientadora Prof. Dra. Eliana dos Santos Leandro

1º Examinador: Prof. Dra Renata Puppim Zandonadi

2º Examinador: Prof. Dra. Verônica Cortez Ginani

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela oportunidade e proteção.

Ao meu irmão, Arthur, por sempre acreditar em mim.

Aos meus pais, pelo apoio ao meu crescimento e incentivo a não desistir dos meus sonhos e de buscar sempre ser alguém melhor.

Ao meu amado, por todo seu companheirismo, amor, paciência e compreensão.

A minha orientadora, Prof. Dra. Eliana dos Santos Leandro, pelos ensinamentos, suporte, empenho e dedicação nas análises deste trabalho.

À Carolina Vogado, aluna mestranda, que com toda sua generosidade cedeu parte de sua pesquisa e deu todo suporte para o desenvolvimento deste estudo.

RESUMO

Probióticos são definidos como micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). A maioria dos micro-organismos probióticos são bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade de *Lactobacillus casei* em leite fermentado com adição de biomassa de biomassa de banana verde (BBV) em diferentes concentrações: 0%, 5%, 10% e 15%, durante o período de estocagem, e investigar se a composição da polpa é capaz de melhorar, ou pelo menos não retardar, o crescimento da bactéria ácido láctica (BAL). Outro foco foi examinar as taxas de pós acidificação através das medições de pH durante o período de 28 dias. Para a elaboração dos leites fermentados foram utilizados os seguintes ingredientes: água mineral, leite em pó desnatado, açúcar cristal, biomassa de banana verde, cultura probiótica de *L. casei* ativa em leite desnatado reconstituído a 10% (LDR 10%) e essência de baunilha. A viabilidade da bactéria probiótica bem como as determinações dos pHs das amostras, foram analisadas e quantificadas durante os 28 dias de armazenamento refrigerado dos produtos a cada 7 dias. A adição de biomassa de banana verde melhorou a viabilidade das BAL, mas não acelerou a fermentação e o crescimento das bactérias probióticas ao longo dos dias analisados, além disso, não aumentou significativamente a produção de ácido láctico, influenciando positivamente a estabilidade do leite fermentado durante o período de estocagem.

Palavras-chaves: biomassa de banana verde, leite fermentado, viabilidade, bactérias ácido lácticas.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
2	REVISÃO BIBIOGRÁFICA	9
	2.1. Leite Fermentado.....	9
	2.2. Bactérias lácticas como probióticos	10
	2.3. Bactérias lácticas probióticas em alimentos.....	12
	2.4. Biomassa de banana verde e amido resistente	14
	2.5. Utilização de biomassa de banana verde em alimentos.....	16
3	OBJETIVOS.....	18
	3.1. OBJETIVO GERAL.....	18
	3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
	4.1. Caracterização do estudo	19
	4.2. Elaboração dos leites fermentados	19
	4.2.1 Ativação da cultura.....	19
	4.2.2 Elaboração dos produtos.....	19
	4.3. Determinação da sobrevivência <i>de L. casei</i>	20
	4.4. Análise de parâmetro físico-químico - Determinação do pH	20
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
6	CONCLUSÃO.....	27

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
---------------------------------	----

1 INTRODUÇÃO

O consumo de alimentos funcionais tem crescido constantemente nos países industrializados. Destes produtos, cerca de 65% das vendas do setor de inovações de alimentos são oriundos de produtos lácteos, destacando ainda a categoria de produtos fermentados com características probióticas (MENRAD, 2003).

Para a elaboração destes, utilizam-se bactérias ácido lácticas (BAL), que são altamente adaptadas a crescer em lactose e se converter em ácido láctico, dentre os benefícios em seu consumo destaca-se a inibição de microorganismos patogênicos, proteção contra doenças gastrointestinais, atividades anti-mutagênicos e anti-cancerígenos, e melhora da resposta imune do hospedeiro (DU TOIT et al, 1998;. NGUYEN et al., 2007).

Devido a grande relevância na área da saúde e na indústria de alimentos, o desenvolvimento de novos produtos com comprovado efeito probiótico tem sido tema atual de diversas pesquisas. Dentre os microorganismos estudados, as estirpes dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as que têm comprovado melhor viabilidade e manutenção das concentrações das bactérias durante a vida útil de produtos à base de leite (BURITI, et al., 2005; BURITI et al., 2007; SOUZA & SAAD, 2009; GLUSAC, J. et al., 2015).

É importante destacar que as concentrações das bactérias probióticas desses alimentos funcionais não podem ser comprovadas pelo consumidor, para isso existem legislações específicas que regulamentam as indústrias quanto à sua produção para garantir a real eficácia do seu consumo.

Com o intuito de melhorar as características organolépticas e principalmente nutricionais de bebidas lácteas com alto efeito probiótico, a indústria tem buscado agregar ingredientes como polpas ou purês de frutas e adoçantes naturais (KHURANA & KANAWJIA, 2007; ZOELLNER, 2007; GLUSAC, J. et al., 2015). Desta forma, destaca-se a possibilidade de adicionar a biomassa da banana verde, que é uma iguaria com alta concentração de amido resistente (AR), fibras, vitaminas e minerais e tem um potencial efeito fisiológico prebiótico em humanos.

A polpa do fruto não amadurecido é insípida e inodora, o que possibilita sua utilização na indústria alimentícia como espessante em sopas, caldos e molhos de carne, estabilizante em molhos de salada e ligante e principalmente, como ingrediente primário na elaboração de receitas modificadas de pães, bolos, maioneses e massas para indivíduos com alergias e/ou intolerâncias alimentares (SILVA, 2006; CEREDA, 2002; GUILBOT & MERCIER, 1985; RANIERI & DELANI, 2014; VALLE & CAMARGOS, 2003).

A adição de biomassa de banana verde em alimentos lácteos com potencial probiótico ainda não foi desenvolvida pela indústria de alimentos. As consequências dessa relação simbiótica podem ser teoricamente definidas e tendem a ter um bom resultado, mas é importante analisar o efeito na viabilidade da estirpe probiótica, de modo que a polpa do fruto não afete o crescimento e a disponibilidade das BAL ao longo do período de estocagem.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leite Fermentado

A técnica de fermentação de alimentos é praticada desde os nossos antepassados em diversos produtos como, leite, cereais, mandioca e vegetais, compreendendo cerca de 5 a 40% da dieta de algumas populações. Apesar de ser uma tecnologia antiga, ainda é parte da cultura de comunidades indígenas na África e da maior parte dos países em desenvolvimento. O intuito primordial de sua aplicação foi de prolongar a vida útil dos alimentos e melhorar características sensoriais e organolépticas, mas, além disso, encontrou alterações químicas seguras e eficazes à promoção da saúde do indivíduo que os consome (MOKOENA et al., 2016; BORRESEN et al., 2012).

Leite fermentado é um dos produtos derivados da matriz láctea, resultante da fermentação de leite pasteurizado por fermentos lácteos próprios a partir dos seguintes cultivos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp. *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* e/ou outras bactérias acidolácticas. Essas culturas lácticas devem estar viáveis, ativas e em concentração significativa durante todo o prazo de validade do produto (BRASIL, 2007).

A Resolução Nº 47/97 do MERCOSUL, que regulamenta a identidade e qualidade de leites fermentados, prevê a classificação dos leites fermentados conforme a quantidade de gordura que apresenta sua base láctea, categorizando-os em leite fermentado com nata, integral, parcialmente desnatado ou desnatados, e permite também a incorporação de ingredientes como: frutas em pedaços ou secas, mel, cereais, café, maltodextrinas e outros, a fim de melhorar as características sensoriais favoráveis à bebida, como aroma, sabor e textura, desde que estes sozinhos ou combinados, estejam presentes em uma proporção de no máximo 30% do produto final.

Em âmbito nacional, a Instrução Normativa nº 46 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (que tem o mesmo propósito da norma anterior), determina que o leite utilizado na fabricação poderá ser em natureza ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos de origem láctea. Além disso, deve manter características organolépticas de aspecto, cor, odor e sabor, podendo estes ser alterados em virtude da adição de substâncias alimentícias recomendadas pela tecnologia atual de fabricação de leites fermentados (BRASIL, 2007).

2.2. Bactérias lácticas como probióticos

Os fermentos lácteos utilizados para a fabricação de laticínios e associados ao processamento de carnes, bebidas alcoólicas e vegetais são pertencentes ao grupo das bactérias ácido lácticas (BAL) que advém do filo Firmicutes. Formadas por organismos gram-positivos, não formadores de esporos, catalases negativos e que normalmente crescem e sobrevivem em situações de baixíssimo ou nenhum oxigênio – anaeróbicos, compreendem em torno de 20 gêneros, sendo os principais: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *enterococcus*, *Oenococcus*, *tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella*. *Lactobacillus* é o maior com 145 espécies reconhecidas (HUERTAS, 2010; BRUNO, 2011).

O processo de fermentação realizado por esse grupo possibilita classificar os diversos gêneros pertencentes em homofermentativos – produzem mais de 85% de ácido láctico a partir de glicose, ou heterofermentativos – produz somente 50% de ácido láctico. Outra forma de classifica-las é em mesófilos ou termófilos, segundo a temperatura de crescimento (HUERTAS, 2010). As BAL foram definidas como probióticos na década de 60, e nos anos 80 como suplementos dietéticos microbianos, mas somente em 2001 a

FAO/WHO definiu como probióticos apenas os micro-organismos vivos que quando administrados em quantidade adequada conferem benefícios à saúde do hospedeiro.

Segundo a legislação Brasileira os benefícios do consumo de alimentos probióticos são alcançados quando o indivíduo consome um produto contendo uma concentração de micro-organismos probióticos na faixa de 10^8 a 10^9 UFC/g. Sendo esta a recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante, além de possuir laudo de análise que comprove a viabilidade mínima da probiose até a data final do tempo de prateleira. Caso esteja em quantidade menor do que o recomendado, o produtor deve fundamentar sua eficácia (BRASIL, 2002). É importante ressaltar que sua sobrevivência depende das propriedades do micro-organismo e de características da composição do produto ao qual a substância será adicionada, como acidez, fontes de nitrogênio, atividade de água, e outros (OBANDO et al., 2010).

As bactérias probióticas têm sido adicionadas a vários alimentos nas últimas décadas, em especial as pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (DHINGRA & PARLE, 2005). Dos benefícios em ingerir probióticos, os mais elucidados são: capacidade de modular respostas imunitárias sistêmicas, aumento da produção de enzimas que auxiliem na digestão da lactose (PENNA, et al., 2000), efeito hipocolesterolêmico (MITAL & GARG, 1995), ação anti-cancerígena (HASLER, 1998), regulação de fezes saudáveis (DAZA, 2004), prevenção de infecções causadas por *Helicobacter pylori* (MERINO, 2006), produção de vitaminas (SANTOS et al., 2006), e outros.

Os mecanismos de ação dependem de cada estirpe e devem ser mais explorados. O que se sabe atualmente é que durante o reconhecimento do agente infeccioso, as bactérias probióticas são capazes de neutralizar os processos inflamatórios resultantes da interação, favorecendo assim a permeabilidade da mucosa intestinal. Experimentos mostraram que

estas extraídas, a partir de amostras de alimentos fermentados, exibem excelente atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos patogênicos (SHINDE, 2012).

Um estudo recolheu 17 amostras de alimentos e isolou 26 BAL a fim de rastrear suas ações contra sete estirpes patogênicas em humanos. Destas, três eram de fungos (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus* sp. e *Candida albicans*) e quatro de bactérias (*Escherichia coli*, *Salmonella Ser enterica. typhi* e *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus amyloliquifaciens*). Dos micro-organismos analisados, oito foram considerados com excelente potencial probiótico, pois exerceram atividade antimicrobiana favorável ao número máximo de estirpes testadas (Pundir, et. al., 2013).

Outra pesquisa foi realizada com mulheres que possuíam infecção urinária recorrente, e apesar de necessitar mais análises, verificou-se que a suplementação de *L. rhamnosus* (combinado a Cranberries e Vitamina C) restaurou os *lactobacillus* da vagina e competiu com agentes patogênicos urogenitais, evitando assim a vaginose bacteriana (MONTORSI, 2016).

2.3. Bactérias lácticas probióticas em alimentos

Atualmente os consumidores vêm se conscientizando mais da relação que os alimentos exercem na sua saúde e se preocupando com a qualidade e segurança dos produtos que consomem. Como resposta a essa demanda, a ciência e a indústria de alimentos têm desenvolvido novos alimentos com adição de BAL que podem melhorar a qualidade de vida da população, agregando-os à classificação dos alimentos funcionais (ANGELOV et. al., 2006).

Dentre as variáveis que devem ser consideradas ao elaborar um produto com bactérias bioativas, a mais importante é o controle das reações que as culturas adicionadas podem

exercer, já que estas quando em contato a ingredientes intrínsecos ou adicionados, podem afetar a viabilidade, o pH e propriedades funcionais do produto. Estudos mostram que a principal desvantagem que pode ocorrer com o incremento desses micro-organismos é causada pelo metabolismo ativo, onde algumas estirpes produtoras de ácido láctico continuam a produzir o composto, diminuindo o pH do alimento durante o armazenamento e tornando-o impróprio para o consumo (BEVILACQUA et. al., 2016)

Até o momento, os produtos de base láctea têm sido os mais utilizados para a incorporação de probióticos, tendo um apreço considerável no setor de alimentos funcionais e um crescente mercado de iogurtes e bebidas fermentadas (HAYS et. al., 2006). Nestes alimentos, as bactérias atuam contribuindo para a preservação da matéria-prima, devido à acidificação, e nas características finais do produto como sabor e textura (KLEEREBEZEM et. al., 2010). As estirpes probióticas têm apresentado boa sobrevivência em queijos frescos. O fato dos queijos frescos apresentarem uma vida útil curta e estocagem sob refrigeração, acaba contribuindo na sobrevivência das estirpes probióticas, além disso, a alta atividade de água, baixo pH e conteúdo de sódio, permitem que os queijos frescos sejam produzidos sem adição de conservantes, colaborando assim para o crescimento e sobrevivência de estirpes probióticas (BURITI et al., 2005).

A viabilidade de micro-organismos probióticos, (*Lactobacillus casei* 01, *Bifidobacterium* BB12 e *Lactobacillus acidophilus* La-5) em queijo cottage manteve-se superior a 10^6 UFC/g durante 14 dias de estocagem refrigerada. Dentre elas, a estirpe *Lactobacillus acidophilus* La-5 foi a que registrou menor redução de sua população e manteve números altos passados 21 dias de estocagem. A estirpe *Lactobacillus casei* 01 foi a que apresentou os maiores números tanto no início quando ao final do armazenamento (OBANDO, et. al., 2010)

A viabilidade das estirpes *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaris* foram avaliadas em iogurte elaborado com adição de proteína concentrada de soro de leite e mel de acácia foi analisada durante 21 dias de estocagem. Verificou-se que os ingredientes adicionados aceleraram a atividade de fermentação dos micro-organismos e estimularam seu crescimento, mas não afetaram sua viabilidade no período de estocagem. Além disso, não intensificaram a produção de ácido lático, o que pode ser positivo para a estabilidade do produto (GLUSAC, et al., 2015).

Uma forma de melhorar a funcionalidade de um alimento é a combinação de culturas probióticas com ingredientes prebióticos, proporcionando assim alimentos simbióticos. Segundo a Instrução Normativa nº 13/2004 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, prebióticos são definidos como ingredientes alimentares não digeríveis que ao serem consumidos estimulam a proliferação e as atividades das bactérias bioativas (CAPRILES et al., 2005), enquanto estas agem antagonicamente suprimindo ações de outros micro-organismos putrefativos (SALGADO, et al., 2001).

2.4. Biomassa de banana verde e amido resistente

A banana (*Musa* spp.) é uma frutífera pertencente à família Musaceae. Segundo a FAO (2015) é a fruta mais produzida no Brasil e seu plantio é realizado em todos os estados, sendo o país considerado o terceiro maior produtor mundial do fruto, seguido do Equador e Índia. A elevada comercialização e, conseqüente, alto consumo, podem ser explicados pela ampla adaptação, possível produção durante todo o ano, fácil transporte e armazenagem do fruto verde, e simplicidade para o amadurecimento (FAO, 2004; FAO 2013).

Na colheita do fruto, aproximadamente 20% da quantidade é rejeitada, seja por defeitos de aparência ou armazenamento inadequado. Portanto, nos últimos anos a indústria tem se interessado em buscar formas de minimizar os resíduos provenientes da produção e dos

frutos desperdiçados a partir da utilização da polpa da banana ainda verde, da produção de farinha de diversas variedades do cultivar, e da extração e uso de componentes orgânicos advindos do fruto (LEONEL et al., 2011; TRIBESS et al., 2008).

Apesar de não ter valor significativo de proteínas e lipídios, sua participação na dieta do indivíduo é de fundamental importância pelo seu alto valor nutricional e baixo-custo. O fruto maduro compreende 75% de água e possui aproximadamente 90 kcal /100 g de polpa. Desse total 20g são de hidratos de carbono do qual contém 2g de fibras. A principal fonte de carboidrato da banana advém do amido, um polímero natural, renovável biodegradável e atóxico muito utilizado na indústria alimentícia capaz de alterar características sensoriais dos alimentos, como textura, aparência, estabilidade e umidade.

Em meados dos anos 80, observou-se que havia uma fração de amido que durante a digestão era fermentada no intestino grosso pelas bifidobactérias produzindo gases e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) principalmente, além de atuar como protetor da mucosa contribuindo para a saúde do cólon. Esse fragmento ficou conhecido como amido resistente, que é um homopolissacarídeo. Desde então tem crescido o número de pesquisas que visam quantificar as frações de amidos nos alimentos, a fim de relacionar esses dados com a nutrição dos indivíduos. Estudos mostram que no fruto verde de 70 a 85% do amido existente é do tipo resistente (TRIBESS et al., 2008; AMIDOS, 2009).

Os homopolissacarídeos resistentes da banana verde são caracterizados como dos tipos I e II. O primeiro representa o grânulo de amido fisicamente inacessível na matriz do alimento devido às paredes celulares de proteínas, enquanto o segundo é constituído por grânulos de amido nativo encontrados no interior da célula vegetal apresentando lenta digestibilidade, devido às características intrínsecas da estrutura cristalina dos seus grânulos. É possível atribuir a esta porção os benefícios dados às fibras alimentares que são

de extrema importância para o bom funcionamento do trânsito intestinal e possuem significativa capacidade prebiótica, além de colaborar no controle e prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (AMIDOS, 2009).

Atribui-se também como efeito positivo da ingestão de amido resistente (AR) para a saúde humana, o aumento da oxidação da glicose e diminuição da mesma nos lipídios totais, verificado em um estudo com substituição do amido de alto índice glicêmico por amido de baixo índice glicêmico na alimentação de ratos diabéticos e não diabéticos (KABIR et al. (1998). Há também comprovação da redução dos níveis de LDL, prevenção do surgimento de doenças inflamatórias intestinais, diminuição do risco de câncer intestinal e desenvolvimento de micro-organismo probiótico, sendo assim considerado um agente prebiótico (WALTER et. al., 2005).

2.5. Utilização de biomassa de banana verde em alimentos

Por não apresentar sabor e odor característico, a biomassa da banana verde (BBV) é um excelente insumo para ser utilizado tanto em preparações doces como salgadas sem afetar a sua palatabilidade, além de aumentar o valor nutricional do produto pela presença do elevado teor de amido resistente. Atualmente tem sido muito empregada na substituição de ingredientes como trigo, (para produção de pães e massas), soja, fécula de mandioca e amido de milho (BORGES, 2003; BORGES, 2007).

Estudos têm sido feitos a fim de avaliar a aceitação dos consumidores de produtos com adição da polpa. Um deles analisou a aceitabilidade de amostras de suco de manga com e sem adição da biomassa, e em todos os atributos avaliados os valores de aceitação foram ótimos, havendo até atributo com maior aceitabilidade nas amostras com adição da polpa (TAIPINA et al., 2004).

A biomassa tem sido também uma boa fonte de substituição de ingredientes que contém glúten, beneficiando a população com restrição alimentar. A elaboração de massa de empada com substituição de farinha de trigo por 52,3 % BBV foi analisado. Verificou-se que o produto com adição de BBV alcançou o índice de aceitabilidade necessário, além de ter melhorado a qualidade nutricional do alimento (DIAS et al., 2011). A BBV também tem sido utilizada para substituir o creme de leite durante a elaboração do sorvete. O resultado foi significativamente positivo, das 67 crianças que participaram da análise, mais de 90% aprovaram o novo produto (BRIETZKE, 2011)

Na literatura não há publicações referentes a adição de biomassa de banana verde em leite fermentado. A adição de biomassa de banana verde em leite fermentado probiótico pode ser uma nova opção saudável para acentuar os benefícios a saúde dos indivíduos que consomem leite fermentado. Mas para isso é importante avaliar se a adição de biomassa de banana verde não comprometerá o crescimento e a sobrevivência da estirpe probiótica, e também a aceitação sensorial do produto.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da utilização de biomassa de banana verde em leite fermentado com *Lactobacillus casei* na sobrevivência do micro-organismo.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Elaborar formulações do leite fermentado com *Lactobacillus casei* LBC81 LYO 10 D com adição de diferentes porcentagens de biomassa de banana verde;

- a) Avaliar as variações de pH dos leites fermentados enriquecidos com biomassa de banana verde ao longo do período de estocagem refrigerada;
- b) Determinar a sobrevivência de *Lactobacillus casei* nos leites fermentados enriquecidos com biomassa de banana verde.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Caracterização do estudo

O estudo de caráter experimental foi composto pelas etapas de (i) elaboração dos leites fermentados, (ii) determinação da sobrevivência de *L. casei* e (iii) análise do pH das diferentes formulações de leite fermentado.

4.2. Elaboração dos leites fermentados

4.2.1 Ativação da cultura

A cultura de *L. casei* foi utilizada neste estudo na produção de leite fermentado. A cultura de *L. casei* fornecida na forma desidratada foi ativada em leite desnatado reconstituído a 10 % (LDR 10 %), e incubada em estufa a 37 °C por 14 horas. A cultura ativa obtida foi inoculada em LDR 10% para obtenção do leite fermentado.

4.2.2 Elaboração dos produtos

Para a elaboração dos leites fermentados foram utilizados os seguintes ingredientes: água mineral, leite em pó desnatado (Nestlé Mollico[®]), açúcar cristal, biomassa de banana verde (La Pianezza[®]), cultura probiótica de *L. casei* ativa em leite desnatado reconstituído a 10% (LDR 10%) e essência de baunilha.

Foram elaboradas quatro preparações de leite fermentado com diferentes porcentagens de biomassa de banana verde (0%; 5%; 10%; 15%). Em seguida, foram preparados 300 mL de cada mistura para a obtenção dos leites fermentados. Uma quantidade de 30 gramas de leite em pó foi reconstituída em 300 ml de água mineral. Após a reconstituição do leite em pó foram adicionados 7% gramas de açúcar cristal e as diferentes porcentagens de biomassa de banana verde. A mistura foi homogeneizada com o auxílio de um *mixer*.

Após a elaboração, a mistura foi autoclavada a 121 °C durante 15 minutos. Após o resfriamento, as misturas foram inoculadas com a cultura ativa de *L. casei* (inoculo de 1%), em seguida homogeneizadas e incubadas em estufa a 37 °C por 14 horas. Após a obtenção do leite fermentado foi adicionada a essência de baunilha e em seguida, uma alíquota da amostra foi avaliada com relação à viabilidade de *L. casei*. O restante dos produtos obtidos foram armazenado sob refrigeração a 10° C por 28 dias.

Os leites fermentados foram preparados no Laboratório de Higiene da Faculdade de Ciências da Saúde (FS) da Universidade de Brasília – UnB, local onde também foram feitas as análises para a determinação da sobrevivência dos *Lactobacillus casei*.

4.3. Determinação da sobrevivência de *L. casei*

A determinação da sobrevivência de *L. casei* foi feita durante os 28 dias de estocagem refrigerada dos produtos a 10° C, nos dias 0, 7, 14, 21 e 28, com a finalidade de avaliar se os micro-organismos se mantêm viáveis e em condições de caracterizar um alimento com alegação de propriedade funcional até o final de sua vida útil.

Alíquotas de 25 ml das amostras de leite fermentado foram diluídas em água peptonada (0,1%), e em seguida submetidas a cinco diluições seriadas. As diluições seriadas selecionadas foram alíquotadas (100 µl) em placas contendo ágar MRS, sendo o plaqueamento realizado pela técnica *Spread plate*. As amostras foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 a 48 horas. Após o período de incubação foram determinados o número de Unidades Formadoras de Colônias por ml (UFC ml⁻¹).

4.4. Análise de parâmetro físico-químico - Determinação do pH

As determinações dos pHs das amostras de leite fermentado foram realizadas após a elaboração e durante o período de estocagem refrigerada por 28 dias, a cada 7 dias. Para a

determinação do pH utilizou-se um pHmetro, sendo o procedimento realizado de acordo com a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sobrevivência de *Lactobacillus casei* nos leites fermentados elaborados com 7 % de açúcar e com diferentes porcentagens de biomassa de banana verde durante o tempo de armazenamento (0,7,14 ,21 e 28 dias) foi analisada (Figura 1).

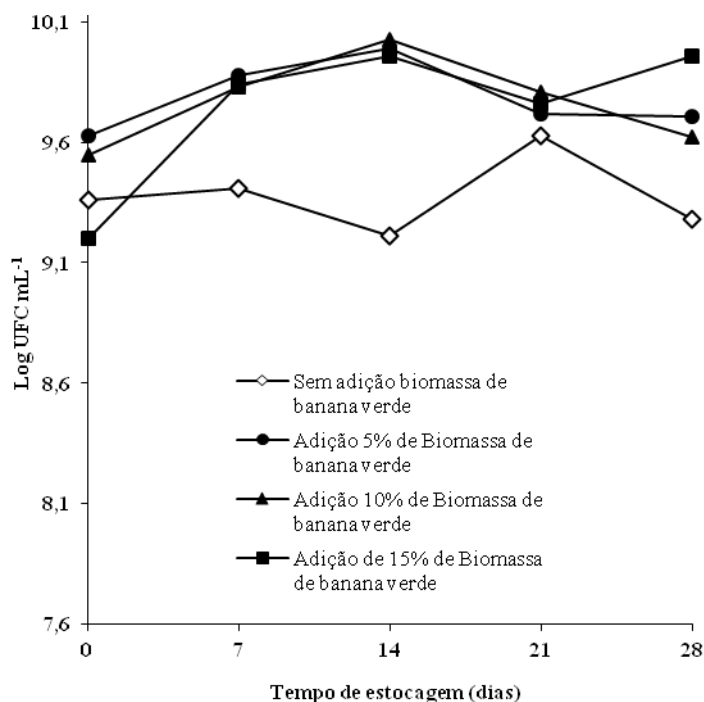


Figura 1: Sobrevivência de *Lactobacillus casei* em leites fermentados elaborados com 7 % de açúcar e com diferentes porcentagens de biomassa de banana verde.

A sobrevivência de *Lactobacillus casei* em leite fermentado elaborado com redução de açúcar e com diferentes concentrações de biomassa de banana verde (5, 10 e 15 %) se manteve estável ao longo dos 28 dias de estocagem refrigerada. Entretanto, a formulação elaborada sem adição de biomassa de banana verde foi a que apresentou maior perda de viabilidade, principalmente no 28º dia de estocagem. Assim, observa-se que a adição de biomassa não afetou o crescimento e a sobrevivência de *L. casei*. Apesar da redução da viabilidade de *L. casei* na preparação sem adição de biomassa de banana verde, a perda de viabilidade não comprometeu o produto em termos de ser considerado um alimento com

alegação de funcionalidade. Assim, os produtos elaborados atendem a legislação brasileira quanto a faixa de concentração de micro-organismos probióticos em alimentos (10^8 a 10^9 UFC/g) (Brasil, 2002).

Provavelmente o amido resistente presente na biomassa de banana verde pode ter contribuído para o crescimento e sobrevivência de *L. casei* durante o período de estocagem de 28 dias. Tal hipótese pode ser sustentada por trabalhos que evidenciaram o possível efeito de prebióticos sobre a preservação e viabilidade de culturas lácticas em alimentos. Buddington (1996) avaliou a viabilidade de duas espécies de *Bifidobactérias* adicionadas ao produto, com e sem frutoligossacarídeos – FOS, (oligossacarídeos da frutose que têm efeito prebiótico), durante 28 dias sob refrigeração de 4°C. Nesse estudo, percebeu-se que a maior viabilidade foi obtida no iogurte com adição de FOS.

Um estudo mais recente obteve resultados semelhantes. Ao avaliar as contagens de *Bifidobactérias* em leites fermentados com e sem adição de FOS, observou-se que no produto com adição do frutano a contagem de bactérias manteve-se constante ao longo de 30 dias de estocagem refrigerada (4 - 6°C), enquanto que no leite fermentado sem a presença do composto houve um decréscimo do ciclo logarítmico após 21 dias de estocagem (TRENTO, et al., 2009).

O pH das diferentes formulações de leite fermentado foram determinadas ao longo do período de estocagem de 28 dias (Figura 2).

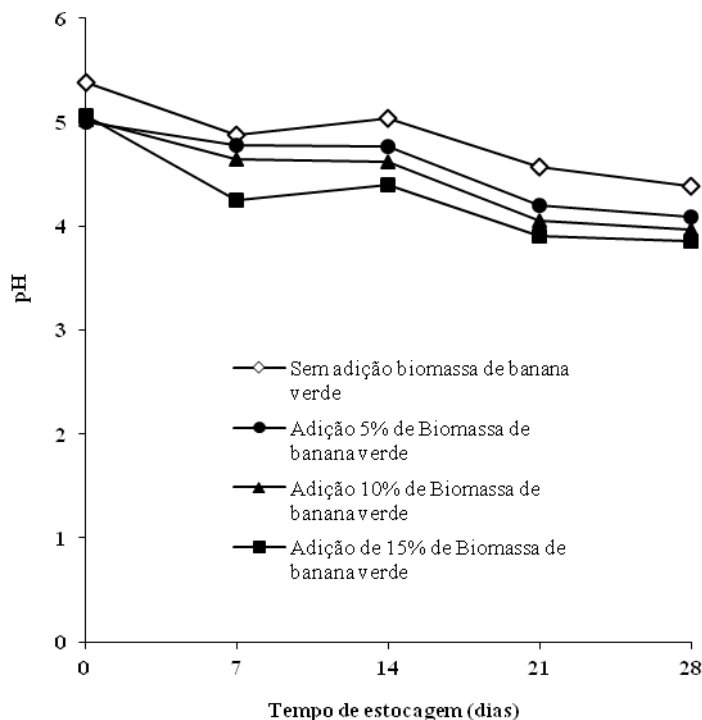


Figura 2: Variações de pH dos leites fermentados enriquecidos com diferentes porcentagens de biomassa de banana verde.

Ao avaliar os resultados obtidos durante o tempo de fermentação, observou-se que os valores de pH de todos os produtos decaíram significativamente ao longo do período de 28 dias de estocagem. As formulações sem adição de BBV, apresentaram maior pH desde o início, enquanto os leites com adição de 5% de BBV mostraram um pH de valor intermediário. Já os que continham maior concentração da polpa (15%), foram os que obtiveram menor pH ao final do tempo de estocagem (28) dias, ou seja, quanto maior a concentração da polpa, mais ácido se tornou o produto.

Do 1º até o 28º dia de armazenamento refrigerado observou-se um decréscimo do pH em todas as amostras, sendo esta redução mais acentuada no leite com maior adição (15%) de biomassa. No leite fermentado elaborado sem adição de biomassa de banana verde o pH manteve elevado até o final do tempo de estocagem.

A partir do 7º dia observou-se diminuição do pH em todas as amostras. No 14º dia houve um aumento significativo deste parâmetro seguido de queda gradativa em todos os próximos dias analisados.

Segundo Ferreira (2001), essa redução do pH observado durante todo o período de armazenagem é um processo natural em produtos de bases lácticas, causada pela produção contínua de ácido láctico e outros ácidos orgânicos. O que explica a redução significativa dos valores, já que neste estudo além da presença da bactéria fermentativa *L. casei*, que é capaz de produzir ácido láctico a partir de hexoses, houve também atuação do amido resistente presente na biomassa de banana verde, composto que é passível de ser fermentado e capaz de produzir gases e ácidos graxos de cadeia curta, principalmente.

Os valores de pH encontrados nas 4 amostras variaram entre 3,91 e 5,38, não demonstrando estarem de acordo com os valores obtidos por VEDAMUTHU (1991), que preconiza que o valor de pH de leites fermentados deve estar compreendido na faixa de 3,6 e 4,3 para manter a viabilidade celular das bactérias fermentadoras. Porém, Rocha et al. (2005), desenvolveram iogurtes fermentados com *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, com adição de diferentes polpas de frutas tropicais e obtiveram valores de pH entre 3,55 - 4,24, valores semelhantes aos encontrados neste trabalho.

O mesmo pode ser observado em outros estudos. Aryana & Mcgrew (2007) desenvolverem leites contendo *Lactobacillus casei* e obtiveram valores altos de pH (4,32 - 4,60), números próximos aos encontrados na análise de Zoellner et al. (2007), que quantificaram pH de 4,5 a 4,71 em bebidas lácteas fermentadas com *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus acidophilus* com adição de polpa de açaí.

Mesmo não existindo valores padrões quantitativos na legislação (BRASIL, 2007) para esse parâmetro, seu controle é de extrema importância, pois a separação do soro está diretamente relacionada com este fator, fazendo com que nos produtos com pH menor que 4,0, ocorra separação de compostos devido à redução da hidratação das proteínas e contração do coágulo (BRANDÃO, 1997). É fundamental que haja um controle rigoroso desta variável para que não ocorram separações de fases e acidificação elevada que poderão alterar características sensoriais e organolépticas do produto (VINDEROLA, et. al., 2000).

6 CONCLUSÃO

O desenvolvimento de produtos funcionais contendo bactérias probióticas têm resultado bons veículos dos microorganismos e mantido essas culturas em níveis aceitáveis para que exerçam sua probiose. O leite fermentado a partir da estirpe *Lactobacillus casei*, e com agregado de biomassa de banana verde em diferentes concentrações (5%, 10%, 15%), permaneceu viável e em número superior a 10^9 UFC/g durante o armazenamento do produto. A adição de biomassa de banana verde em diferentes concentrações no leite fermentado mostrou não só favorecer o crescimento das bactérias, como colaborar para a viabilidade destas durante o período de armazenamento do produto refrigerado.

Sendo o leite fermentado um alimento com ótimas características nutricionais e organolépticas, além de rico em proteínas e de fácil digestão, o desenvolvimento deste produto com adição de biomassa de banana verde, pode ser uma excelente alternativa para aumentar a oferta de alimentos funcionais no mercado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMIDOS: Fontes, Estruturas e Propriedades Funcionais. Aditivos e Ingredientes, São Paulo. Disponível em: <http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/124.pdf> Acesso em: 23 de maio de 2016.
2. ANGELOVA, A. et al. Development of a new oat-based probiotic drink. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p. 75-80, 2006.
3. BEVILACQUA et al. Using physical approaches for the attenuation of lactic acid bacteria in an organic rice beverage. **Food Microbiology**. v. 53, p. 1-8, 2016.
4. ARYANA, K. J.; MCGREW, P. Quality attributes of yogurt with *Lactobacillus casei* and various prebiotics. **LWT- Food Science and Technology**, v. 40, n. 10, p. 1.808-1.814, 2007.
5. BRANDÃO, S. C. C. Tecnologia da produção industrial de iogurte. XXXV Semana do Laticinista – Instituto Cândido Tostes, Juiz de Fora, p. 52, 1997.
6. BRUNO, L.M. Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismo: Bactérias Ácido-Láticas. **Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia**, p. 15, 2011.
7. BORRESEN EC. et al. Fermented foods: Patented approaches and formulations for nutritional supplementation and health promotion. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, p. 134-140, 2012.
8. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de apoio Rural e Cooperativismo. Instrução Normativa nº 13, de novembro de 2004. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=133040692>>. Acesso em 15 de agosto de 2016.
9. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 02 de 07 de janeiro de 2002: Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02_02rdc.htm>. Acesso em 02 de junho de 2016.
10. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Disponível em: <<http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/instru%C3%87%C3%83o-normativa-n%C2%BA-46-de-23-de-outubro-de-2007.pdf>>. Acesso em 20 de novembro de 2016.
11. BRIETZJE, F. Aceitabilidade de um sorvete a base de banana verde para inclusão na merenda escolar. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Nutrição. Departamento de Ciências da vida, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ, Rio Grande do Sul, 2001.

12. BURITI, F.C.A.; DA ROCHA J.S.; SAAD, S.M.I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, p. 1279-1288, 2005.
13. BURITI, F. C. A. et al. Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh cheese in comparison with the traditional. **Arquivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.57, p.179-185, 2007.
14. CAPRILES, V.D.; SILVA, K.E.A; FISBERG, M. Prebióticos e simbióticos: nova tendência no mercado de alimentos funcionais. **Nutrição Brasil**, v. 4, n 6, p. 327-335, 2005.
15. CEREDA, M.P. Propriedades gerais do amido. **Fundação Cargill**, v. 1, p. 221, 2002.
16. DAZA, G.J.G. Los probióticos. Una alternativa em El tratamiento de enfermedades, Argentina, 2004. Disponível em: <<http://www.monografias.com/trabajos16/probioticos/probioticos.shtml>>. Acesso em 07/11/2016.
17. DIAS, A. R. et al. Massa de empada sem glúten e sem leite, enriquecida com biomassa de banana verde. Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição Campus Universitário Darcy Ribeiro, 2011.
18. DU TOIT, M., et al. Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. **International Journal Food Microbiology**, p. 93-104, 1998.
19. FAOSTAT. Agricultural production; agriculture & food trade. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/home/E> . Acesso em: maio 2016.
20. GLUSAC, J. et al. Growth and viability of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in traditional yoghurt enriched by honey and whey protein concentrate. **Iranian Journal of Veterinary Research**. 2015.
21. GUILBOT, A.; MERCIER, C. Starch. In: The polysaccharides, v. 3, p 209-273, 1985.
22. HASLER, C.M. Functional Foods: Their role in disease prevention and health promotion. Food Technology, **Scientific Status Summary**, v. 52, n 11, p. 63-68, 1998.
23. HAYES M. et al. Cheese as a delivery vehicle for probiotics and biogenic substances. **Australian J Dairy Technol**, p. 132-141, 2006.
24. HUERTAS,RAP. Review: Bacterias Acido Lacticas: Papel funcional em lós alimentos. **Facultad de Ciencias Agropecuarias**, v. 8, n 1, 2010.
25. KABIR, M. et al. Dietary amylose-amylopectin starch content affects glucose and lipid metabolism in adipocytes of normal and diabetic rats. **The journal of Nutrition**, v. 128, p. 35-43, 1998.

26. KLEEREBEZEM M. et al. The extracellular biology of the *Lactobacilli*. **FEMS Microbiology Reviews**, p. 199-230, 2010.
27. MITAL, B.K.; GARG, S.K. Anticarcinogenic, hypocholesterolemic, and antagonistic activities of *Lactobacillus adisophilus*. **Critical Reviews in Microbiology**, n 21, p. 175–214, 1995.
28. MONTORSI, F. et al., Effectiveness of a Combination of Cranberries, *Lactobacillus rhamnosus*, and Vitamin C for the Management of Recurrent Urinary Tract Infections in Women: Results of a Pilot Study. **European Urology**, v. 70, p. 912-915, 2016.
29. MENRAD, K. Market and marketing of functional food in Europe. **Journal of Food Engineering**, v.56, n. 2-3, p. 181-188, 2003. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T8J61XJ1F2&_user=0&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=6c7ddb897fff59191e01da345f8296e1>.
30. MERCOSUL/GMC/RES N° 47/97 - Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. 1997.
31. MERINO, A.B. Probióticos, prebióticos y simbióticos. Definición, funciones y aplicación clínica em pediatria. **Revista Pediatría de Atención Primaria**, v. 8, n 1, p. 99-118, 2006.
32. NGUYEN, T. D. T., KANG, J. H., LEE, M. S. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. **International Journal. Food Microbiology**, p. 358-361, 2007.
33. LEONEL, M. et al. Extração e caracterização do amido de diferentes genótipos de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, p. 599-605, 2011.
34. OBANDO, M.C. et al. Viabilidad de los microorganismos probióticos *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium* BB12 durante el almacenamiento de queso cottage. 2010. **Vitae**, v. 17, n. 2, p. 141-148, 2010.
35. PENNA, F.J. et. al. Bases experimentais e clínicas atuais para o emprego dos probióticos. **Jornal de Pediatría**, v. 76, p. 209-217, 2000.
36. PUNDIR, R.K. et al. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from food samples: an in vitro study. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, p. 85-93, 2013.
37. RANIERI L.M; DELANI T.C.O. Banana Verde (*Musa spp*): Obtenção da biomassa e ações fisiológicas do amido resistente. **Revista UNINGÁ Review**, p. 43 – 49, 2014.
38. ROCHA, E. M. et al. Elaboração e caracterização de sobremesa Láctea à base de frutas tropicais. **Higiene Alimentar**, v 19, n. 129, p. 12-14, 2005.
39. TAIPINA, M. S. et al. Aceitabilidade sensorial de suco de manga adicionado de polpa de banana (*Musa sp*) verde. **Inst. Adolfo Lutz**, p. 49-55, 2004.

40. SALGADO, J. M. et. Al. Impacto dos Alimentos Funcionais para a saúde. **Nutrição em pauta**, n 48, p. 10-18, 2001.
41. SANTOS, EF. et al. Alimentos funcionais. **Revista de Pesquisas Biológicas da UNIFEV**, n 1, p.13-19, 2006.
42. SHINDE, P.B. Probiotic: an overview for selection and evaluation. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, p.14-21, 2012.
43. SILVA, GO da et al. Características físico-químicas de amidos modificados de grau alimentício comercializados no Brasil. *Ciênc. Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 1, p. 188-197, Mar. 2006.
44. SOUZA, C. H. B.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physicochemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, p.633-640, 2009.
45. TRENTO, F. K. H. S. et al. Contagem de bactérias lácticas e probióticas em diferentes formulações de leites fermentados contendo ou não probióticos, após o processamento e durante a estocagem. **Anais do 26º Congresso Nacional de Laticínios**, 2009.
46. TRIBESS, T.B. et al. Thermal properties and resistant starch content of green banana flour (*Musa cavendishii*) produced at different drying conditions. **LWT - Food Science and Technology**, 2009.
47. VEDAMUTHU, E. R. The yogurt story: past, present and future. Part. VI. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 11, n. 9, p. 53-514, 1991.
48. VALLE, H.F, CAMARGOS,M. Yes, nós temos banana. **Senac**. São Paulo, 2003.
49. VINDEROLA, C. G., BAILO, N., REINHEIMER, J. A. Survival of probiotic in Argentina yogurts during refrigerate storage. **Food Research International**, v. 33, n. 2, p. 97-102, 2000.
50. WALTER, M., SILVA, L. P., EMANUELLI, T. Amido resistente: características físico-químicas, propriedades fisiológicas e metodologias de quantificação. **Ciência Rural**, 2005.
51. WHO & FAO. Probiotics in Food. **Food and Nutrition Paper**, 2001.
52. ZOELLNER, S. S. et al. Bebida láctea com polpa de açaí potencialmente probiótica. In: IX Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, **Anais do IX ERSCTA**, p. 404-408, 2007.