



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE ALGAS DO FILO RHODOPHYTA
NO DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS LÁCTEOS PROBIÓTICOS

ADRIANA CARNEIRO TAVARES ESTEVAM

RECIFE

2016

ADRIANA CARNEIRO TAVARES ESTEVAM

**AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE ALGAS DO FILO RHODOPHYTA
NO DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS LÁCTEOS PROBIÓTICOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Biologia Aplicada à
Saúde, como parte dos requisitos necessários
à obtenção do título de Doutora em
Biologia Aplicada à Saúde.

Orientadora:

Profa. Dra. Ana Lucia Figueiredo Porto

Co-orientadoras:

Profa. Dra. Flávia Carolina Alonso Buriti

Profa. Dra. Eliane Rolim Florentino

RECIFE

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à saúde

REITOR(A)

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR(A)

Prof(a). Dra. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR(A) PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR(A) DO CENTRO DE BIOCÊNCIAS

Prof(a). Dra. Maria Eduarda Larrazábal

VICE- DIRETOR(A) DO CENTRO DE BIOCÊNCIAS

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADOR(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE**

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

**VICE- COORDENADOR(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE**

Prof. Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Estevam, Adriana Carneiro Tavares

Avaliação de extratos de algas do Filo Rhodophyta no desenvolvimento de produtos lácteos probióticos / Adriana Carneiro Tavares Estevam- 2016.

138 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto

Coorientadoras: Flávia Carolina Alonso Buriti e Eliane Rolim Florentino

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia Aplicada à Saúde, Recife, 2016.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Alga como alimento 2. Probióticos 3. Leite fermentado I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo (orient.) II. Buriti, Flávia Carolina Alonso (coorient.) III. Florentino, Eliane Rolim (coorient.) IV. Título

579.8

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 566



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

Parecer da comissão examinadora da tese de doutorado de

Adriana Carneiro Tavares Estevam

**AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE ALGAS DO FILO RHODOPHYTA NO
DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS LÁCTEOS PROBIÓTICOS**

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a candidata **Adriana Carneiro Tavares Estevam** como:

APROVADA

Recife, 26 de Agosto de 2016.

Dra. Ana Lucia Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE / LIKA – UFPE

Dra. Camila Souza Porto
Universidade Federal de Alagoas – UFAL

Dra. Polyanna Nunes Herculano
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Dra. Tatiana Souza Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Dr. Vagner de Melo Oliveira
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

“Tudo posso, naquele que me fortalece...”

Filipenses 4:13

*Dedico, em especial, ao meu pai **Lourival Costa Tavares** (in memorian), o qual, em seus últimos dias de vida terrena, encorajou-me a seguir adiante e continuar sendo forte, pois sabia que não seria fácil para mim em diversos aspectos!*

Nos momentos difíceis, precisei lembrar-me das últimas palavras que pude ouvir do meu pai e jamais esquecer-me que nossa estrutura humana é frágil e limitada, mas o Poder de DEUS se aperfeiçoa em nossas fraquezas (2 Coríntios 12:9).

Meu pai, o senhor vive em mim, continuamente... Em minhas lembranças, em meus sentimentos, em minha personalidade e na forma de reagir a tantas situações... te encontro meu pai!

*À minha querida avó, **Josefa Costa Tavares** (in memorian), a qual partiu logo após o meu pai, deixando-me um grande exemplo de resignação, fé, firmeza e dignidade.*

*À minha mãe, **Francilene Carneiro Tavares**, meu amor mais profundo e imensurável...*

*Ao meu amado esposo, **Joelson Soares Estevam**, meu amigo, meu companheiro de batalhas e vitórias, pela dedicação, sensibilidade, paciência e encorajamento para superar todos os obstáculos...*

*À minha **família** por toda amizade, incentivo e carinho no decorrer desta longa caminhada.*

Dedico com todo o meu amor!

AGRADECIMENTOS

Eu cheguei até aqui, por meio de uma rede muito entrelaçada de parcerias e trocas de saberes... Não conseguiria sozinha, foi necessário muito suporte, considerando cada conselho, idéia lançada e informações repassadas que me abriram caminhos e possibilidades...

Expresso minha gratidão às universidades parceiras, centros e laboratórios que viabilizaram o desenvolvimento de toda a pesquisa.

Algumas pessoas, sempre presentes, lançaram luz na minha caminhada, apontando-me o caminho e orientando cada direcionamento rumo à construção do conhecimento... Outras, de longe, também exerceram forte influência, oferecendo-me condições de ir mais além!

O que dizer dos anjos-amigos, que seguraram minha mão e caminharam comigo, quando a força e a motivação já não se faziam presentes como antes... Anjos amigos que ouviram minhas dores e oraram comigo, curando, com o bálsamo das palavras de conforto, as feridas da minha alma!

O Padre Fábio de Melo define amigo como: “o território humano onde Deus se manifesta e nos fala”.

“Um amigo fiel é uma poderosa proteção: quem o achou descobriu um tesouro. Nada é comparável a um amigo fiel; o ouro e a prata não merecem ser postos em paralelo com a sinceridade da sua fé.

Um amigo fiel é um remédio de vida e imortalidade; quem teme ao Senhor achará esse amigo. Quem teme o Senhor terá também uma excelente amizade, pois o seu amigo lhe será semelhante” (Eclo 6,14).

As razões pelas quais todos vocês foram, nominalmente, elencados são inúmeras e algumas muito particulares, mas todos sabem os motivos pelos quais o meu coração agradece!

A todos vocês, minha profunda gratidão!

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde – LIKA

Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos – LEAAL

Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto - Orientadora

Dra. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares – Examinadora da Banca de Qualificação

Dra. Celia Maria Machado Barbosa de Castro – Examinadora da Banca de Qualificação

Dra. Camila Souza Porto – Examinadora da Banca de Defesa da Tese

Dra. Polyanna Nunes Herculano – Examinadora da Banca de Defesa da Tese

Dra. Tatiana Souza Porto – Examinadora da Banca de Defesa da Tese

Dr. Vagner de Melo Oliveira – Examinador da Banca de Defesa da Tese

Dr. José Luiz de Lima Filho – Diretor e Professor da Pós-Graduação – LIKA

Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior – Coordenador e Prof.da Pós-Graduação – LIKA

Dr. Attilio Converti – Professor da Pós-Graduação – LIKA

Dr. José António Teixeira – Professor da Pós-Graduação - LIKA

Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho – Professor da Pós-Graduação – LIKA

Dr. Sergio Crovella – Professor da Pós-Graduação – LIKA

Fábio Costa – Secretário do LIKA

Eliete Rodrigues – Ex-secretária do LIKA

Universidade Estadual da Paraíba – UEPB

Pró-Reitoria de Gestão de Pessoas (PROGEP)

Comitê de Ética em Pesquisa

Centro de Ciências e Tecnologia – CCT

Laboratório de Ciências e Tecnologia de Alimentos – LCTA

Laboratório de Análise Físico – Química – CCT

Laboratório de Química Analítica – CCT

Amoxarifado de Química - CCT

Dra. Flávia Carolina Alonso Buriti – Co-orientadora

Dra. Eliane Rolim Florentino – Co-orientadora

Dr. Tiago Almeida de Oliveira – Suporte Estatístico

Doutoranda Elaine Virginia dos Santos Pereira – Técnica – LCTA

Dra. Isanna Menezes Florêncio - Técnica – LCTA

Msc. Michelangela Suellen – Técnica – LCTA

Msc. Aline Pacheco – Técnica – LCTA

Thiago – Técnico – LCTA

Eleonora – Técnica – LCTA

Michele Correia de Almeida - Estagiária – LCTA

Larissa Marinho – Estagiária – LCTA

Jade Marinho – Estagiária – LCTA

Universidade Federal de Campina Grande-UFCG

Centro de Tecnologia e Recursos Naturais – CTRN.

Laboratório de Alimentos

Laboratório de Análise Sensorial

Doutoranda Renata Duarte – Técnica do Laboratório de Alimentos

Anjos – Amigos

Dra. Flávia Carolina Alonso Buriti – Co-orientadora

Francilene Carneiro Tavares – Mainha (Minha jóia rara)

Tio Leonardo Costa Tavares e Monica Maniçoba – Querido tio - Meu apoio em Recife.

Lorena Carneiro Tavares de Almeida – Amada irmã

Ana Luiza da Cruz Pinto Barbosa – Amiga do coração

Francilene Lucena Melo Jordão – Amiga do coração

Maiza Malta Ferreira Ramos – Amiga do coração

Maria de Lourdes Lopes Brasileiro – Amiga do coração

*Nada é igual ao Seu redor
Tudo se faz no Seu olhar
Todo o universo se formou no Seu falar
Teologia pra explicar ou big bang pra disfarçar
Pode alguém até duvidar sei que há um Deus a me guardar*

*E eu tão pequeno e frágil querendo Sua atenção
No silêncio encontro resposta certa então
Dono de toda ciência, sabedoria e poder
Oh, dá-me de beber da água da fonte da vida
Antes que o ar já houvesse, Ele já era Deus
Se revelou aos seus do crente ao ateu
Ninguém explica Deus...*

Música: Ninguém Explica Deus

Composição: Clóvis Pinho

Grupo: Preto no Branco

RESUMO

As macroalgas são fontes naturais de ingredientes, com diversas atividades biológicas e suas propriedades espessantes, gelificantes e estabilizantes oferecem perspectivas promissoras no desenvolvimento de produtos alimentícios. Avaliou-se a composição das macroalgas *Gracilaria birdiae* e *Gracilaria domingensis* e os efeitos de seus extratos aquosos sobre as características físico-químicas, viabilidade microbiana e textura instrumental de leites fermentados e sobremesas lácteas de goiaba processados com a cultura SAB-440A, contendo os probióticos *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* e *Lactobacillus acidophilus*. Os carboidratos das duas algas apresentaram mais de 95% de fibra alimentar. Os extratos aquosos das algas não afetaram o pH e a acidez dos leites fermentados e sobremesas lácteas. Durante a fermentação, a textura dos leites fermentados adicionados das algas foi comparável ou superior àqueles contendo apenas gelatina. A sobremesa com *G. domingensis*, com 2,68 g de fibra alimentar/porção (120 g), cumpriu o requisito para produtos fontes deste nutriente segundo a legislação, apresentando também maior firmeza comparada à sobremesa com *G. birdiae* ($p < 0,05$), embora sem diferir significativamente na análise sensorial ($p > 0,05$). A sobrevivência de *L. acidophilus* foi baixa nas sobremesas ($< 6 \log \text{ UFC g}^{-1}$), porém *B. animalis* foi capaz de manter populações superiores a $7 \log \text{ UFC g}^{-1}$ nestes produtos durante 21 dias. Os extratos das algas apresentaram-se como uma alternativa à gelatina para uso como modificador de textura nos leites fermentados. Nas sobremesas com a cultura SAB-440A e polpa de goiaba, o extrato aquoso de *G. domingensis* foi recomendado para obter maior teor de fibra alimentar e firmeza, além de quantidades adequadas de *B. animalis* e boa aceitabilidade sensorial.

Palavras-chave: Extrato aquoso de algas. Leites fermentados. Sobremesas lácteas. Textura instrumental. Probióticos.

ABSTRACT

Macroalgae are natural sources of ingredients with different biological activities and their thickening, gelling and stabilizing properties offer promising prospects in the development of food products. The composition of *Gracilaria birdiae* and *Gracilaria domingensis* macroalgae were evaluated and the effects of their aqueous extracts on the physico-chemical characteristics, microbial viability and instrumental texture of fermented milk and dairy Guava desserts processed with SAB-440A culture containing probiotics *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* and *Lactobacillus acidophilus*. Carbohydrates of the two algae showed more than 95% of dietary fiber. The aqueous extracts of algae did not affect the pH and acidity of the fermented milk and dairy desserts. During fermentation, the texture of the fermented milk added algae was comparable or superior to those containing only gelatin. The dessert with *G. domingensis* with 2.68 g of dietary fiber / serving (120 g), fulfilled the requirements for products of this nutrient sources under the law, also being more strongly compared to the desserts with *G. birdiae* ($p < 0,05$), although with no differences in sensory analysis ($p > 0.05$). The survival of *L. acidophilus* was low in desserts ($< 6 \log \text{cfu g}^{-1}$), *B. animalis* however was able to maintain a population of more than $7 \log \text{cfu g}^{-1}$ in these products for 21 days. Extracts of algae presented as an alternative to gelatin for use as a texture modifier in fermented milks. In desserts with SAB-440A culture and guava pulp, the aqueous extract of *G. domingensis* was recommended for higher fiber content and firmness, also having adequate amounts of *B. animalis* and good sensory acceptability.

Keywords: Aqueous extract of seaweed. Fermented milks. Milk-based desserts. Instrumental texture. Probiotics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão da Literatura

Figura 1 – Número de publicações internacionais relacionadas a algas, por década, ente 1900 – 2000.....	28
Figura 2 – Filo Rhodophyta.....	30
Figura 3 – Espécies de Gracilariaceae.....	33
Figura 4 – Distribuição dos táxons de algas no litoral brasileiro.....	35
Figura 5 – <i>Gracilaria birdiae</i>	36
Figura 6 – Talos de gametófitos de <i>Gracilaria birdiae</i> Plastino & E.C. Oliveira cultivados em laboratório.....	37
Figura 7 – Frondes vermelhas e marrom-esverdeadas de <i>Gracilaria birdiae</i>	37
Figura 8 – Aspecto geral dos ramos de <i>Gracilaria domingensis</i>	39
Figura 9 – Indivíduos de coloração verde, vermelha e marrom da espécie <i>G. domingensis</i> crescendo lado a lado em uma mesma população.....	40
Figura 10 – Produção mundial de plantas aquáticas (algas) por espécie e/ou grupos de espécies.....	43
Figura 11 – Estrutura química do ágar.....	51

	51
Figura 12 – Esquema de gelificação do ágar.....	
Figura 13 – Analisador Textura TA.XT <i>plus</i> Stable Micro Systems®.....	72

LISTA DE QUADROS E TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Quadro 1 – Definição dos probióticos com o passar dos anos..... 58

Tabela 1 – Classificação dos principais polissacarídeos constituintes da fibra alimentar das macroalgas..... 26

Tabela 2 – Características físico-químicas dos leites fermentados..... 68

Tabela 3 – Contagem de microrganismos específicos..... 68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	20
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1 Macroalgas: características gerais.....	22
3.2 Composição nutricional das macroalgas.....	23
3.3 Polissacarídeos sulfatados das macroalgas: Fibra alimentar.....	25
3.4 Filo Rhodophyta: <i>Gracilarias</i>	30
3.5 <i>Gracilaria birdiae</i> Plastino & E.C. Oliveira.....	36
3.6 <i>Gracilaria domingensis</i> (Kützinger) Sonder ex Dickie.....	38
3.7 Panorama mundial da produção de algas.....	41
3.8 Hidrocolóides.....	45
3.8.1 Ágar.....	50
3.9 Alimentos funcionais: Aspectos gerais.....	54
3.10 Probióticos.....	57
3.11 Bactérias ácido lácticas e Bifidobactérias	61
3.12 Caracterização das culturas empregadas.....	64
3.13 Leites fermentados e sobremesas lácteas.....	66
3.13.1 Leites fermentados.....	66

3.13.2 Sobremesas lácteas.....	70
3.14 Textura Instrumental.....	71
3.15 Análise sensorial.....	73
3.15.1 Teste de Aceitação.....	74
REFERÊNCIAS.....	76
4 CAPÍTULO I.....	97
5 CAPÍTULO II.....	105
6 CAPÍTULO III.....	112
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	121
APÊNDICES.....	123
Apêndice A - Termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE.....	124
Apêndice B - Ficha para teste de aceitabilidade.....	127
ANEXOS.....	129
Anexo I - Aprovação da Pesquisa	130
Anexo II - Laudos das Análises	133

1. INTRODUÇÃO

As algas têm recebido considerável atenção em várias partes do mundo, sendo reconhecidas por seu grande potencial como suplemento para a produção de alimentos funcionais, uma vez que são fontes de uma gama de compostos nutritivos como carotenóides, proteínas, ácidos graxos essenciais, vitaminas e minerais (LORDAN; ROSS; STANTON, 2011), o que explica, em parte, o seu contínuo consumo como alimento, não somente nos países asiáticos, mas também em países ocidentais (HOTCHKISS; TRIUS, 2010; SÁNCHEZ-MUNIZ et al., 2013; FIDELIS, 2014).

O interesse nos hidrocolóides das algas para a nutrição humana ocorre também devido à sua atuação como fibra alimentar, uma vez que o seu efeito fisiológico está intimamente relacionado às suas propriedades físico-químicas, tais como solubilidade, viscosidade, hidratação e capacidade de troca iônica no aparelho digestivo (KADAM; PRABHASANKAR, 2010; MOHAMED et al., 2012; GÓMEZ-ORDÓÑEZ, 2013; COCKBURN; KOROPATKIN, 2016).

Ágar é um hidrocolóide neutro, cuja solubilidade e gelificação não é afetada pela adição ou presença de outros eletrólitos, tornado-se ideal para espessar e gelificar alimentos sem alterar ou adicionar qualquer sabor (IBERAGAR, 2010; WÜSTENBERG, 2015). Uma vantagem do ágar em relação às demais substâncias gelificantes, é o seu alto poder de histerese e a mudança da capacidade de gelificar de acordo com a concentração utilizada (SANTOS, 2011).

Ágar e carragenana têm sido largamente utilizados na indústria alimentícia como um substituto do amido e da gordura, especialmente na indústria de enlatados e laticínios, na produção de gelatinas e geleias, além do uso como gelificante, espessante, emulsificante

e estabilizante e nas indústrias cosmética e farmacêutica, bem como para microbiologia e biotecnologia (WIJESEKARA et al. 2011; PANGESTUTI; KIM, 2015).

No Brasil, o cultivo de algas gracilarióides vem aumentando anualmente, sendo amplamente coletadas em bancos naturais na costa do Nordeste (URSI et al., 2013; HAYASHI et al. 2014; AYRES-OSTROCK et al. 2016) e vendidas por comunidades de pesca para múltiplos propósitos, sobretudo para extração do ágar (MARINHO-SORIANO et al., 2006; COSTA; PLASTINO, 2011). No entanto, o desenvolvimento de produtos alimentares usando algas pelos pequenos produtores ainda é escassa e uma diversificação na sua atividade econômica se faz necessária para garantir o destino final das algas cultivadas, bem como o desenvolvimento social dessas comunidades (TAVARES ESTEVAM et al., 2016).

Leites fermentados e sobremesas lácteas são meios viáveis para a incorporação de ingredientes funcionais, especialmente probióticos e carboidratos bioativos. Os leites fermentados, por serem comercializados em todo o mundo com alegação de promover à saúde (GALLINA et al., 2012) e as sobremesas por serem consumidas por pessoas de todas as idades e constituídas de proteínas do leite, gordura e lactose, bem como outros compostos que são necessários para o crescimento bacteriano (SOCCOL et al. 2010; BURITI; SAAD 2014).

Probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, melhoram o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do consumidor (FAO/WHO, 2002).

Dos gêneros que integram os probióticos, o *Bifidobacterium* e o *Lactobacillus* apresentam grande destaque, pois são amplamente utilizados na fabricação de alimentos funcionais por conferir benefícios à saúde dos consumidores e habitarem todas as porções

do trato gastrointestinal humano saudável (MOUSAVI; ADAMS 2010; O'FLAHERTY; KLAENHAMMER, 2010; WENDLING; WESCHENFER, 2013; HILL et al., 2014; SILVA, 2015).

Juntamente com probióticos, bactérias ácido lácticas que trabalham como entrada, têm sido extensivamente utilizadas na fermentação de alimentos, incluindo a produção de leites fermentados (GEMECHU, 2015). Algumas cepas de *Streptococcus thermophilus* sintetizam exopolissacarídeos, que são úteis na produção de produtos lácteos fermentados com maior firmeza, mantendo a viscosidade adequada e a consistência durante o armazenamento a frio (PURWANDARI et al., 2007;. COCKBURN; KOROPATKIN, 2016). Além disso, o uso de espécies *Gracilaria* disponíveis no litoral do Nordeste brasileiro na produção de formulados lácteos é vista como uma estratégia de diversificação de produtos, garantindo o destino final das algas cultivadas, bem como o desenvolvimento social de comunidades locais (TAVARES ESTEVAM et al., 2016).

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

- ✓ Avaliar a influência dos extratos aquosos da *Gracilaria birdiae* e *Gracilaria domingensis* como agentes espessantes no desenvolvimento produtos lácteos probióticos, bem como o perfil de textura, as características físico-químicas, a viabilidade probiótica e as propriedades sensoriais dos produtos formulados.

Objetivos específicos

- ✓ Produzir os extratos aquosos da *G. birdiae* e *G. domingensis*;
- ✓ Quantificar os parâmetros físico-químicos e composição nutricional da *G. birdiae* e *G. domingensis* em pó e dos seus dos extratos;
- ✓ Verificar o comportamento dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos durante o processo de incubação para produção dos leites fermentados;
- ✓ Avaliar os parâmetros de textura instrumental dos leites fermentados;
- ✓ Produzir as sobremesas lácteas probióticas de goiaba adicionadas dos extratos da *G. birdiae* e *G. domingensis*;
- ✓ Analisar a composição nutricional das sobremesas lácteas probióticas de goiaba adicionadas dos extratos da *G. birdiae* e *G. domingensis*;
- ✓ Estudar o comportamento dos parâmetros físico-químicos e de textura instrumental das sobremesas lácteas probióticas, formuladas com os extratos das *Gracilarias*, durante os 21 dias de vida de prateleira;

- ✓ Verificar a viabilidade dos micro-organismos *S. thermophilus*, *B. animalis* e *L. acidophilus* nas sobremesas adicionadas dos extratos das Gracilárias, durante a vida de prateleira;
- ✓ Avaliar a qualidade sanitária das sobremesas lácteas probióticas de goiaba, adicionadas dos extratos da *G. birdiae* e *G. domingensis*;
- ✓ Identificar a aceitabilidade sensorial das sobremesas lácteas probióticas de goiaba, adicionadas dos extratos da *G. birdiae* e *G. domingensis*;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Macroalgas: características gerais

O termo algas vem do latim, *algae*, são organismos com ampla diversidade de formas, funções e estratégias de sobrevivência, apresentando dois tipos de reprodução, assexuada e sexuada. (BICUDO; MENEZES, 2010; PEREIRA et al., 2012).

A Ficologia é o estudo das algas e esta palavra deriva do grego *Phycos*, que significa “alga”. Relativamente à morfologia, as algas são consideradas como organismos unicelulares, microscópicos, chamadas de microalgas (podendo formar colônias ou viverem isolados ou pluricelulares, macroscópicas, chamadas de macroalgas (RAVEN, 2007). São organismos sem vascularização e, portanto, talotalófitos (sem diferenciação em raízes, caules e folhas), fotossintetizantes (exceto algumas espécies parasitas) que possuem em comum o pigmento *clorofila a* (LEE, 2008; VASCONCELOS; GONÇALVES, 2013).

As macroalgas marinhas possuem importância tanto do ponto de vista econômico, como ambiental e social. Em muitos ecossistemas aquáticos, as algas atuam como produtores primários na cadeia alimentar, uma vez que sintetizam o material orgânico e o oxigênio necessário para o metabolismo dos organismos consumidores (LEE, et al., 1992), de forma a sustentar mais de dois terços da biomassa do mundo, sendo responsáveis ainda por metade da atividade fotossintética global (PEREIRA et al., 2012).

O número de espécies de algas continua ainda a ser determinado, mas estima-se estar entre um e dez milhões (SCHULTZ MOREIRA, 2014). A diversidade destes organismos encontra-se distribuída em distintos habitats (oceanos, corpos de águas doces,

solos, rochas e superfícies de vegetais) e para isto, devem dispôr de luz e umidade suficientes (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

As algas de vida livre podem formar, principalmente, dois tipos de comunidades: fitoplâncton, microalgas que vivem livres na coluna d'água e fitobentos, macro ou microalgas que crescem fixas sobre qualquer superfície passível de ser colonizada (RAVEN, 2007; PUJA et al. 2011; GERWICK; MOORE, 2012).

Harvey (1836) classificou as algas baseando-se na sua composição pigmentar e esta persiste até hoje. Tradicionalmente, a diferenciação dos organismos foi baseada na coloração dos talos verdes, vermelhos ou marrons, como resultado da combinação dos pigmentos fotossintetizantes contidos em seus plastos (clorofilas e pigmentos acessórios, como carotenóides, ficobilinas e xantofilas que mascaram a cor verde das clorofilas), e nas características morfológicas e anatômicas (SILVA, 2010).

As algas macroscópicas são classificadas em: Chlorophytas (algas verdes), Phaeophytas (algas pardas) e Rhodophytas (algas vermelhas) (RAVEN, 2007).

As macroalgas marinhas vêm sendo utilizadas há milênios pelos povos orientais como parte importante de sua dieta alimentar, chegando a perfazer até 20% da ingestão diária de alimentos da população e uma grande variedade de algas também têm sido consumidas por diversas sociedades em todo o mundo (SANTOS et al., 2011; COSTA, 2013; VASCONCELOS; GONÇALVES, 2013; MILLEDGE; NIELSEN; BAILEY, 2016).

3.2. Composição nutricional das macroalgas

Diversos estudos relacionados à composição nutricional das algas demonstram que, elas são constituídas por 80 a 90% de água, alto teor de fibra alimentar de 33-75% do peso

seco, sendo superiores à quantidade de fibras encontradas nas frutas e hortaliças mais comuns (GÓMEZ-ORDÓÑEZ et al., 2010; HOLDT; KRAAN, 2011; GÓMEZ-ORDÓÑEZ; JIMÉNEZ-ESCRIG; RUPÉREZ, 2012). Além disto, são importantes fontes de proteínas (5-24% marrom, vermelho e verde 10-47%) e minerais (8-40%), com baixo teor lipídico (1-2%) (RUPÉREZ; SAURA-CALIXTO, 2001; MOHAMED; HASHIM; RAHMAN, 2012; PEREIRA, 2014), apresentando ainda, elevadas quantidades de aminoácidos essenciais (EL-SAID; EL-SIKAILY, 2013).

As algas são reconhecidamente, um alimento nutritivo e hipocalórico, constituindo-se num modelo de proteína de alto valor biológico, compostos fenólicos, vitaminas (A, B1, B12, C, D e E, riboflavina, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico e, em especial, a B12, ausente nos vegetais superiores) e sais minerais (Ca, P, Na e K) (DHARGALKAR; VERLECAR, 2009; GRESSLER et al., 2011; SCHULTZ MOREIRA, 2014; OLIVEIRA, 2015). Entretanto, o teor de nutrientes e composição química pode variar, depende da espécie, local de crescimento, condições climáticas, área geográfica, período e condições de colheita (BOCANEGRA et al., 2009; MOHAMED; HASHIM; RAHMAN, 2012; GÓMEZ-ORDÓÑEZ, 2013; MILLEDGE; NIELSEN; BAILEY, 2016).

Gómez-Ordóñez (2013) e Mohamed; Hashim; Rahman (2012) reforçam que o teor de proteínas nas Rhodophytas e Chlorophytas (10-47% de peso seco) é geralmente elevado e superior ao das Phaeophytas (5-24% de peso seco). Holdt; Kraan (2011) ainda afirmam que estes níveis de proteínas são comparáveis com os níveis encontrados em vegetais ricos, tais como proteína de soja (40% do peso seco), constituindo-se, portanto, numa fonte potencial de proteínas.

3.3. Polissacarídeos sulfatados das macroalgas: Fibra alimentar

As macroalgas marinas são constituídas de polissacarídeos específicos, tanto estruturais quanto de reserva, os quais não estão presentes em outros vegetais terrestres. As galactanas sulfatadas, majoritárias das algas vermelhas, são polímeros de açúcares unidos por pontes glicosídicas com numerosas aplicações comerciais nas indústrias: nutracêutica, cosmética e, sobretudo alimentícia, como um substituinte do amido e da gordura, especialmente na indústria de enlatados e laticínios, na produção de gelatinas e geleias, além do uso como espessante, emulsificante e estabilizante (GRESSLER et al., 2010; BLOUIN et al., 2011; HOLDT;KRAAN, 2011; FIDELIS, 2014).

Os polissacarídeos das algas diferem dos encontrados em plantas terrestres, por apresentarem maior capacidade de retenção de água do que as fibras celulósicas e, por isso, apresentam diferentes efeitos fisiológicos ao longo do trato gastrointestinal, a depender do grau de solubilidade e hidratação destas fibras na presença de água, podendo ser solúveis ou insolúveis (Tabela 1) e o interesse nos hidrocolóides das algas para a nutrição humana ocorre também devido à sua atuação como fibra alimentar, uma vez que o seu efeito fisiológico está intimamente relacionado às suas propriedades físico-químicas, tais como solubilidade, viscosidade, hidratação e capacidade de troca iônica no aparelho digestivo (KADAM; PRABHASANKAR, 2010; MOHAMED at al., 2012; GÓMEZ-ORDÓÑEZ; 2013; COCKBURN; KOROPATKIN, 2016).

Segundo Elleuch et al. (2011) e Gómez-Ordóñez (2013), a classificação das fibras em solúvel e insolúvel relaciona-se a sua capacidade para formar uma solução ou não, quando em contato com a água e esta solubilidade está relacionada com a estrutura do

polissacárido, de forma que a presença de grupos de substituição como os grupos carboxila (COO-) ou sulfato (SO₄²⁻) podem aumentar a sua solubilidade.

Tabela 1 – Classificação dos principais polissacarídeos constituintes da fibra alimentar das macroalgas

Tabla 1.1. Clasificación de los principales polisacáridos que constituyen la fibra alimentaria en las macroalgas

	Fibra soluble	Fibra insoluble
Algas pardas (<i>Fucus</i> , <i>Laminaria</i> , <i>Undaria</i> , <i>Himanthalia</i>)	Laminarano <i>(1,3)-β-glucosa y (1,6)- β-glucosa, manitol</i> Alginato <i>β-(1,4)-ácido manurónico y α-(1,4)- ácido gulurónico</i> Fucano /Fucoidano /Furano <i>Fucosa sulfato, ácido manurónico, xilosa</i>	Celulosa <i>β-(1,4) glucosa</i>
Algas rojas (<i>Chondrus</i> , <i>Porphyra</i> , <i>Mastocarpus</i>)	Agar <i>D-galactosa y (3,6)-anhidro-D-galactosa sulfato</i> Carragenano <i>D-galactosa y (3,6)-anhidro-L-galactosa sulfato</i> Xilanos y Mananos	Celulosa <i>β-(1,4) glucosa</i>
Algas verdes (<i>Ulva</i> , <i>Enteromorpha</i>)	Xilano <i>Xilosa, ramificaciones arabinosa, glucosa, galactosa, ácidos urónicos</i> Ulvano <i>Ramnosa, xilosa, ácidos urónicos, sulfato</i> Galactanos sulfatados	Celulosa <i>β-(1,4) glucosa</i>

Tomado de Jiménez-Escrig y Sánchez-Muniz, 2000; Holdt & Kraan, 2011; Jiao et al., 2011.

Fonte: Gómez-Ordóñez (2013).

As fibras insolúveis que integram a parede celular das algas são compostos principalmente por celulose e se caracterizam por sua porosidade e baixa densidade, o que lhes permitem aumentar a massa fecal e diminuir o trânsito intestinal (ELLEUCH et al., 2011; GÓMEZ-ORDÓÑEZ, 2013).

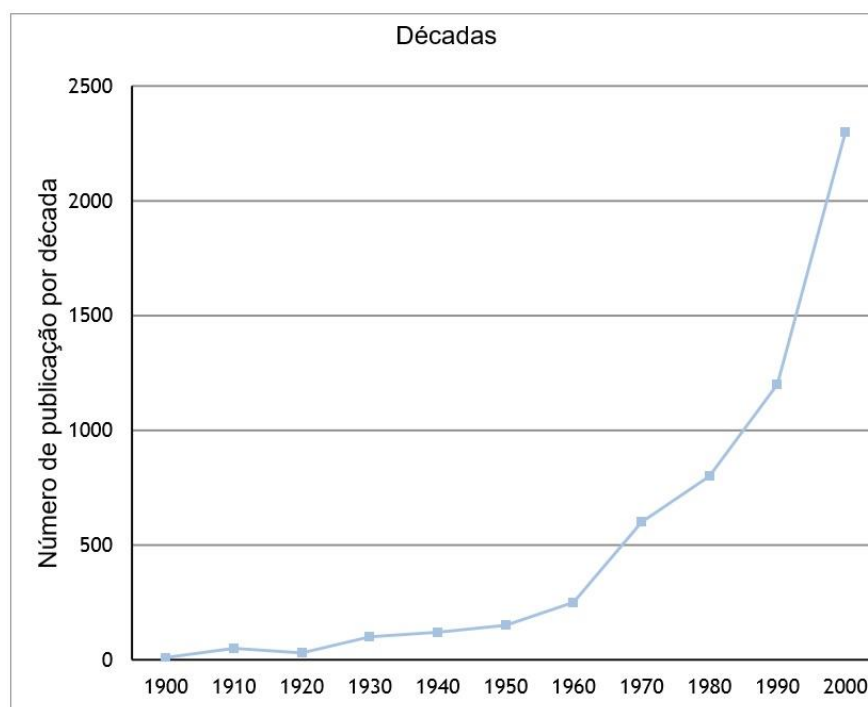
A fração de fibra solúvel (50-85% do teor total de fibra alimentar) que integra estes polissacarídeos (GÓMEZ-ORDÓÑEZ et al., 2010) é composta principalmente de fucanos, laminaranos, alginatos (Phaeophytas), carragena e ágar (Rhodophytas), exopolissacarídeos não fermentáveis, pelo menos não completamente, pela microbiota do cólon, uma vez que não sofrem a ação de enzimas digestivas, atingindo o cólon ainda não degradados, onde bactérias do cólon, com as suas numerosas enzimas de grande atividade metabólica, podem digerir em maior ou menor grau em função da sua estrutura. Portanto, o poder de fermentação é a propriedade mais importante destas fibras, uma vez que, delas se derivam um grande número de efeitos a nível local e sistémico (GÓMEZ-ORDÓÑEZ, 2013; FIDELIS 2014; COCKBURN; KOROPATKIN, 2016). Estas fibras solúveis são caracterizadas por sua capacidade de aumentar a viscosidade, reduzindo a resposta glicêmica e o colesterol no sangue (ELLEUCH et al., 2011).

A Associação Americana de Químicos de Cereais (AACC) define fibra alimentar como "a parte comestível de plantas ou carboidratos análogos que são resistentes à digestão e absorção no intestino delgado humano, com fermentação completa ou parcial no intestino grosso. A fibra alimentar inclui polissacarídeos, oligossacarídeos, lignina e substâncias vegetais associadas que promovem efeitos fisiológicos benéficos, incluindo o efeito laxante e / ou redução do colesterol no sangue e / ou atenuação da glicose no sangue" (SILVA; MURA, 2011).

Há muitas propriedades biológicas atribuíveis aos polissacarídeos sulfatados de algas e o interesse científico pelo potencial biotecnológico destes organismos e suas aplicações é bastante recente (PENGZHAN et al., 2003; DAPPER, 2014). Novos horizontes se abrem na utilização e exploração das macroalgas marinhas, que vão além da importância econômica como alimento, sendo promissores como compostos biologicamente ativos, além outras finalidades, constituindo-se numa fonte interessante de novos compostos com atividades biológicas, que poderiam ser utilizadas como ingredientes funcionais (PERES, 2012; FIALHO, 2015).

A Figura 1 apresenta o expressivo aumento no número de trabalhos internacionais publicados nas últimas décadas, relacionados com algas.

Figura 1 – Número de publicações internacionais relacionadas a algas, por década, ente 1900 – 2000.



Fonte: Craigie (2011) citado por Costa (2015).

Nas últimas décadas, a descoberta de metabólitos bioativos com propriedades biológicas ou farmacológicas cresceu substancialmente, a saber, atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, anti-coagulante, antiviral, anticancerígena, imunomoduladora, medicamentosa, nutricional, dentre outras (ROCHA et al., 2007; YOKOYA, 2010; HOLDT; KRAAN, 2011; CABRAL et al., 2011; JIAO et al, 2011; WIJESEKARA; PANGESTUTI; KIM., 2011; COSTA et al., 2012; ROCHA; COSTA; LEITE, 2012; ARAÚJO et al., 2016).

O fato das algas serem promissoras na síntese destes bioativos pode estar relacionado a diversos fatores, dentre eles a atuação dos polissacarídeos como agentes protetores das adversidades do meio, como por exemplo, para proteger o organismo da desidratação decorrente principalmente do sol, das variações da maré, visto que muitas algas encontram-se na região entremarés (BALAKRISHNAN et al., 2014). Devido às mais diversas condições ambientais , a biossíntese de metabólicos secundários, tornou-se uma estratégia de sobrevivência (CARDOZO, et., al, 2007). Outros fatores poderiam relacionar-se às diversas interações biológicas e condições abióticas extremas e, para a sua sobrevivência, desenvolveram mecanismos de defesa que resultam na produção de um grande número de compostos químicos a partir das distintas rotas metabólicas, como os carboidratos, aminoácidos, hormônios vegetais, ácidos graxos, entre outros polímeros e compostos orgânicos. (YOKOYA, 2010; PERES, 2012; COSTA, 2015).

3.4. Filo Rhodophyta: *Gracilarias*

Segundo Yow (2011) o filo Rhodophyta (Figura 2) constitui-se no grupo de maior diversidade de espécies dentro das macroalgas marinhas. Acredita-se que haja cerca de 500 a 600 gêneros de algas vermelhas, que são representadas por bem mais de 6000 espécies.

As algas vermelhas são predominantemente marinhas, dominam as águas tropicais e quentes, mas podem também ser encontradas em regiões consideradas mais frias do mundo (ROCHA et al., 2011; TABARSA, et al., 2012). Nos ambientes marinhos, as Rhodophytas ocupam desde a zona superior da região entre marés até grandes profundidades (SILVA, 2010).

Figura 2 – Filo Rhodophyta



Fonte: <https://sarahluck.me/2012/04/12/super-seaweed/>

De acordo com Silva (2010), o material de reserva das Rhodophytas é um composto que possui propriedades intermediárias entre o amido (que é o produto de reserva das

plantas) e o glicogênio (reserva alimentar dos fungos, bactérias e de muitos organismos não vegetais) chamado de amido das florídeas e fica armazenado no citoplasma. A parede celular é constituída de celulose e uma camada externa de mucilagem, que pode ser galactanas (como ágar e carragenana). A maioria das Rhodophytas é multicelular, podendo atingir mais de 2 metros de comprimento. Dentre as rodofíceas, as formas filamentosas são as predominantes, mas podem apresentar talo foliáceo, cilíndrico ou crostoso.

Os principais pigmentos fotossintetizantes presentes nas algas vermelhas são *clorofila a* e *d* e os pigmentos acessórios compostos de carotenos (como o betacaroteno) e ficobilinas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina), que são responsáveis pela coloração avermelhada destas algas. Nesse caso, a cor verde da *clorofila a* é disfarçada pelo pigmento adicional ficoeritrina, localizado no cloroplasto, peculiar deste filo, que cede a alga a cor vermelha e o material principal de reserva é o amido, achado no citoplasma (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004; SILVA, 2010; ROCHA et al., 2011; TABARSA, 2012).

As Rhodophytas são divididas em várias classes sendo a Gelidiales e Gracilariales as mais importantes (VASCONCELOS; GONÇALVES, 2013).

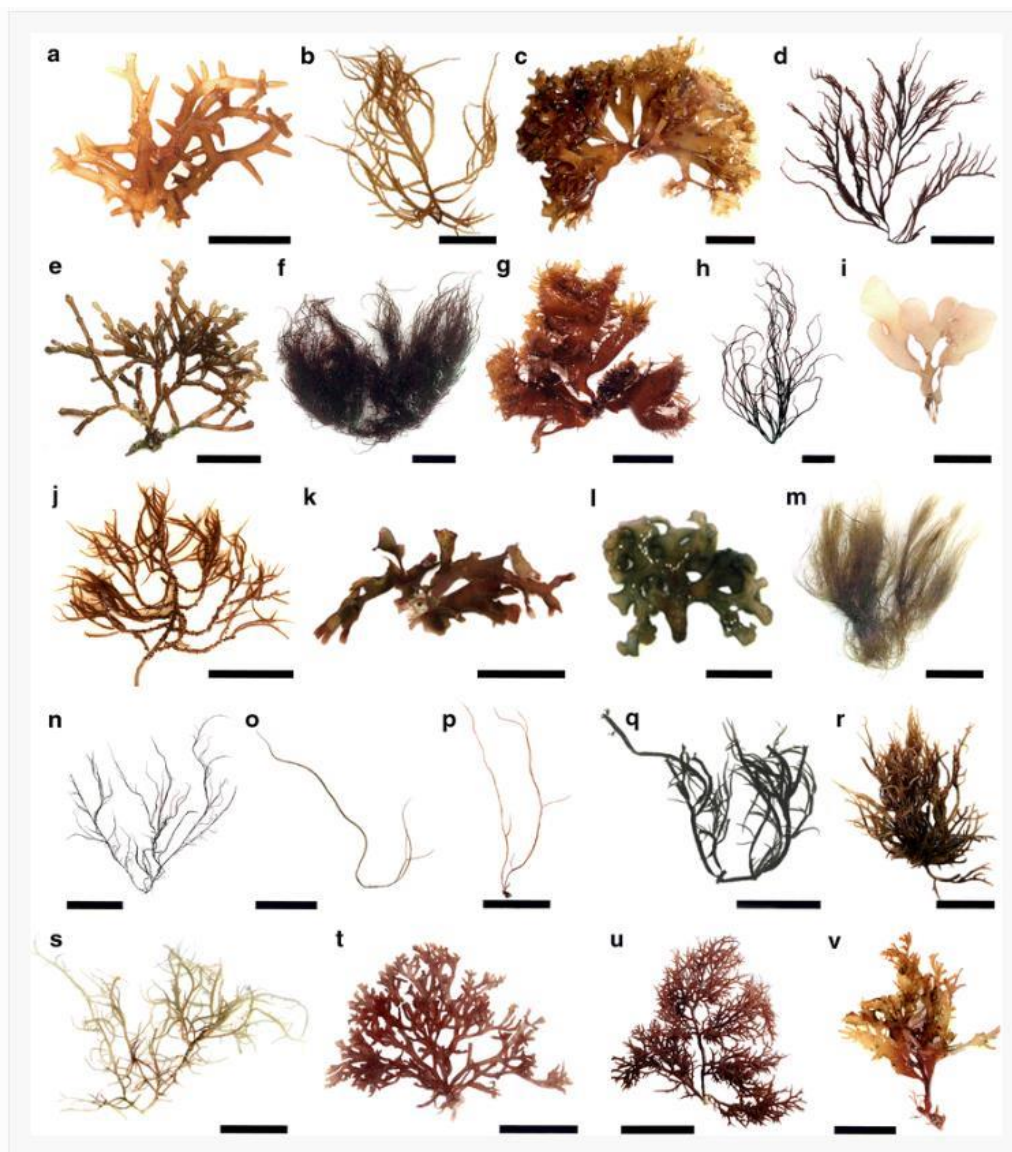
A família Gracilariaceae pertence à ordem Gracilariales (YOW et al., 2011), uma grande família de algas vermelhas principalmente pantropical , incluem ~ 230 espécies em sete gêneros (BOUZON et al., 2011; GUIRY; GUIRY 2014; GOIA et al., 2015). A Gracilariaceae é de grande importância devido ao seu papel na produção de ficocolóides (YANG; KIM, 2015; YOW et al., 2011; COLLÉN et al., 2011). Espécies de *Gracilaria* são as mais requisitadas para a produção mundial de ágar e por serem tão importantes economicamente, este gênero tem sido objeto de muitos estudos em todo o mundo (COSTA; PLASTINO 2011).

Gracilaria é considerado o maior gênero da divisão Rhodophyta com mais de 150 espécies descritas e possui distribuição cosmopolita com o maior estoque natural e número de espécies ocorrendo em áreas tropicais e subtropicais (ARMISÉN, 1995 citado por SILVA, 2011), comumente encontrado na zona intertidal (zona entre marés), exibindo uma variedade de mecanismos fisiológicos em resposta a alterações ambientais (GÓMEZ et al., 2005). Devido a essa plasticidade, frequentemente ocorrem cores variantes (Figura 3), resultando em laranja, marrom, verde, amarelo, rosa e roxo (COSTA; PLASTINO, 2001; GUIMARÃES et al., 2003). No entanto, os estudos sobre as diferenças nas características fisiológicas destas estirpes no campo são escassos (PEREIRA et al., 2016).

Este tipo de variação intraclonal ocorre por causa das diferenças significativas no fenótipo entre as espécies derivadas a partir de um número de genes que podem resultar de um único fator ou a partir de uma combinação de efeitos provocados por vários fatores. Estes fatores incluem as diferenças no microambiente circundante durante o crescimento, diferenças fisiológicas e variações no desenvolvimento de espécies geneticamente idênticas (PEREIRA et al., 2016).

Costa et al., (2012) afirmam que a Universidade de São Paulo dispõe de um Banco de Germoplasma de Gracilariaceae com 50 linhagens coletadas principalmente no Brasil e ao redor do mundo. Este banco tem sido usado como uma fonte de material para pesquisas desenvolvidas localmente e no exterior. Esta família, com mais de 200 espécies, tem sido extensivamente, estudada, entretanto alguns problemas taxonômicos ainda persistem pela existência de espécies crípticas, plasticidade fenotípica, e ampla distribuição geográfica. No caso de algas mantidas em cultura por longos períodos de tempo, a identificação é ainda mais problemática como consequência da modificação morfológica considerável.

Figura 3 – Espécies de Gracilariaceae.



Fonte: Yang e Kim (2015).

De acordo com Costa e Plastino (2011), com a transformação industrial da década de 80, passou a se fazer colheitas de bancos naturais para predominar a produção em maricultura, como efeito da decadência de populações naturais devido à extensa exploração. Essa expansão da maricultura induziu a disseminação de espécies de uma região geográfica para outra.

A presença de ágar na matriz celular em espécies de *Gracilaria*, não garantiu, inicialmente, sua exploração comercial, pois o ágar de alguns representantes desse gênero apresentavam características consideradas inadequadas pelo mercado internacional (SANTOS, 2011). A descoberta da técnica de hidrólise alcalina dos grupos sulfato do ágar aumentou a capacidade de gelificação desse ficocolóide, proporcionando consideráveis melhorias na sua qualidade, que veio a refletir numa maior exploração comercial deste gênero (McHUGH, 2003).

A ampla distribuição do gênero *Gracilaria* lhe confere grande importância econômica a nível mundial, sendo cultivada em escala comercial em vários países e regiões do mundo para produção de ágar (IBERAGAR, 2010).

Segundo Ursi et al., (2013), o cultivo desenvolveu-se como uma consequência direta dos estoques naturais limitados, em decorrência da excessiva exploração em muitos países ao redor do mundo, incluindo o Brasil. O cultivo comercial de *Gracilarias*, com altas taxas de crescimento e fácil reprodução vegetativa foi provavelmente motivada pela dificuldade em cultivar outras agarophytas (PLASTINO et al., 2004; URSI et al., 2013; FERREIRA, 2015). Espécies de *Gracilarias*, sob cultivo, chegam a contribuir com cerca de 80% da produção mundial de ágar (BIXLER; PORSE, 2011).

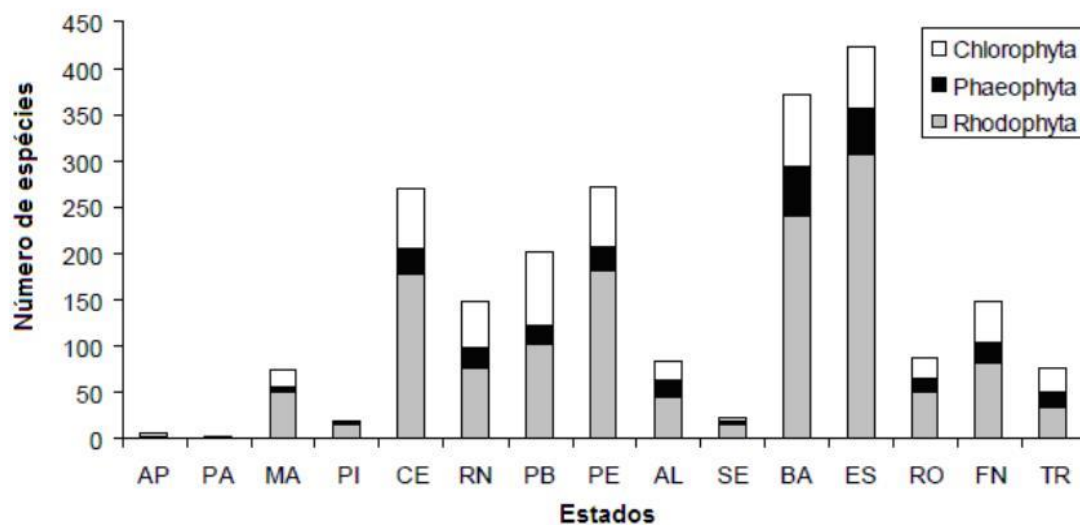
Embora presentes em larga escala na costa nordestina do Brasil, espécies de algas do gênero *Gracilaria* são devastadas devido ao intenso processo de urbanização, que resulta indiretamente na depleção de seus leitos através de práticas não ecológicas (FIDELIS, 2014). Atualmente, as comunidades pesqueiras mantêm cultivos de *gracilárias* tanto para produção de ágar, quanto para proteção da devastação de seu ambiente (BEZERRA; MARINHO-SORIANO, 2010).

As algas são, na generalidade, apanhadas manualmente por pescadores em zonas de baixa profundidade e maré baixa, ou por mergulhadores em zonas mais profundas. Após a colheita, são secas ao sol para desidratação e processamento (IBERAGAR, 2010).

Ocorrem mais frequentemente, na costa brasileira, os gêneros *Gracilaria* e *Gracilariopsis* (COSTA; PLATINO, 2011). Nas praias do Nordeste, principalmente na costa entre os Estados do Ceará e da Paraíba, *Gracilaria* e *Hypnea* ocorrem frequentemente (DE OLIVEIRA et al., 2002; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

A Figura 4 demonstra o número de espécies encontradas nos estados do litoral brasileiro. As espécies foram agrupadas conforme classificação proposta por Harvey (1836).

Figura 4 – Distribuição dos táxons de algas no litoral brasileiro.



Fonte: Figueiredo et al, 2008 citado por Lorenzo (2010).

3.5. *Gracilaria birdiae* Plastino & E.C. Oliveira

Divisão: Rhodophyceae

Classe: Florideophyceae

Ordem: Gracilariales

Família: Gracilariaceae

Gênero: *Gracilaria* greville

Espécie: *G.birdiae* Plastino & E.C. Oliveira

A espécie *Gracilaria birdiae* Plastino & E.C. Oliveira (Figura 5) foi descrita por PLASTINO e OLIVEIRA (2002), como sendo uma nova espécie de alga tropical brasileira com base em várias comparações críticas de diversos aspectos morfológicos, relacionados a outras espécies economicamente importantes, que também ocorrem na costa nordeste do Brasil e são exploradas para produção de ágar (FLORÊNCIO et al., 2012).

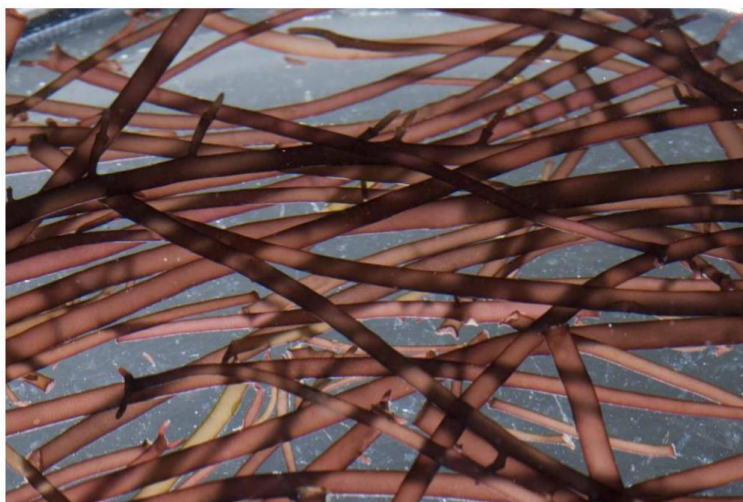
Figura 5 – *Gracilaria. Birdiae*



Fonte: Araújo (2005).

Sua estrutura vegetativa é caracterizada por um talo ereto de forma cilíndrica com 2,3 mm de diâmetro (Figura 6), podendo alcançar até 46 cm de altura (PLASTINO; OLIVEIRA, 2002).

Figura 6 – Talos de gametófitos de *Gracilaria birdiae* Plastino & E.C. Oliveira cultivados em laboratório.



Fonte: Lima Júnior (2013).

Segundo (SILVA, 2009), a *G. birdiae* apresenta algumas características interessantes, como a ocorrência de variantes pigmentares naturais (Figura 7) com ampla distribuição geográfica no país, sendo uma das principais agarófitas coletadas no nordeste brasileiro.

Figura 7 – Frondes vermelhas e marrom-esverdeadas de *Gracilaria birdiae*.



Fonte: URSI (2000) citado por SILVA (2009).

Variantes de cor da *Gracilaria birdiae* foram encontradas em populações naturais na costa brasileira, e elas também têm sido isoladas a partir de plantas cultivadas em laboratório. Tais descobertas levantaram novas questões relacionadas à variação intraespecífica e às perspectivas de cultivar essas variantes para a produção de ágar (COSTA; PLASTINO 2011).

Plastino (2004) afirma que um total de 25 linhagens foi isolado e é mantido no banco de germoplasma de algas gracilarióides do Laboratório de Algas Marinhas “Édison José de Paula” – LAM (IB - USP).

A *G.birdiae* é uma das espécies utilizadas para a produção de ágar no Brasil, ocorrendo amplamente na costa brasileira (URSI et al., 2013), entre os estados do Ceará, Espírito Santo, Paraíba, Pernambuco, Bahia e Rio Grande do Norte (URSI et al., 2003; COSTA; PLASTINO, 2011).

3.6. *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie

Divisão: Rhodophyceae

Classe: Florideophyceae

Ordem: Gracilariales

Família: Gracilariaceae

Gênero: *Gracilaria greville*

Espécie: *G. domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie

A espécie *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie pertence à ordem Gracilariales e apresenta talo comprimido ou forma de fita muito ramificado (Figura 8).

Figura 8 – Aspecto geral dos ramos de *Gracilaria domingensis*



Fonte: Santos (2011).

A espécie *Gracilaria domingensis* apresenta alta variabilidade morfológica, além de variantes cromáticas (COLLÉN et al., 2011), com polimorfismo de cor, em populações naturais, representado mais comumente pelas cores verde, vermelho e marrom (AYRES-OSTROCK, 2014; TERADA et al., 2013). Esta variação cromática (Figura 9) tem sido associada às diferenças fisiológicas (resposta às mudanças ambientais). No entanto, os estudos sobre as diferenças nas características fisiológicas destas espécies no campo são escassos (FERREIRA, 2008; PEREIRA et al., 2016). Destaca-se ainda, que a manutenção do morfo verde torna-se vantajosa para a espécie, e, mesmo sendo encontrada com uma menor frequência, esse gênero compõe uma grande parcela das populações de alguns locais do litoral brasileiro (GUIMARÃES et al. 2003; RAMLOV; PLASTINO; YOKOYA, 2009).

Sua estrutura vegetativa é composta por um talo com extremidades achatadas de aparência carnosa, com ramificações curtas que saem paralelamente ao longo do talo e

ainda porções cilíndricas, com ápices dicotômicos, com até 26 cm de altura e 2-8 mm de largura de coloração negra a amarelada (COLLÉN et al., 2011).

Figura 9 – Indivíduos de coloração verde, vermelha e marrom da espécie *G. domingensis* crescendo lado a lado em uma mesma população.



Fonte: Ferreira (2008).

A *G. domingensis* é utilizada diretamente como alimento humano e também como fonte de ágar, um polissacarídeo amplamente utilizado na indústria alimentícia como agente gelificante devido às propriedades físico-químicas conferidas a ele (YOSHIMURA et al., 2006). O ágar é, portanto, um estabilizante natural utilizado em diversos alimentos, podendo também ser empregado em formulados lácteos (NAGAI; YUKIMOTO, 2003; PEDROSO, 2006; PEREIRA, 2010a, 2010b; RUPÉREZ; AHRAZEM; LEAL, 2002). Esta espécie é amplamente distribuída no litoral brasileiro, ocorrendo nos estados do Maranhão, Ceará, Espírito Santo, Paraná, São Paulo, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro e Santa Catarina (BOUZON et al., 2011).

3.7. Panorama mundial da produção de algas

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), a aquacultura (cultivo de organismos aquáticos), já representa cerca da metade da produção aquática total e diante do crescimento populacional, especula-se o aumento do desenvolvimento da produção de biomassa através de aquacultura para diversos fins, tanto para produtos alimentares como para a produção de compostos para diversas finalidades (nutracêutica, cosmética, ficocolóides, biocombustíveis) (PATARRA, 2014).

Ursi et al. (2013), faz uma análise financeira da produção mundial de aquacultura, tomando por base o relatório publicado pela FAO em 2009 “*The state of world fisheries and aquaculture:2008*”, atestando que as algas têm contribuído de forma significativa: em 2006, a colheita de 15,1 milhões de toneladas de matéria produzida em fazendas comerciais renderam 7,2 bilhões de dólares (FAO, 2009). Deste total, cerca de 1.018 milhão de dólares foi contabilizado pelo mercado de ficocolóides e o restante em outras aplicações (BIXLER; PORSE, 2011).

Segundo a FAO, no relatório de 2012 sobre “O estado mundial da pesca e da aquacultura”, até a data, apenas as algas tinham sido registadas nas estatísticas de produção de plantas aquáticas a nível mundial (PATARRA, 2014).

Ghadiryanfar et al. (2016), afirmam que a aplicação industrial de várias Phaeophytas tem sido prática desde o início do século 20 e que, recentemente, as atenções têm sido voltadas para a produção de energia a partir destas algas, como também as Chlorophytas, em particular a *Ulva* spp (BRUTON et al, 2009). Em 2008, a aquicultura produziu plantas aquáticas a uma taxa de cerca de 15,8 milhões de toneladas (por peso) e US \$ 7,4 bilhões de dólares (por valor). Aproximadamente todas estas plantas foram algas

(99,6%) pela quantidade e (99,3%) por valor (GHADIRYANFAR et al., 2016). Os principais países produtores estão localizados no leste e sudeste da Ásia. Os produtores mais dominantes são a China (62,8%), Indonésia (13,7%), Filipinas (10,6%), República da Coreia (5,9%), Japão (2,9%) e República Popular Democrática da Coreia (2,8%) (FAO, 2010).

Ghadiryantar et al. (2016), ainda afirmam que a tendência de algas cultivadas tem crescido nas últimas décadas, passando de 6,5 milhões de toneladas em 2001 para 15,8 milhões de toneladas em 2010. O valor de algas cultivadas aumentou de US \$ 17,68 milhões em 2001 para US \$ 41,43 milhões em 2010. Dois tipos básicos de algas cultivadas são as Rhodophytas (57%) e as Phaeophytas (43%) (FAO, 2013).

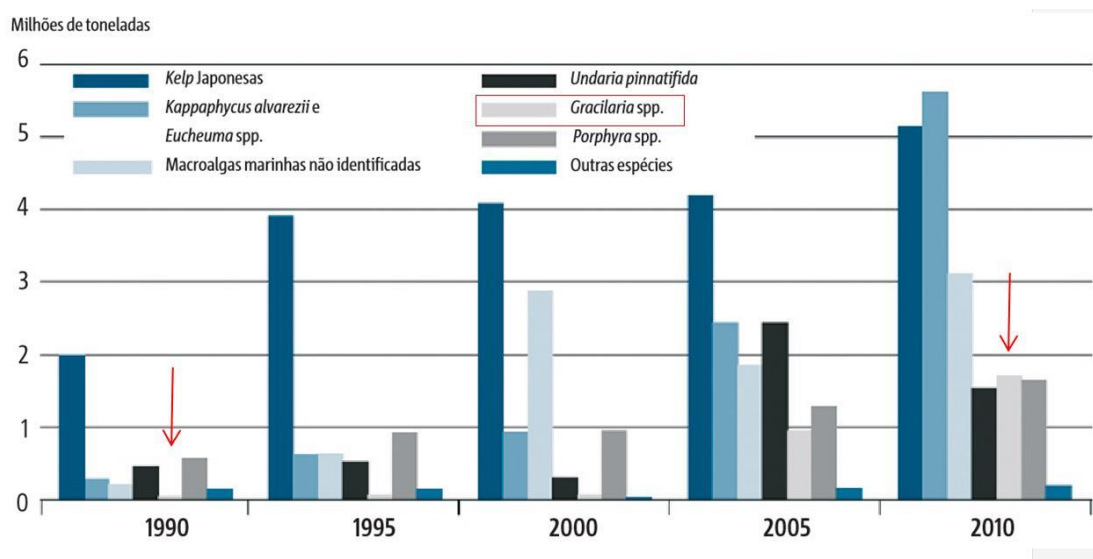
De acordo com Milledge; Nielsen; Bailey (2016), o cultivo de Rhodophytas contribui significativamente para a recente expansão na produção de algas marinhas a nível global, passando de 2 milhões de toneladas molhadas em 2000 (21% da produção de todas as algas cultivadas) para 9 milhões de toneladas molhadas em 2010 (47 %), devido principalmente ao seu uso diretamente na alimentação, bem como ao aumento da procura por ficocolóides em alimentos processados (VALDERRAMA et al., 2014; COSTA, 2015).

A FAO também publicou, recentemente, um extenso relatório sobre a produção de carragenanas pela aquacultura e seu impacto social e econômico (VALDERRAMA et al., 2014). Segundo dados da FAO (2014), 25 milhões de toneladas de algas foram produzidos durante o ano de 2012, movimentando um mercado estimado em 6,4 bilhões de dólares. Entre os anos 2000 e 2012 a produção mundial duplicou, reflexo do aumento na demanda por produtos de macroalgas FAO (2014). A aquicultura responde por 95% dessa produção, sendo o restante proveniente do extrativismo (FIALHO, 2015).

Apesar do imenso potencial de cultivo e extração das macroalgas, isto ainda não acontece de maneira expressiva a nível mundial. Em alguns países ocidentais (Estados Unidos da América, Chile, Irlanda, Islândia, Canadá e França), a produção e comercialização de macroalgas têm aumentado, ainda que o seu consumo e produção não tenham representação percentual nas estatísticas mundiais. Na Europa, existe atualmente de 15 a 20 espécies de algas comestíveis comumente comercializadas para o consumo. Os padrões de qualidade exigidos e as preocupações quanto à sustentabilidade ambiental das práticas de colheitas de macroalgas marinhas selvagens tornam premente a existência de práticas controladas de aquacultura de macroalgas (PATARRA, 2014).

A Figura 10 apresenta a produção mundial de algas de 1990 a 2010, com ênfase na evolução de produção das *Gracilárias* nos vinte anos de levantamento estatístico.

Figura 10 – Produção mundial de plantas aquáticas (algas) por espécie e/ou grupos de espécies.



Fonte: (FAO, 2012).

O Brasil é um país de extensa faixa litorânea, com mais de 2800 táxons identificados (JBRJ, 2010), banhada por águas tropicais e subtropicais, propícias ao crescimento de algas e com grande riqueza de espécies, incluindo representantes de valor econômico, todavia o cultivo e a exploração sustentável de bancos naturais de macroalgas ainda é insipiente (OLIVEIRA, 1997; CAVALLI; FERREIRA, 2010).

Os bancos de algas marinhas destacam-se por serem áreas de reprodução, alimentação e habitat da fauna. A grande riqueza genética dos ecossistemas marinhos brasileiros representa imenso potencial pesqueiro, biotecnológico, mineral e energético (OLIVEIRA; MIRANDA, 1998 citado por REBOUÇAS, 2013).

Alguns bancos de algas brasileiros assumem grande importância ecológica: Arquipélago de Abrolhos na Bahia com suas algas coralinhas, além de algas clorofíceas, rodofíceas e feofíceas; as algas marinhas bentônicas do arquipélago de Fernando de Noronha em Pernambuco; Atol das Rocas no Rio Grande do Norte, que abriga uma diversificada fauna marinha, com recifes de algas calcárias; Ilha da Trindade no Espírito Santo, que possui macro e microalgas em toda sua diversidade e o banco de algas e fanerógamas de Icapuí – CE, que se concentram nas Praias da Barrinha, Barreiras e Requenguela (FBC, 2012). Nas últimas décadas, observa-se um esforço no desenvolvimento do cultivo em larga escala, em detrimento da exploração indiscriminada e insustentável dos bancos naturais (CARDOZO, et al., 2007).

As principais algas encontradas no Brasil são *Gracilaria*, *Hypnea* e *Gelidium* (DE OLIVEIRA et al., 2002; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004; CAVALLI; FERREIRA, 2010). Recentemente, a espécie exótica, *Kappaphycus alvarezii*, originária das Filipinas e introduzida no Brasil em 1995, teve seu cultivo liberado pelo IBAMA para a região entre a

Baía de Sepetiba, RJ, e Ilha Bela, SP (PANORAMA DA AQUICULTURA, 2008; REVISTA AGROPECUÁRIA CATARINENSE, 2014).

Ursi et al. (2013), afirmam que o cultivo de algas gracilarióides no Brasil vem aumentando anualmente, e uma avaliação revelou que 600 toneladas de *Gracilaria* spp. foram extraídas para a extração de ágar. Todavia, o nosso país não têm tradição no cultivo de algas marinhas, a maior parte dos produtos de macroalgas consumidos são importados e a produção de ágar é bem inferior ao que se exporta (PLASTINO, 2004; ARAÚJO, 2011).

Nesse contexto, torna-se necessário o desenvolvimento e a expansão dos cultivos, a fim de atender ao crescente mercado e, sobretudo, reduzir a pressão sobre os bancos naturais, em processo de degradação devido à sobreexploração e à poluição ambiental (CHAI et al., 2014; FIALHO, 2015).

3.8. Hidrocolóides

O termo "hidrocolóides" é derivado do grego *hidro* "água" e *kolla* "cola". Hidrocolóides são, portanto, substâncias coloidais com afinidade para água. (WÜSTENBERG, 2015). Referem-se a uma série de polímeros de cadeia longa, polissacarídeos e proteínas, os quais são totalmente solúveis em água, formando soluções coloidais, ou parcialmente solúveis, sendo apenas capazes de inchar em água, podendo ser dispersos por meio de forças de cisalhamento. Desta forma, são utilizados em aplicações técnicas e regulados para espessar e estabilizar as formulações. Em alimentos processados, eles são onipresentes - nenhum outro grupo de ingredientes contribui mais para viscosidade, textura e corpo como hidrocolóides podem fazer (WÜSTENBERG, 2015).

Os hidrocolóides são exemplos de aditivos alimentares adicionados intencionalmente aos alimentos, com o objetivo de modificar suas características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, sem finalidade nutricional (BRASIL, 2015).

O uso de hidrocolóides em alimentos é regulado pela legislação de diferentes países para o emprego como agente emulsificante, espessante, gelificante ou estabilizante. A quantidade utilizada destes é limitada à quantidade suficiente para obtenção dos resultados adequados para alimentos especificados nos grupos, conforme definido pelo Codex General Standards for Food Additives (CODEX, 2014).

Com base em princípios da análise de risco, a ANVISA determina quais aditivos são permitidos para cada categoria de alimentos, com suas funções e limites máximos de uso, visando proporcionar o efeito tecnológico desejado sem oferecer risco à saúde humana (BRASIL, 2015).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, (BRASIL, 1997), os aditivos são classificados de acordo com a função exercida. Entre eles estão os espessantes, que aumentam a viscosidade de um alimento, e os geleificantes, que conferem textura por meio da formação de gel. Esses aditivos se constituem de diversos grupos hidroxila em sua cadeia, garantindo ampla afinidade com as moléculas de água, tornando - os hidrofílicos. Além disso, quando em contato com água, produzem uma dispersão (sistema intermediário entre uma verdadeira solução e uma suspensão), exibindo as propriedades de um colóide. Consequentemente, eles são apropriadamente denominados "hidrocolóides" (SAHA; BHATTACHARYA, 2010).

O grupo heterogêneo (polissacáridos e proteínas) que constitui os hidrocolóides exerce funcionalidades distintas, contribuindo nas propriedades estruturais e texturais dos

alimentos, por meio da sua agregação e do comportamento de gelificação (AMARAL, 2016).

Sabe-se que os hidrocolóides realmente não são emulsificadores, porque, na maior parte, eles não têm a ligação característica dos grupos lipófilos e hidrófilos na estrutura molecular (WÜSTENBERG, 2015). No entanto, estes agentes espessantes podem estabilizar as emulsões, aumentando a viscosidade da superfície da água. Diante disto, faz-se necessário elucidar o desempenho das proteínas como constituinte do grupo heterogêneo dos hidrocolóides.

Segundo Neves (2015), nem todos os hidrocolóides exibem as quatro funções (espessante, gelificante ou estabilizante), e mesmo quando as exibem, podem ser realizadas por diferentes mecanismos.

Espessante é uma substância que aumenta a viscosidade do alimento, propriedade essa que consiste na resistência em fluir de um líquido, enquanto a substância gelificante confere textura por meio da formação de gel, enquanto os estabilizantes tornam possível a manutenção de uma dispersão uniforme de duas ou mais substâncias imiscíveis em um alimento (BRASIL, 1997). Os estabilizadores, portanto, são substâncias macromoleculares que não conferem ação emulsificante diretamente, mas consolidam as emulsões estabilizando-as (TONON, 2011).

Em geral, a ação estabilizante e emulsificante está pautada na sua capacidade de interagir com as proteínas, as quais realmente têm propriedades que afetam a interface. A função primordial dos hidrocolóides em alimentos está vinculada à capacidade de se interagir à matriz e modificar o seu comportamento reológico, seja por espessamento ou gelificação.

Segundo Amaral (2016), as proteínas atribuem aos hidrocolóides sua excelente capacidade de hidrofiliabilidade e polidispersidade, abaixam a tensão interfacial devido à sua adsorção na interface, podendo formar películas nessa interface, proporcionando a repulsão eletrostática e esférica entre as gotas, e os polissacarídeos por suas propriedades de retenção de água e espessamento.

Neves (2015) assegura que tanto proteínas como polissacarídeos podem ser descritos como hidrocolóides, porém este termo foi consagrado aos polissacarídeos e à gelatina, que exibem propriedades de maior interesse relacionadas às modificações reológicas dos materiais e a interação com a água. Proteínas como caseína e glúten, são de interesse mais relevantes em outras funcionalidades, como a formação de espuma e emulsificação.

De acordo com (WÜSTENBERG, 2015), os hidrocolóides podem ser classificados segundo a sua origem e modo de fabricação, em quatro grupos diferentes:

1. Hidrocolóides puramente isolados a partir de plantas (sem modificação química);
2. Hidrocolóides obtidos por fermentação;
3. Hidrocolóides derivados de plantas que são quimicamente modificados;
4. Hidrocolóides a partir de animais.

Segundo sua origem botânica e sua função, ocorrendo naturalmente no organismo vegetal, os hidrocolóides podem ser divididos em:

- ✓ Exsudatos (colóides de protecção a serem depositados sobre as feridas): goma acácia / goma arábica, dentre outros;
- ✓ Nossas Sementes (polissacarídeos de reserva): goma guar, goma de alfarroba, dentre outros;
- ✓ Extratos de plantas terrestres e algas marinhas (substâncias estruturais): pectinas, ágar, alginato, carragenana, amido, celulose, dentre outros.

Além disso, existem:

- ✓ Polissacarídeos bacterianos ou microbianos;
- ✓ Polissacarídeos modificados;
- ✓ Proteínas de origem animal: gelatinas e caseinatos.

Ficocolóides são hidrocolóides extraídos exclusivamente de algas (por exemplo, alginato, carragenana, ágar), polissacáridos associados com a parede celular e espaços intercelulares de algumas espécies de algas, as quais têm sido extensivamente usadas como gelificantes, espessantes e agentes de estabilização em alimentos e aplicações industriais intervindo em diversas aplicações na indústria de alimentos e produtos biomédicos (GÓMEZ-ORDÓÑEZ; RUPÉREZ, 2011).

A presença de algas em produtos de uso diário, tais como pasta de dente, cosméticos, xampu, alimentos para animais, alimentos para bebês, produtos lácteos, sopas de preparação instantânea e muitos outros produtos, são exemplos claros de que algas são usadas há muitos anos na indústria alimentar e cosmética (GÓMEZ ORDÓÑEZ, 2013).

O mercado é crescente e movimentado, anualmente, milhões de dólares no mundo e suas aplicações são diversas nos mais variados tipos de indústrias à medida que novas e

diferentes propriedades destes ficocolóides são desenvolvidas (PEREIRA, 2010; IBERAGAR, 2010; OLIVEIRA, 2015).

O "Global Hydrocolloid Market Report" estimou em 2013, que para o ano de 2018 o mercado global de hidrocolóides está projetado para alcançar US\$7 bilhões sendo a América do Norte o maior consumidor desses aditivos alimentares (AMARAL, 2016).

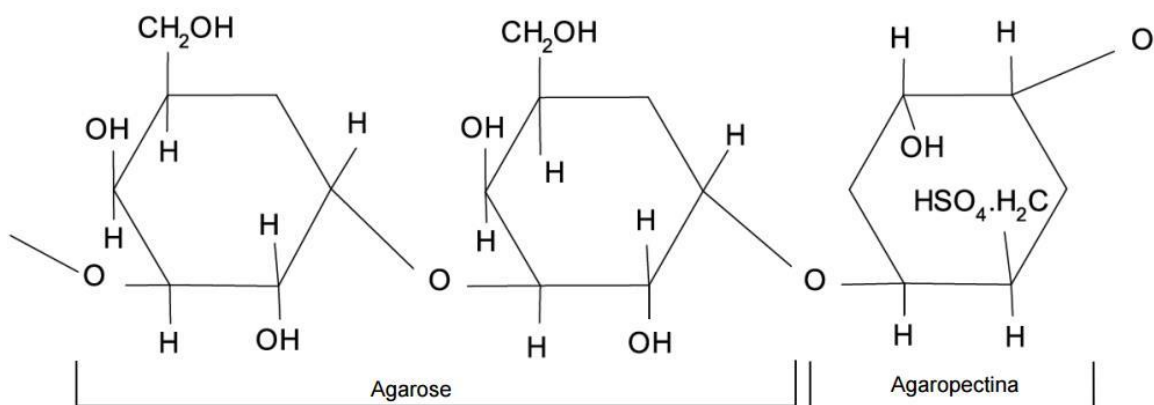
3.8.1. Ágar

Robert Koch utilizou o ágar pela primeira vez como meio de cultura, em meados do séc. XIX. Técnicas mais modernas de produção do ágar por ciclos de congelamento-descongelamento só iniciou em 1921, na Califórnia, Estados Unidos, por Chokichi Matsuoka, um japonês que registou a patente em 1923 (IBERAGAR, 2010).

Quimicamente, o ágar é considerado um polissacarídeo complexo com uma estrutura linear de unidades repetidas do dissacarídeo agarobiose, um dímero constituído por D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose e a agarpectina, um polissacarídeo constituído por grupamentos, ácido pirúvico e ácido D-glucurônico conjugado com agarobiose (Figura 11) (HOLDT; KRAAN 2011; FERREIRA, 2015).

Os diferentes tipos podem estar presentes no ágar da mesma espécie, dependendo diretamente do aspecto fisiológico, das diferenças entre as espécies agarophytas produtoras, da fase do ciclo de vida, das pressões impostas pelo ambiente, e ainda, do modo como ocorre sua extração (SANTOS 2011; FLORÊNCIO et al, 2012).

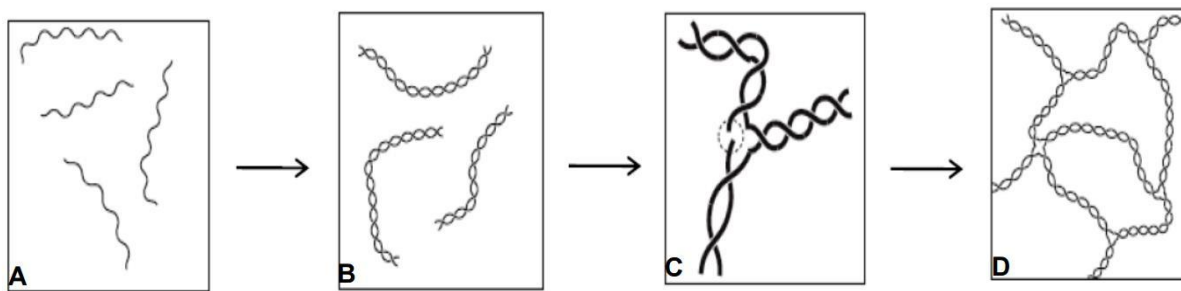
Figura 11 – Estrutura química do ágar:



Fonte: Santos (2011).

O gel de ágar apresenta estrutura molecular em cadeia e conformação helicoidal, tais interações entre estas cadeias formam uma rede tridimensional capaz de aprisionar um considerável número de moléculas de água nos interstícios (Figura 12) (SANTOS, 2011).

Figura 12 – Esquema de gelificação do ágar. Espirais aleatórias (A), com o resfriamento as duplas hélices se agregam (B), podem se agrupar com outras duplas hélices (C), por fim constituindo uma rede tridimensional, formando o gel de ágar (D) (adaptado de Potter, 2010).



Fonte: Santos (2011).

Soukoulis et al. (2007) afirma que uma maneira eficiente de aumentar a viscosidade e a consistência de formulados lácteos é a adição de hidrocolóides, por sua capacidade de ligar a água, reagindo com os constituintes do leite, os quais estabilizam a rede proteica, impedindo a circulação de água.

Embora o ágar seja insolúvel em água fria, ele absorve, em torno de 20 vezes o seu próprio peso (AGAR, 2016). O processo de gelificação do ágar está relacionado exclusivamente às ligações com pontes de hidrogênio e sua capacidade de formar géis reversíveis por simples aquecimento de soluções aquosas é a propriedade mais importante do ágar, fundindo-se em aquecimento ($\pm 80^{\circ}\text{C}$) e gelificando em resfriamento ($30\text{-}40^{\circ}\text{C}$) e ciclo pode ser repetido diversas vezes sem alteração significativa nas propriedades mecânicas do gel (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004; WÜSTENBERG, 2015).

O ágar é um hidrocolóide neutro, cuja solubilidade e a gelificação não é afetada pela adição ou presença de outros eletrólitos e, portanto, ideal para espessar e gelificar alimentos sem alterar ou adicionar qualquer sabor (IBERAGAR, 2010; WÜSTENBERG, 2015). Uma vantagem em relação às demais substâncias gelificantes, é o seu alto poder de histerese (SANTOS, 2011). A diferença entre a gelificação e a temperatura de fusão - é cerca de $50\text{-}60^{\circ}\text{C}$, superior a muitos outros agentes gelificantes (por exemplo, κ -carragenano a $15\text{-}20^{\circ}\text{C}$) (WÜSTENBERG, 2015).

Os géis obtidos a partir do ágar extraído das *Gracilarias* com o seu baixo índice de sinérese (expulsão espontânea de água através da superfície do gel em repouso) favorecem sua aplicação como agentes gelificantes na produção de alimentos de textura caracteristicamente macia (FREILE-PELEGRIN; MURANO, 2004).

A preparação da gelatina com ágar proporciona uma solidificação mais rápida do que a gelatina de origem animal, mantendo a consistência sólida à temperatura ambiente (ORNELLAS, 2006) e quando incorporado aos alimentos, confere alterações nas características reológicas, estabilização de emulsões, promoção de suspensão de partículas, controle da cristalização e inibição da sinérese dos alimentos processados, por serem polímeros de cadeia longa que se dissolvem ou se dispersam em água (FLORÊNCIO et al., 2012).

O ágar é extraído principalmente das Rodofhytas *Gelidium* spp e *Gracilaria* spp, podendo alcançar nas espécies de *Gracilaria* 31% em peso seco (HOLDT; KRAAN, 2011). A utilização de algas marinhas de gênero *Gracilaria* para a extração de ágar no Nordeste brasileiro tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas. Os distintos tipos de algas dos quais é possível obter o ágar, dão lugar a produtos com diferentes características (SANTOS, 2011), sendo amplamente utilizado na indústria alimentícia, na confecção de gelificantes e como um substituto do amido e da gordura, especialmente na indústria de enlatados e laticínios, bem como em sobremesas refrigeradas, aumentando a viscosidade para estabilizar emulsões e dispersões (TERADA et al., 2013; AYRES-OSTROCK, 2014; FERREIRA, 2015; AGAR, 2016).

Por ser um polissacárido indigerível do ponto de vista nutricional, forma parte da fibra alimentar, pois são muito raras as enzimas capazes de degradar o ágar, mesmo entre os microrganismos. Em vista disso, além de sua função gelificante e estabilizadora, o ágar é consagrado como meio de cultura na área microbiológica desde 1880 . Outras aplicações descritas para o ágar ou agar – agar são: capacidade para diminuir a concentração de glicose no sangue e potencial como um anti-oxidante e anti-carcinogênico (HOLDT; KRAAN, 2011).

3.9. Alimentos funcionais: Aspectos gerais

O termo “funcional” implica que o alimento possui algum valor benéfico para a saúde, incluindo a redução do risco de doença para quem o esteja consumindo” (EJTAHED et al., 2012).

O termo Alimentos Funcionais foi inicialmente proposto no Japão na década de 80, quando pesquisadores estudavam as relações entre nutrição, satisfação sensorial e modulação dos sistemas fisiológicos, através de pesquisas relacionadas principalmente a *Lactobacillus casei* Shirota, num contexto de promoção da saúde e com o objetivo de reduzir gastos com a saúde pública (HOSOYA, 1998; FLORENCE, 2009; SCHULTZ MOREIRA, 2014).

O Japão foi o pioneiro na produção e comercialização destes alimentos em função de uma população crescente de idosos e da preocupação, tanto do governo como da população em geral na prevenção de doenças, alcançando, posteriormente, outros países como os Estados Unidos e a Europa (DIPLOCK et al., 1999; NEUMANN, 2002; SCHULTZ MOREIRA, 2014).

A denominação legal de alimento funcional foi estipulada de acordo com o sistema “Alimento Destinado a Uso Específico de Saúde” (Food for Specific Health Use – FOSHU), em 1991, quando os alimentos funcionais japoneses passaram a apresentar um selo de aprovação do Ministério da Saúde e Bem Estar. A lei japonesa foi elaborada em junho de 1997, estabelecendo as bases e conceitos necessários para o desenvolvimento de tais produtos, entretanto não é a única atualmente (NEUMANN, et al., 2000; ROBERFROID, 2000; STANTON et al., 2005).

No Brasil, as regras foram instituídas a partir de 1999 e o setor de alimentos é regulamentado pela ANVISA, embora outros órgãos públicos como Ministério da Agricultura também possuam regulamentos (NEUMANN et al., 2000). Antes da inserção da RDC 18/99, todo e qualquer alimento poderia ser considerado como funcional. As legislações vigentes sobre alimentos funcionais são uma forma de controlar e fiscalizar o mercado, para coibir abusos das indústrias e rotulagem incorreta (NEUMANN et al., 2000).

A legislação brasileira, através das resoluções: ANVISA nº18/99 e 19/99 (ANVISA, 1999 a, b) estabelece alimento funcional como “aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutritivas básicas, quando consumido como parte da alimentação usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica”.

A ANVISA não define alimento funcional e sim “alegação de propriedade funcional” e/ou “alegação de propriedade de saúde” (ANVISA, 1999 a, b), não sendo permitidas alegações de saúde que façam referência à cura ou prevenção de doenças. Considera-se alegação de propriedade funcional, aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não-nutriente desempenham no crescimento, no desenvolvimento, na manutenção e em outras funções normais do organismo humano, mediante demonstração da eficácia (FLORENCE, 2009).

São considerados alimentos funcionais aqueles que, além de fornecerem a nutrição básica, promovem a saúde através de mecanismos não previstos pela nutrição convencional, restringindo-se à promoção da saúde e não à cura ou prevenção de doenças (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008). Devem caracterizar-se como um alimento ou um ingrediente convencional da dieta, resultando em benefícios clínicos ou de saúde e bem

estar comprovados e/ou a redução do risco de doenças, além de garantirem efeitos nutricionais adequados (ROBERFROID, 2007; PADILHA, 2013; KHAN et al., 2013).

É importante ressaltar que os nutracêuticos são diferentes dos alimentos funcionais por várias razões, enquanto a prevenção e o tratamento de doenças são associados aos nutracêuticos, apenas a redução do risco da doença estão envolvidos com os alimentos funcionais. Os nutracêuticos incluem suplementos dietéticos e outros tipos de alimentos, os alimentos funcionais devem estar na forma de um alimento comum (PASCHOAL, 2008).

Os alimentos funcionais fazem parte de uma emergente área da alimentação e da Ciência da Nutrição e o seu mercado é crescente e estimulado pela exigência cada vez maior dos consumidores por alimentos capazes de auxiliarem na manutenção da saúde, como a redução de risco de doenças crônicas e de intolerâncias alimentares, exercendo benefícios além da nutrição básica, e que ao mesmo tempo, sejam saborosos e visualmente atrativos (HENRY, 2010; SIMEONI et al., 2014; SILVA, 2015).

Os alimentos e ingredientes funcionais incluem probióticos, prebióticos, algumas vitaminas, minerais, entre outros e são encontrados em diversos produtos como cereais, leites fermentados, iogurtes, alimentos para nutrição infantil, dentre outros (SANDERS, 1998, PITHVA et al, 2012).

Os produtos lácteos constituem grande parte dos alimentos funcionais e, dentre eles, leites fermentados e iogurtes são os mais conhecidos e bem estabelecidos veículos probióticos, apresentando uma grande aceitabilidade e imensa popularidade (GNÄDIG et al., 2003; SIMEONI et al., 2014), pois além de suas características físico-químicas e funcionais, os efeitos benéficos relacionados às bactérias lácticas no leite fermentado são associados à saúde pelos consumidores (VASILJEVIC; SHAH, 2008; PADILHA, 2013).

3.10. Probióticos

O termo probiótico deriva da expressão grega “pro bios”, que significa “a favor da vida” (HÖRMANNSPERGER; HALLER, 2010). São microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, melhoram o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do consumidor (FAO/WHO, 2002; DE OLIVEIRA et al., 2012; HILL et al., 2014).

Segundo Viegas (2008), a utilização de micro-organismos benéficos ao homem, data de milhares de anos. O conceito de que algumas bactérias podem promover a saúde, em vez de danos, nasceu no início do século XX, precisamente nos anos de 1900, onde a ação dos micro-organismos foi interligada à longevidade de camponeses búlgaros e a proteção contra bactérias prejudiciais à saúde (TRIPATHI; GIRI, 2014; BEZERRA, 2015).

Uma importante contribuição ao uso de probióticos deve-se à Tissier, quando em 1906, recomendou a administração de bifidobactérias para crianças com diarreia, postulando que estas bactérias poderiam competir com as bactérias indesejáveis no intestino, eliminando-as e tornando-se o micro-organismo intestinal dominante (BALLONGUE, 1993 citado por VIEGAS, 2008).

Estas evidências impulsionaram vários estudos que comprovaram os benefícios ocasionados pela ação dos probióticos na saúde humana e, atualmente, são reconhecidamente eficazes na promoção da saúde (GARCIA-RUIZ, 2014; RIBEIRO et al., 2014).

Segundo Marafon (2010), a definição do termo probiótico evoluiu ao longo dos anos em função de diversos estudos cinéticos, genéticos e dos efeitos comprovados cientificamente sobre a saúde do hospedeiro. Várias definições têm sido dadas para os

probióticos, conforme apresentado no Quadro 1, entretanto, a definição atual e, portanto, a mais aceita foi proposta pela FAO/WHO em 2001.

Quadro 1 – Definição dos probióticos com o passar dos anos.

Definição publicada	Referência
Substâncias produzidas por microrganismos que estimulam o crescimento de outros.	Lilly; Stillwell, 1965
Organismos ou substâncias que contribuem para o balanço microbiano do intestino.	Parker, 1974
Um suplemento de organismos vivos que beneficiam o hospedeiro, melhorando seu balanço microbiano intestinal.	Fuller, 1989
Um cultivo mono ou misto viável de microrganismos que, quando aplicado em animal ou homem, o afeta benéficamente, melhorando as propriedades da microflora endógena.	Havenaar; Huis In't Veld, 1992
Organismos vivos que, quando ingeridos em certa quantidade, oferecem efeitos benéficos além da nutrição básica.	Schaafsma, 1996
Um auxiliar dietético microbiano que afeta benéficamente a fisiologia do hóspede, modulando a imunidade, assim como melhorando o equilíbrio nutritivo e microbiano no trato intestinal.	Naidu; Bidlack; Clemens, 1999
Uma preparação ou produto que contenha microrganismos viáveis, definidos em números suficientes que alteram a microflora no hóspede e exercem efeitos benéficos.	Schrezenmeir; De Vrese, 2001
Microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde dos hospedeiros.	FAO/WHO, 2001

Fonte: Marafon (2010).

Os micro-organismos considerados probióticos, segundo a legislação brasileira, que podem ser adicionados aos alimentos com a alegação para contribuir para o equilíbrio da flora intestinal são: *L. acidophilus*, *L. casei shirota*, *L. casei* variedade *rhamnosus*, *L. casei* variedade *defensis*, *L. paracasei*, *Lactococcus lactis*, *B. bifidum*, *B. animalis*, *B. longum* e *E. faecium* (ANVISA 2008).

As propriedades benéficas não podem ser consideradas para todas as cepas probióticas, ou até mesmo para cepas de uma mesma espécie, uma vez que podem apresentar áreas de adesão diferentes, efeitos imunológicos específicos e mecanismos de ação caracterizados, sobre a mucosa (EJTAHED et al, 2011).

Os probióticos apresentam diversas características inerentes a cada cepa e as mais importantes são a sua capacidade para resistir ao suco gástrico ácido do estômago, aos sais biliares e às enzimas digestivas; capacidade de aderir à mucosa intestinal, conviver com a microbiota intestinal endógena e produzir substâncias que inibem o crescimento de bactérias indesejáveis. Além disso, os probióticos devem ser estáveis quando aplicados em alimentos (FAO, 2002).

As ações antagônicas e de competição dos probióticos sobre os micro-organismos indesejáveis, estimulam a multiplicação de bactérias benéficas e inibem a proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, estabelecendo um balanço adequado e reforçando os efeitos imunológicos que aumentam a resistência aos patógenos e auxiliam na recuperação do equilíbrio da microbiota autóctone, o que representa a base da terapia por probióticos (SAAD, 2006; GAHRUIE et al., 2015). Entretanto, o balanço da flora intestinal humana está associado a uma boa nutrição e saúde do organismo e a inserção de probióticos nos alimentos, viabilizando meios para se alcançar esse balanço da flora (LOURENS-HATTING; VILJOEN, 2001).

Diversos estudos comprovam que os probióticos podem auxiliar na intolerância à lactose, uma vez que bactérias como *L. acidophilus* e *B. bifidum* produzem a β -D-galactosidase, enzima responsável pela hidrólise da lactose e que está ausente nos indivíduos que apresentam intolerância a esse açúcar, além de outros benefícios a eles atribuídos como: estimulação da resposta imune, alívio de alergias alimentares infantis e dos sintomas da síndrome do intestino irritável, controle de infecções gastrointestinais, redução da constipação e do câncer de cólon, inibição do crescimento da *Helicobacter pylori*, redução do colesterol sanguíneo e aumento da digestibilidade dos alimentos, através do aumento da biodisponibilidade de proteínas e de gordura, aumento da liberação de aminoácidos livres, aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas, bem como estímulo de efeitos anti-mutagênicos, anti-cancerígenos e anti-hipertensivos (GOTTELAND et al., 2006; SAAD 2006; DIAS, 2012; BLAIOTTA et al., 2013; LOLLO et al., 2013 GARCIA-RUIZ, 2014; RIBEIRO et al., 2014). Esses benefícios decorrem, como já mencionados, dos efeitos dos probióticos sobre a microbiota intestinal, como efeitos antagônicos, competição com micro-organismos indesejáveis, resistência aos patógenos e estímulo de multiplicação de bactérias benéficas em relação às patogênicas (ZACARIAS et al., 2011).

Segundo Silva (2015), dos gêneros que integram os probióticos, o *Bifidobacterium* e o *Lactobacillus* apresentam grande destaque, pois são comumente utilizadas em suplementações probióticas em alimentos e habitam todas as porções do trato gastrintestinal humano saudável.

As linhagens de bactérias para serem classificadas como probióticas devem apresentar as seguintes propriedades: a espécie a qual pertence a bactéria deve ser, preferencialmente, de origem humana; capacidade de aderir à mucosa do intestino,

colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrointestinal humano; produzir compostos antimicrobianos e estarem metabolicamente ativas no intestino (KOLIDA; GIBSON, 2011). Entre os requisitos, incluem-se, ainda, a segurança para uso humano, ter histórico de não patogenicidade e não estar associada a outras doenças, além de não apresentarem genes determinantes de resistência a antibióticos (COLLINS et al., 1998; LEE et al., 1999; SAARELA et al., 2000; DE OLIVEIRA et al., 2002; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Ressalta Monteagudo-Mera et al. (2012) que para conseguir estabelecer potenciais benefícios dos probióticos para a saúde humana é preciso realizar estudos *in vitro* antes dos ensaios *in vivo*. Além disso, estirpes precisam ser testadas individualmente para cada propriedade.

3.11. Bactérias ácido lácticas e Bifidobactérias

As bactérias ácido lácticas (BAL) integram um grupo heterogêneo de bactérias Gram-positivas em forma de cocos ou bastonetes, não formadores de esporos, catalase negativa, anaeróbios ou aerotolerantes, composto por muitos gêneros como *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* (HUERTAS, 2010; RUSHDY; GOMAA, 2013). Por sua vez, as bactérias do gênero *Bifidobacterium* não são bactérias ácido lácticas (BAL's) “verdadeiras”, entretanto são comumente aceitas como membros do grupo BAL, ainda que sejam filogeneticamente distantes deste grupo, pois, produzem tanto o ácido acético quanto o ácido láctico por uma via incomum, não usual do sistema metabólico da glicose (BARBOSA et al., 2012). Neste processo, ocorre a conversão da frutose-6-fosfato em acetil-1-fosfato e eritrose-4-fosfato por ação da enzima frutose 6-fosfato fosfoetolase (F6PPK), enquanto que no metabolismo de *Lactobacillus*

ocorre principalmente produção de ácido láctico (BARBOSA et al., 2012; COSTA et al., 2012).

Dentre as BAL, os *Lactobacillus acidophilus* são os mais empregados como probióticos em comparação às outras espécies, em virtude da sua elevada capacidade de adesão ao epitélio intestinal, bem como os benefícios que traz para o hospedeiro, como a regulação do trato gastrointestinal (ALVEZ, 2010). Algumas linhagens podem, inclusive, melhorar o valor nutricional dos produtos aos quais forem adicionados, pela síntese de ácido fólico, niacina, riboflavina e vitamina K (GOMES; MALCATA, 1999; O'SULLIVAN, 2006).

Segundo OLIVEIRA (2014) a capacidade de exclusão ou redução de enteropatógenos demonstrada por muitas linhagens de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* é uma das características mais importantes atribuídas a estes micro-organismos, despertando interesse na biopreservação de alimentos. Diversos autores relatam que a atividade inibitória exercida frente a outros micro-organismos, devido a suas propriedades antibacterianas potenciais está relacionada aos produtos finais do seu metabolismo (PEREIRA; GÓMEZ, 2007; VÁSQUEZ et al., 2009; COSTA et al., 2012).

Os probióticos têm sido largamente explorados pela indústria de laticínios como uma ferramenta para o desenvolvimento de uma gama de alimentos funcionais (VASILJEVIC; SHAH, 2008; BALDISSERA et al., 2011), principalmente, no que diz respeito à caracterização de cepas probióticas específicas para matriz de alimentos; bem como a interação do teor nutricional dos componentes alimentares com as cepas probióticas mais eficientes (MACHADO, 2015).

Os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, membros comuns, mas não dominantes da nossa flora gastrointestinal, são comumente adicionados em lácteos com alegações

funcionais, devido a sua comprovada atividade biológica e efeitos terapêuticos (SHAH, 2000; SWAIN et al., 2014; SILVA, 2015). *Lactobacillus acidophilus*, em especial, são reconhecidos pelo seu perfil de baixa pós-acidificação do produto sob armazenamento refrigerado, aspectos importantes para a indústria (DIAS, 2012).

Em função da perda de viabilidade durante o período de armazenamento, aconselha-se empregar culturas probióticas associadas a culturas de suporte, de preferência, *Streptococcus thermophilus* ou outra cultura mesofílica que seja apropriada para atuar em co-cultura com os probióticos. Esta escolha é fundamental para a obtenção de produtos fermentados frescos e com boa sobrevivência de probióticos durante sua vida-de-prateleira (SAXELIN et al., 1999; SAARELA et al., 2000). Microrganismos probióticos quando em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* são estimulados pela cultura starter, uma vez que as cepas probióticas possuem baixa atividade proteolítica (KOMATSU et al, 2008; GALIA et al, 2009).

Streptococcus thermophilus são largamente utilizados na produção de leites fermentados, em função de sua capacidade de produção de ácido láctico, pela degradação da lactose. Enquanto a atividade do *Streptococcus* promove a redução do pH até, aproximadamente 5, os *Lactobacillus* causam uma redução ainda maior, até o pH 4. Neste processo fermentativo, os produtos (ácido láctico, acetaldeído, ácido acético e diacetil) resultantes de sua ação inibem a proliferação de microrganismos patogênicos e promovem mudanças na textura, aroma e sabor do leite fermentado (REID et al, 2003). Algumas cepas de bactérias lácticas requerem fontes exógenas de peptídeos para a sua multiplicação, uma vez que não são capazes de sintetizar diversos aminoácidos.

Diversos fatores podem influenciar na viabilidade dos probióticos em produtos fermentados, a exemplo da cepa utilizada, as condições da cultura, interação dos

probióticos (bacteriocinas, antagonismo, sinergismo) com outras culturas starter, a concentração do inóculo, tempo e temperatura de fermentação e armazenamento, a disponibilidade de nutrientes, a concentração de açúcares e o oxigênio presente (LOURENS-HATTING; VILJOEN, 2001; EJTAHED et al, 2011).

É importante ressaltar que o número de micro-organismos viáveis no alimento a ser consumido está diretamente relacionado à promoção dos efeitos benéficos, sendo imprescindível manter a viabilidade durante o armazenamento e após a passagem pelo trato gastrointestinal, permanecendo estáveis na chegada ao intestino (BURGAIN et al., 2013).

Para garantir benefícios à saúde, a contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g, no produto final, para o(s) cultivo(s) láctico(s) específico(s) empregado(s), durante todo o prazo de validade (ANVISA, 2002).

3.12. Caracterização das culturas empregadas

Streptococcus thermophilus apresentam em sua morfologia, cocos unidos em cadeia, Gram positivos, anaeróbios facultativos, homofermentativos, produzindo principalmente ácido láctico e, em menor quantidade, diacetil, acetaldeído, ácido fórmico e ácido pirúvico, a partir da lactose. São termófilos, multiplicando-se rapidamente entre 37 e 45°C, com ótimo em 38°C, podendo tolerar até 50°C. Apresentam elevada sensibilidade a NaCl (<2%) e importante função bioajustadora de pH em processos fermentativos na presença de bactérias probióticas (FERREIRA, 2012). Algumas cepas são produtoras de exopolissacarídeos, muito úteis na produção de leites fermentados mais firmes, mantendo a textura e a viscosidade durante a manipulação posterior à fermentação (COLLET, 2005).

A maioria das espécies de *Streptococcus* está associada à patogenia humana e animal, sendo o *Streptococcus thermophilus*, a única espécie do gênero empregada na produção de alimentos, que produz ácido láctico e está presente na composição da maioria dos fermentos termofílicos empregados na produção de diferentes tipos de queijos e leites fermentados (FERREIRA, 2012).

Lactobacillus acidophilus são bastonetes não flagelados, não formadores de esporos, gram-positivos e intolerantes ao sal. São microaerófilos ou anaeróbios, com metabolismo estritamente fermentativo, sendo o ácido láctico o principal produto do seu metabolismo de carboidratos e em menor proporção, acetaldeído. Sua multiplicação pode ocorrer em temperaturas de até 45°C, apresentando temperatura ótima entre 35 a 40°C. O pH ideal para a multiplicação é entre 5,5 e 6,0 (CARDARELLI et al., 2008; BUTEL, 2014).

Bifidobacterium animalis são bastonetes gram-positivos, comumente exibindo forma bífida e são anaeróbios. A população de bifidobactérias no intestino tende a ser constante, mas é influenciada pela dieta, antibióticos, estresse, dentre outros fatores. Multiplicam-se entre 20 e 46°C, morrendo a 60°C e o pH ótimo situa-se entre 6,5 e 7,0, não havendo multiplicação em pH inferior a 5,1 ou superior a 8,0. Elas possuem as enzimas superóxido desmutase e catalase, que auxiliam na proteção contra o efeito tóxico de superóxidos e peróxido de hidrogênio (CARDARELLI et al., 2008; BUTEL, 2014).

Culturas de *L. acidophilus* produzem ácido láctico como resultado do seu metabolismo fermentativo, enquanto as bifidobactérias produzem ácido acético e ácido láctico na proporção molar de 3:1. Essas bactérias ainda são capazes de sintetizar ácido fólico, niacina, tiamina, riboflavina, piridoxina e vitamina K (CARDARELLI et al., 2008; BUTEL, 2014).

Lactobacillus acidophilus e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* podem apresentar caráter homofermentativo ou heterofermentativo. A homofermentação acontece quando as hexoses são convertidas, quase que exclusivamente, em ácido láctico (via de Embden-Meyerhor). Na heterofermentação obrigatória, as hexoses são convertidas tanto em ácido láctico, quanto em etanol e/ou ácido acético, gás carbônico e ATP (via 6-fosfogluconato/fosfocetolase) (GOMES; MALCATA, 1999; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

3.13. Leites fermentados e sobremesas lácteas

3.13.1. Leites fermentados

Os leites fermentados têm sua origem de tempos remotos, não sendo possível precisar a época de seu surgimento. No início do século XX, no Institute Pasteur (Paris – França), um biólogo russo chamado Elia Metchnikoff (1845 - 1916) conseguiu, pela primeira vez, traçar uma relação entre a fermentação do leite e o papel das bactérias e leveduras acidificantes (JAY, 1996 citado por VIEGAS, 2008), demonstrando que o consumo regular de leites fermentados oferecia benefícios à saúde (GONÇALVES; EBERLE, 2009). Ele estudava as propriedades de saúde conferidas por leites fermentados, associando sua produção ao metabolismo de micro-organismos lácteos. A partir destas descobertas, várias culturas lácticas foram isoladas e caracterizadas, bem como o processo de fermentação passou a ser controlado e padronizado pelas indústrias (ROBINSON, 1991).

Segundo os parâmetros fixados pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentado, Instrução Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007, “entende-se por Leites Fermentados os produtos adicionados ou não de outras substâncias

alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microrganismos específicos. Estes microrganismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade” (BRASIL, 2007).

Leite fermentado é o nome genérico dado a produtos como: iogurte, leite cultivado, leite acidófilo, kefir, kumys e coalhada. O termo “fermentado” refere-se ao processo de inoculação do leite por bactérias ácido lácticas que convertem a lactose em ácido láctico, produzindo o leite fermentado com características específicas de textura, composição e propriedades sensoriais (CARNEIRO et al., 2012; SUMARMONO; SULISTYOWATI; SOENARTO, 2015). A produção do ácido láctico reduz o pH do leite, sendo que durante a acidificação, o pH diminui de 6,7 para um valor $\leq 4,6$ (LEE; LUCEY, 2010). O leite fermentado ou cultivado é o leite incluído na definição de Leites Fermentados, cuja fermentação se realiza com um ou vários dos seguintes cultivos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp, *Streptococcus thermophilus* e/ou outras bactérias ácido-lácticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final (BRASIL, 2007).

Os leites fermentados devem apresentar as características físico-químicas observadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Características físico-químicas dos leites fermentados

Produto	Matéria Gorda Láctea (g/100g)*	Acidez (g ác. Lático/100g)	Proteínas Lácteas (g/100g)*
Com creme	Mín. 6,0	0,6 a 2,0	Mín. 2,9
Integral	3,0 a 5,9	0,6 a 2,0	Mín. 2,9
Parcialmente desnatado	0,6 a 2,9	0,6 a 2,0	Mín. 2,9
Desnatado	Máx. 0,5	0,6 a 2,0	Mín. 2,9

* Os leites fermentados com agregados, açucarados e/ou saborizados poderão ter conteúdo de matéria gorda e proteínas inferiores, não devendo reduzir-se a uma proporção maior do que a porcentagem de substâncias alimentícias não lácteas, açúcares acompanhados de glicídios (exceto polissacarídeos e polialcoóis) e/ou amidos modificados e/ou maltodextrina e/ou aromatizante / saborizante adicionados.

Fonte: (BRASIL, 2007) citado por Carneiro et al.(2012).

Ainda segundo a IN nº46 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), os leites fermentados devem apresentar durante seu prazo de validade comercial, as seguintes características microbiológicas (Tabela 3).

Tabela 3 – Contagem de microrganismos específicos.

Produto	Contagem de bactérias lácticas (UFC/g)	Contagem de leveduras específicas (UFC/g)
Iogurte	Mín. 10^7 *	-
Leite fermentado ou cultivado	Mín. 10^6 *	-
Leite acidófilo ou acidofilado	Mín. 10^7	-
Kefir	Mín. 10^7	Mín. 10^4
Kumys	Mín. 10^7	Mín. 10^4
Coalhada	Mín. 10^6	-

* No caso em que se mencione o uso de bifidobactérias, a contagem não deve ser inferior a 10^6 UFC de Bifidobactérias /g.

Fonte: (BRASIL, 2007) citado por Carneiro et al.(2012).

A simples tecnologia de fabricação dos leites fermentados, aliada ao elevado prazo de validade e o sabor agradável, além dos comprovados benefícios à saúde, têm sido fatores determinantes para a popularização destes produtos em todo o mundo (CARNEIRO et al., 2012).

O Leite é um produto extremamente perecível, havendo a necessidade de acrescentar, após o tratamento térmico, um cultivo iniciador (fermento) composto de bactérias lácticas que são micro-organismos que fermentam a lactose do leite a ácido láctico (AQUARONE, 2001). A fermentação láctea inibe a multiplicação da microbiota deteriorante e de agentes patogênicos que possam alterar o alimento. Razão pela qual os produtos lácteos fermentados se conservam por período maior de tempo em relação aos não fermentados. O baixo pH, resultante deste processo de acidificação do leite, impede o crescimentos de mofos e bactérias contaminantes no produto, evitando a formação de gases e reações de proteólise ou lipólise que venham alterar o sabor e o aroma do alimento (GRANATO, 2007; WENDLING & WESCHENFER, 2013). Estes benefícios podem ser obtidos em outros produtos, como na elaboração de sobremesas em que a base láctea fermentada é utilizada.

Os derivados lácteos correspondem a grande parte dos produtos probióticos presentes no mercado mundial de alimentos funcionais, apresentando uma grande aceitabilidade (SIMEONI et al., 2014; SILVA, 2015). Por serem ingredientes funcionais, os probióticos ao serem adicionados em formulações lácteas, como em leites fermentados, favorecem a presença de bactérias benéficas ao organismo, e em contrapartida, diminuem a concentração de bactérias e micro-organismos indesejáveis (FULLER, 1991).

3.13.2. Sobremesas lácteas

Sobremesas lácteas semi-sólidas são sistemas multicomponentes formuladas com leite, espessantes (amido e/ hidrocolóides), sacarose, aroma, corantes ou polpas de frutas (TARREGA; COSTELL, 2007; SPADA, 2015). Variações nas características dos ingredientes, conteúdo de gordura do leite, tipo e concentração de goma e hidrocolóides, aroma e corante, e as interações cruzadas, produzirão diferenças na composição nutricional e nas propriedades físicas, reológicas, e sensoriais que podem influenciar na aceitabilidade destes produtos pelos consumidores (TÁRREGA, 2005; TARREGA; COSTELL, 2007).

Segundo Spada (2015), polpas de frutas têm sido muito empregadas em sobremesas lácteas, melhorando os aspectos sensoriais (aparência e sabor) e nutricionais da formulação, além de mascarar o sabor de ingredientes inovadores adicionados no seu preparo, como fibras prebióticas (GRANATO et al., 2010; GRANATO et al., 2012) e micro-organismos probióticos (HEENAN et al., 2004).

A sacarose, apesar de atuar como agente espessante e estabilizar a umidade do produto final, quando incorporado às sobremesas lácteas semissólidas não apresenta grande funcionalidade, conferindo basicamente sabor adocicado ao produto, ocorrendo em pequenas proporções e em alguns casos, é substituída por adoçantes artificiais (CERVERA, 2013).

Sobremesas são consumidas em todo o mundo, por pessoas de diferentes faixas etárias, devido às suas características sensoriais como cor, sabor e aroma (ARAGON-ALEGRO et al. 2007; SILVA et al. 2012). Além disso, os ingredientes inovadores e os sistemas tecnológicos aplicados nas fábricas de laticínios têm proporcionado novas alternativas às sobremesas clássicas, permitindo a produção de produtos com novos

sabores, maior digestibilidade e maior valor nutritivo, além de oferecer a oportunidade de explorar a adição de probióticos e prebióticos, para atender a um mercado consumidor em plena expansão (NIKAEDO et al., 2004; VIDIGAL et al. 2012; KOMATSU et al. 2013).

Estudos têm testado a viabilidade de espécies de lactobacilos e bifidobactérias em matrizes alimentícias, particularmente lácteas (leites fermentados, bebidas lácteas, iogurtes, sobremesas e queijos), comprovando eficácia destes alimentos como veículo probiótico, não somente em relação à estabilidade dos micro-organismos, como também em relação às propriedades tecnológicas e sensoriais (VINDEROLA & REINHEIMER, 2000; ARAGON-ALEGRO et al., 2007; BURITI et al., 2007; ALLGEYER et al., 2010; PEREIRA et al., 2010; FORTIN et al., 2011; BURITI et al., 2014; BURITI & SAAD, 2014).

3.14. Textura Instrumental

A textura é um dos fatores mais importantes na escolha dos alimentos e tem sido vista não como um atributo isoladamente. O termo “textura, refere-se a um atributo de parâmetros múltiplos que corresponde à manifestação sensorial e funcional da estrutura, propriedades mecânicas e de superfície dos alimentos, sendo detectada através dos sentidos da visão, audição, tato e cinestésico (SZCZESNIAK, 2002). A percepção da textura é um processo cognitivo derivado de vários *inputs*, podendo ser entendida a partir de medições físicas e fisiológicas que permitem explicar como a estrutura dos alimentos se rompe e é detectada durante o processamento via oral (PASCUA, 2013).

Szczesniak (1963) desenvolveu um importante trabalho sobre a textura dos alimentos, estabelecendo, pela primeira vez, a ligação direta entre as propriedades mecânicas de um alimento e o seu perfil de textura. A Análise do Perfil de Textura

Instrumental (TPA), por ele desenvolvida, ainda é frequentemente referida na literatura como um método padrão para a caracterização deste parâmetro, simulando as condições em que o alimento é submetido ao longo do processo de mastigação (BOURNE, 1978).

Um dos equipamentos muito requeridos quando se deseja mensurar a textura de alimentos é o de Analisador Textura TA.XT *plus* Stable Micro Systems® (Figura 13), desenvolvido especialmente para análise de alimentos (BOURNE, 2002). Por meio de controles eletrônicos precisamente ajustados e um *software* que agrupa os dados e gráficos gerados, este equipamento apresenta resultados muito sensíveis e versáteis (ANZALDÚA-MORALES, 1994).

Figura 13 - Analisador de textura TA.XT *plus*.



Fonte: Autor.

Os métodos instrumentais constituem uma alternativa para a avaliação de textura, fornecendo dados instrumentais que podem estar relacionados com a descrição sensorial,

porém, a correlação entre a percepção de textura sensorial com as propriedades mecânicas fundamentais não é uma tarefa simples, apesar de ser recomendada (LASSOUED et al., 2008).

A aceitação dos produtos lácteos fermentados é fortemente influenciada por sua consistência e viscosidade, essas características definirão a qualidade e identidade desses produtos (LEE, LUCEY, 2010). Neste sentido, parâmetros de textura aplicados em leites fermentados e sobremesas lácteas, são importantes atributos para a caracterização destes produtos e aceitação pelo consumidor. Atributos como firmeza, consistência, coesividade e viscosidade têm sido avaliados visando caracterizar o perfil de textura de formulados lácteos (SACCARO, 2008; BURITI et al., 2014, COSTA et al., 2015; TAVARES ESTEVAM et al., 2016).

3.15. Análise sensorial

Stone & Sidel (2004) definem a análise sensorial dos alimentos como “o método científico usado para evocar, medir, analisar e interpretar as reações a determinadas características dos alimentos tal e qual como são percebidos pelos sentidos da visão, olfato, tato, gosto e audição”.

A análise sensorial apresenta estreita relação com o controle de qualidade dos alimentos, tornando-se uma importante ferramenta na definição de propriedades efetivamente subjetivas, que não podem ser simplesmente medidas por meio de testes analíticos, por serem fundamentais para aceitação e preferência dos produtos pelos consumidores (QUEIROZ; TREPTOW, 2006; FOEGEDING, 2007).

Este método de análise oferece uma série de técnicas com amplas aplicações em pesquisa, estudos de mercado, controle de qualidade e de processos, na formulação e desenvolvimento de novos produtos e nas estratégias de lançamento no mercado, permitindo compreender e avaliar as qualidades sensoriais do produto (MOSKOWITZ, HOWARD ; BECKLEY., 2012). Desta forma, uma aplicação adequada de metodologia sensorial permite obter resultados importantes e confiáveis a respeito do produto desenvolvido (MAGALHÃES et al, 2011).

Os métodos aplicados em análise sensorial podem ser divididos em: discriminativos, descritivos e afetivos. Dentre os métodos descritivos, destaca-se, a Análise Descritiva Quantitativa, e dentre os afetivos está o Teste de Aceitação (PASCUA, 2013).

3.15.1. Teste de Aceitação

O Teste de Aceitação é um valioso e necessário componente de toda a análise sensorial, onde o consumidor é o instrumento de medida e, a partir da correta aplicação, é possível transformar dados subjetivos em objetivos, obtendo informações importantes sobre o grau com que as pessoas gostam ou não de um determinado produto (STONE; SIDEL, 1993).

A escala hedônica híbrida (Apêndices) escala é muito utilizada para testes de aceitação, devido à confiabilidade dos resultados e fácil compreensão da ficha pelos consumidores, permitindo expressar sua aceitação pelo produto, seguindo uma escala previamente estabelecida, variando gradativamente com base nos atributos “gosta” e “desgosta” (0 = desgostei extremamente, 5 = não gostei nem desgostei, 10 = gostei extremamente) (LAWLESS; HEYMANN 2010; VILLANUEVA; DA SILVA 2009).

Devido à grande subjetividade na avaliação sensorial, é de fundamental importância que pelo menos 50 consumidores sejam consultados e que tenham o hábito de consumir o produto, para que os dados possam ser representativos da população avaliada (MOSKOWITZ, HOWARD; BECKLEY., 2012).

REFERÊNCIAS

AGAR. **Britannica Online Academic Edition**. 2015. Disponível em: <<http://academic-ebr Britannica.ez16.periodicos.capes.gov.br/levels/collegiate/article/3986>> Acesso em: 15 jun. 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. 2008. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm>>. Acesso em: 14 jun. 2016.

_____. Resolução nº18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 03 dez. 1999a. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/393821/RESOLU%25C3%2587%25C3%2583O%2BN%25C2%25BA%2B18.pdf/ff96b58a-e4f9-4d53-ba2e-e11a63dcf8f0>>. Acesso em: 29 jul. 2016.

_____. Resolução nº19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 03 mai. 1999b. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388845/RESOLUCAO_19_1999.pdf/99351bc5-99b1-49a8-a1fd-540b4096db22>. Acesso em: 29 jul. 2016.

_____. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 7 jan. 2002.

ALLGEYER, L.C.; MILLER, M.J.; LEE, S.Y. Sensory and microbiological quality of yogurt drinks with prebiotics and probiotics. **Journal of Dairy Science**, v.93, n.10, p.4471–4479, 2010.

ALVARADO, J.D.; AGUILERA, J.M. **Métodos para medir propriedades físicas em indústrias de alimentos**. Zaragoza: Acribia, 2001. 410 p.

ALVEZ, C. C. C. **Comportamento da *E. coli* em queijo Minas Frescal elaborado com a utilização de *L. acidophilus* e acidificação direta com ácido láctico**. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2010.

AMARAL, T. N. **Comportamento reológico e propriedades térmicas da goma da *Pereskiaaculeata* Miller adicionada de solutos e hidrocolóides comerciais e uma aplicação em bebida láctea fermentada**. 2016. 120 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

ANZALDÚA-MORALES, A. **La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica**. Zaragoza: Acribia, 1994. 198p.

AQUARONE, E. et al. **Biotecnologia Industrial**: biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: Edgar Blucher, 2001. 4 v.

ARAGON-ALEGRO, L.C. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, n. 4, p. 669-675, 2007.

ARAÚJO, F. O. de. **Efeitos da radiação UVB no crescimento, conteúdo pigmentar e fotossíntese de *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta)**. 2011. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ARAÚJO, M. et al. Dietary inclusion of IMTA-cultivated *Gracilaria vermiculophylla* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets: Effects on growth, intestinal morphology, tissue pigmentation, and immunological response. **Journal of Applied Phycology**, v.28, n.1, p. 679-689, 2016.

ARAÚJO, P. G. **Ecologia populacional de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) na Área de Proteção Ambiental da Barra do Rio Mamanguape, Paraíba-Brasil**. 2005. 95f. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

ARMISÉN, R. World-wide use and importance of *Gracilaria*. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, p. 231-243, 1995.

AYRES-OSTROCK, L.M. Estudos populacionais em *Gracilaria birdiae* e *G. caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): aspectos fenológicos, fisiológicos e moleculares. 2014. 201 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

BALAKRISHNAN, D.; KANDASAMY, D.; NITHYANAND, P. A review on Antioxidant activity of marine organisms. **International Journal of ChemTech Research**, v.6, n.7, p. ??, 2014.

BALDISSERA, A. C. et al. Alimentos funcionais: uma nova fronteira para o desenvolvimento de bebidas proteicas a base de soro de leite. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1497-1512, 2011.

BALLONGUE, J. Bifidobacteria and probiotic action. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 357-428.

BARBOSA, F. H. F. et al. O gênero *bifidobacterium*: dominância à favor da vida. **Ciência Equatorial**, v. 1, n. 2, p. 15-21, 2012.

BARBOSA, I. C. **Desenvolvimento e caracterização de queijo cremoso caprino com potencial simbiótico**. 2016. 120 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

BEZERRA, A. F.; MARINHO-SORIANO, E. Cultivation of the red seaweed *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) in tropical waters of northeast Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 12, p. 1813-1817, 2010.

BEZERRA, T. K. A. **Estudo da proteólise, lipólise e compostos voláteis em queijo de coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas**. 2015. 112 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. Introdução: As algas do Brasil. In: FORZZA, R.C. (org). et al. INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. 2010. Disponível em: <<http://books.scielo.org/id/z3529/pdf/forzza-9788560035083-06.pdf>>. Acesso em: 4 jan. 2016.

BIXLER, H. J.; PORSE, H. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 321-335. 2011.

BLAIOTTA, G. et al. Effect of chestnut extract and chestnut fiber on viability of potential probiotic *Lactobacillus* strains under gastrointestinal tract conditions. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 161-169, 2013.

BLOUIN, N. A. et al. Porphyra: a marine crop shaped by stress. **Trends in plant science**, v. 16, n. 1, p. 29-37, 2011.

BOCANEGRA, A. et al. Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, p. 236-258, 2009.

BOURNE, M. C. Texture profile analysis. **Food Technology**, v. 32, n. 7, p. 62-72, 1978.

_____. **Food texture and viscosity: concept and Measurement**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2002. 415p.

BOUZON, Z. L. et al. Cytochemical characterization and ultrastructural organization in calluses of the agarophyte *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). **Micron**, v.42, p.80-86, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 out. 2007. p 4-7. Disponível em: <<http://www.jusbrasil.com.br/diarios/741136/pg-4-secao-1-diario-oficial-da-uniao-dou-de-24-10-2007>> Acesso em: 3 jun. 2016.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Informe Técnico nº. 69/2015**. Esclarecimentos sobre a declaração de alegações de conteúdo para aditivos alimentares na rotulagem de alimentos e bebidas. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 9 p. Informe Técnico n. 70, de 19 de janeiro de 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388729/Informe+T%C3%A9cnico+n%C2>>

BA+70,+de+19+de+janeiro+de+2016/a070fe43-0e4e-4581-b3a1-7b1051965575>. Acesso em: 20 mai. 2016.

_____. Ministério da saúde. Agência nacional de vigilância sanitária. Portaria n.º 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 28 out. 1997. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/PORTARIA_540_1997.pdf/3c55fd22-d503-4570-a98b-30e63d85bdad>. Acesso em: 10 jul. 2015.

BRUTON, T. et al. **A review of the potential of marine algae as a source of biofuel in Ireland**. Dublin: Sustainable Energy Ireland, 2009.

BURGAIN, J. et al. *In vitro* interactions between probiotic bacteria and milk proteins probed by atomic force microscopy. **Colloids and Surfaces B Biointerfaces**, v. 104, n. 1, p. 153-162, 2013.

BURITI, F.C.A. et al. Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh-cheeses in comparison with the traditional products. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.57, p.179-185, 2007.

_____. Effects of tropical fruit pulps and partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds on the dietary fibre content, probiotic viability, texture and sensory features of goat dairy beverages. **LWT- Food Science and Technology**, v. 159, n. 1, p. 196-203, 2014.

BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Chilled milk-based desserts as emerging probiotic and prebiotic products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 2, p.139-150, 2014.

BUTEL, M. J. Probiotics, gut microbiota and health. **Médecine et Maladies Infectieuses**, n.44, p.1-8, 2014.

CABRAL, I. S. et al. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante e antimicrobiano. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 29, n. 2, p. 181-192, jul./dez. 2011,

CARDARELLI, H.R. et al. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-suisse cheese. **LWT- Food Science and Technology**, v.41, p.1037-1046, 2008.

CARDOZO, K. H. M. et al. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.146, n.1-2, p.60-78, 2007.

CARNEIRO, C.S. et al. Leites fermentados: histórico, composição, características físico-químicas, tecnologia de processamento e defeitos. **Pubvet**, Londrina, v. 6, n. 27, p.1-37, 2012.

CAVALLI, R. O.; FERREIRA, J. F. O futuro da pesca e da aquicultura marinha no Brasil: a maricultura. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 62, n. 3, p. 38-39, 2010.

CERVERA, S. **Reemplazo de grasa y azúcar en magdalenas: efecto sobre las propiedades reológicas, térmicas, de textura y sensoriales**. Valência: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, 2013.

CHAI, Z. et al. Studies on breeding of *Sargassum vachellianum* on artificial reefs in Gouqi Island, China. **Aquaculture**, v.424, p.189-193, 2014.

COCKBURN, D. W.; KOROPATKIN, N. M. 2016. Polysaccharide Degradation by the Intestinal Microbiota and Its Influence on Human Health and Disease. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n.16, p.1-23, 2016.

CODEX ALIMENTARIUS. **Codex general standard for food additives**. Codex Stan 192-1995. 2014. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net>> Acesso em: 18 jul 2016.

_____. **Codex Stan 193–1995: General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed**. 1995. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.org/download/standards/17/CXS_193e2015.pdf>. Acesso em: 31 mar. 2015.

COLLÉN, P. N. et al. Analysis of expressed sequence tags from the agarophyte *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n.4, p. 641-647, 2011.

COLLET, L.S.F.C. **A influência da adição de caseinato de sódio sobre o escoamento e posterior recuperação estrutural do iogurte batido**. 2005. 105p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, v.8, p.487-490, 1998.

COSTA, E. S. **Algas Gracilarióides (Gracilariaceae, Rhodophyta) na costa brasileira: uma abordagem morfológica e molecular**. 2013. 137 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

_____. The gracilariaceae germplasm bank of the University of São Paulo, Brazil: a DNA barcoding approach. **Journal of Applied Phycology**, v. 14, p. 1643, 2012.

COSTA, G. N. C. et al. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* frente a microrganismos patogênicos “*in vitro*”. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1839-1846, set./out. 2012.

COSTA, M. A. **Avaliação do potencial do extrato da macroalga marinha *Kappaphycus alvarezii* como fertilizante orgânico, para uso via tratamento de semente e pulverização foliar na cultura de soja**. 2015. 69 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2015.

COSTA, M. P. et al. Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) pulp, probiotic, and prebiotic: Influence on color, apparent viscosity, and texture of goat milk yogurts. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 9, p. 5995-6003, 2015.

COSTA, M. S. et al. Evaluating the possible anticoagulant and antioxidant effects of sulfated polysaccharides from tropical seaweed *Caulerpa cupressoides* var. *flabellata* **Journal of Applied Phycology**, v. 24, p. 1159-1167, 2012.

COSTA, V. L.; PLASTINO, E. M. Color inheritance and pigment characterization of red (wild-type), greenish-brown, and green strains of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p.599-605, 2011.

_____. Histórico de vida de espécimes selvagens e variantes cromáticas de *Gracilaria* sp. (Gracilariales, Rhodophyta) in laboratory. **Brazilian Journal of Botany**, v. 24, p.491-500, 2001.

CRAIGIE, J. S. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 371-393, 2011.

DAPPER, T. B. et al. Potencialidades das macroalgas marinhas na agricultura: Revisão. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 7, n. 2, p. 295, 2014.

DE OLIVEIRA, E. C. de et al. Algas e angiospermas marinhas bênticas do litoral brasileiro: diversidade, exploração e conservação. In: Workshop sobre avaliação e ações prioritárias para conservação da biodiversidade das zonas costeira e marinha. **Relatório Técnico**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2002.

DHARGALKAR, V. K.; VERLECAR, X. C. Southern Ocean seaweeds: a resource forexploration in food and drugs. **Aquaculture**, v. 287, n. 1, p. 229-242, 2009.

DIAS, M.L.L.A. **Bebida fermentada simbiótica**: características físico-químicas, sensoriais e viabilidade de *Lactobacillus acidophilus*. 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

DIPLOCK, A. T. et al. Scientific concepts of functional foods in Europe consensus document. **British Journal of Nutrition**, v.81, n. 4, S1-S27, 1999.

EJTAHED, H. S. et al. Effect of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 7, p. 3288-3294, 2011.

EJTAHED, H. S. et al. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. **Nutrition**, v. 28, n. 5, p. 539-543, 2012.

ELLEUCH, M. et al. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. **Food Chemistry**, v.124, n.2, p.411-421, 2011.

EL-SAID, G. F.; EL-SIKAILY, A. Chemical composition of some seaweed from Mediterranean Sea coast, Egypt. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.185, n.7, p. 6089-6099, 2013.

FERREIRA, C. L. L. F. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Rio de Janeiro: Rubio, 2012.

FERREIRA, D. M. O. **Extração de agar de algas vermelhas do género *Gracilaria***. 2015. 91 f. Tese (Doutorado) – Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, Coimbra, 2015.

FERREIRA, L. B. **Diversidade intraespecífica em *Gracilaria domingensis* (*Gracilariales*, *Rhodophyta*): estudos fisiológicos na interpretação do polimorfismo de cor**. 2008. 141 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

FIALHO, F. A. N. et al. **Desenvolvimento de técnicas de cultivo da macroalga *Sargassum filipendula* (Ochrophyta, Fucales) no sul do Brasil**. 2015. 46 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

FIDELIS, G. P. **Otimização da extração de polissacarídeos sulfatados da alga vermelha *Gracilaria birdiae* e análise da atividade anticoagulante e antioxidante**. 2014. 135 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

FIGUEIREDO, M. A. O. et al. benthic marine algae of the coral reefs of Brazil: a literature review. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 2, p. 258-269, 2008.

FLORENCE, A. C. R. **Perfil tecnológico de cepas de bifidobactéria em cultura pura e em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* em leites orgânico e convencional**. 2009. 106 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

FLORÊNCIO, I. M. et al. Estudo da extração de ágar da macroalga *Gracilaria Caudata* J. *Agardh* para utilização em fins alimentícios. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 7, n. 2, p.71-78, 2012.

FLORÊNCIO, I.M. **Estudo de técnicas de absorção industrial da *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira para diversificação produtiva no setor lácteo**. 2012. 123 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2012.

FOEGEDING, E. A. Rheology and sensory texture of biopolymer gels. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 12, p. 242-250, 2007.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Rome: FAO, 2009.

_____. **The state of world fisheries and aquaculture 2010**. Rome: FAO, 2010.

_____. **Yearbook of fishery statistics summary tables**. 2013. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/fi/stat/summary/default.htm>. Acesso em: 19 mai. 2016.

_____. **The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges.** Rome: FAO, 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Working group report on drafting guidelines for the evolution of probiotics in food.** 2002. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>>. Acesso em: 10 mai. 2015.

_____. **Evaluation of health and nutrition properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.** Córdoba: FAO; WHO, 2001. Disponível em: <http://www.ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>. Acesso em: 7 ago. 2016.

FORTIN, M.H. et al. Effect of time of inoculation, starter addition, oxygen level and salting on the viability of probiotic cultures during Cheddar cheese production. **International Dairy Journal**, v.21, p.75-82, 2011.

FREILE-PELEGRIN, Y.; MURANO, E. Agars from three species of *Gracilaria* (*Rhodophyta*) from Yucatán peninsula. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 3, p. 295-302, 2005.

FULLER, R. Probiotics in human medicine. **Gut**, v. 32, n. 4, p. 439-442, 1991.

FUNDAÇÃO BRASIL CIDADÃO PARA EDUCAÇÃO, CULTURA, TECNOLOGIA E MEIO AMBIENTE. **Banco de dados.** Icapuí: FBC, 2012.

GAHRUIE, H. H. et al. Scientific and technical aspects of yogurt fortification: A review. **Food Science and Human Wellness**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2015.

GALIA, W. et al. Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. **International Dairy Journal**, v.19, p.89-95, 2009.

GALLINA, D. A. et al. Caracterização de leites fermentados com e sem adição de probióticos e prebióticos e avaliação da viabilidade de bactérias lácticas e probióticas durante a vida de prateleira. **Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, n. 4, p. 239-244, 2011.

GARCÍA-RUIZ, A. et al. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. **Food Microbiology**, v. 44, p. 220-225, 2014.

GEMECHU T. Review on lactic acid bacteria function in milk fermentation and preservation. **African J Food Sci**, v. 9, n.4, p. 170–175, 2015

GERWICK, W.H.; BRADLEY, S. Lesson from the past charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 12, p. 1631, 2012.

GHADIRYANFAR, M. et al. A review of macroalgae production, with potential applications in biofuels and bioenergy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 54, p. 473-481, 2016.

GNÄDIG, S. et al. Conjugated Linoleic acid (CLA) as a functional ingredient. In: MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. (eds.). *Functional dairy products*. Boca Raton: CRC Press; Cambridge: Woodhead, 2003. p.263-298.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, n. 4-5, p. 139-157, 1999.

GÓMEZ ORDÓÑEZ, E. **Evaluación nutricional y propiedades biológicas de algas marinas comestibles: estudios "in vitro" e "in vivo"**. 2013. 218 f. Tese (Doutorado) – Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2013.

GÓMEZ, I. et al. Photosynthesis of the red alga *Gracilaria chilensis* under natural solar radiation in an estuary in southern Chile. **Aquaculture**, v. 244, n. 1, p. 369-382, 2005.

GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RUPÉREZ, P. Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast. **Food Research International**, v. 43, p.2289-2294, 2010.

_____. Molecular weight distribution of polysaccharides from edible seaweeds by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC). **Talanta**, v. 93, p. 153-159, 2012.

GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E.; RUPÉREZ, P. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1514-1520, 2011.

GONÇALVES, A.A.; EBERLE, I.R. Bactérias bífidas: o impacto na indústria de laticínios. **Leite & Derivados**, v.18, n.114, p.34-41, 2009.

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

GRANATO, D. Leites fermentados: algumas considerações. **Leite & Derivados**, v.16, n.100, p.16-33, 2007.

GRANATO, D. et al. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts and products. **Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 3, p. 292-302, 2010.

_____. Sensory evaluation and physicochemical optimisation of soy-based desserts using response surface methodology. **Food Chemistry**, v.121, n.3, p.899-906, 2010.

GRANATO, D.; MASSON, M. L.; RIBEIRO, J. C. B. Sensory acceptability and physical stability evaluation of a prebiotic soy-based dessert developed with passion fruit juice. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.32, p.119-126, 2012.

GRESSLER, V. et al. Biochemical composition of two red seaweed species grown on the Brazilian coast. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 9, p. 1687-1692, 2011.

_____. Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 585-590, 2010.

GUARATINI, T. **Antioxidantes de macroalgas marinhas**: caracterização química e atividade *in vitro*. 2008. 200 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GUIMARÃES, M.; PLASTINO, E. M.; DESTOMBE, C. Green mutant frequency in natural populations of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. **European Journal of Phycology**, v. 38, n. 2, p. 165-169, 2003.

GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. **Algaebase**. World-wide electronic publication. Galway: National University of Ireland, 2014. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>>. Acesso em: 8 dez. 2015.

HARVEY, W.H. Algae. In: MACKAY, J.T. (Ed.). **Flora hibernica comprising the flowering plants ferns Characeae Musci Hepaticae and algae of ireland arranged according to the natural system with a synopsis of the genera according to the linnaean system**. Dublin, London & Edinburgh: William Curry Jun and Company; Simpkin Marshall and Co; Fraser & Co, 1836.

HEENAN, C. N. et al. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. **LWT - Food Science and Technology**, v.37, n.4, p.461-466. 2004.

HENRY, C.J. Functional foods. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 64, p. 657-659, 2010.

HILL, C. et al. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.11, n.8, p.506, 2014.

HOLDT, S. L.; KRAAN, S. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 543-597, 2011.

HÖRMANNSPERGER, G.; HALLER, D. Molecular crosstalk of probiotic bacteria with the intestinal immunesystem: Clinical relevance in the context of inflammatory bowel disease. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 1, p. 63-73, 2010.

HOSOYA, N. Health claims in Japan. **Japanese Journal of Nutritional Food**, v.1, n,3-4, p.111, 1998.

HOTCHKISS S.;TRIUS A. 2010. Seaweed the new “superfood”? In: GORMLEY R.; HOLM F., editors. Functional foods: Some pointers for success. Belfield, Dublin, Ireland: UCD Institute of Food and Health.253p.

HUERTAS, R. A. P. Bactérias ácido lácticas: papel funcional nos alimentos. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v.8, n.1, p. 93-105, 2010.

IBERAGAR. Agar ou agar-agar, o mais antigo ficocolóide. **Aditivos & Ingredientes**, v. 1, n. 1, p. 31-39, 2010.

JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.

JAY, J.M. **Modern food microbiology**. New York: Chapman & Hall, 1996.

JIAO, G. et al. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine Drugs**, v. 9, n. 2, p. 196-233, 2011.

KADAM, S.U.; PRABHASANKAR, P. Marine foods as functional ingredients in bakery and pasta products. **Food Research International**, v. 43, p.1975-1980, 2010.

KAJIMA, S.; CRUZ, W. M. de S.; ANDRADE, C. F. Utilização e aplicação de ágar-ágar em dietoterapia. **Nutrire**, v. 38, n. Suplemento, p. 260-270, 2013.

KHAN, R. S. et al. Functional food product development—Opportunities and challenges for food manufacturers. **Trends in food science & technology**, v. 30, n. 1, p. 27-37, 2013.

KIM, N. J.; JANG, H. L.; YOON, K. Y. Potato juice fermented with *Lactobacillus casei* as a probiotic functional beverage. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 5, p.1301-1307, 2012.

KOLIDA, S.; GIBSON, G.R. Synbiotics in health and disease. **Annual Review of Food Science and Techonology**, v.2, p.373-393, 2011.

KOMATSU, T. R. et al. Nutrition claims for functional guava mousses produced with Milk fat substitution by inulin and/or whey protein concentrate based on heterogeneous food legislations. **LWT – Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 755-765, 2013.

KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.3, p.329-347, 2008.

LASSOUED, N. et al. Baked product texture: Correlations between instrumental and sensory characterization using Flash Profile. **Journal of Cereal Science**, v. 48, p. 133-143, 2008.

LAWLESS H.T.; HEYMANN H. Sensory evaluation of food: principles and practices, 2nd edn. **Springer**, New York, 2010.

LEE, R.E. **Phycology**. 4 ed. Colorado: Cambridge University Press, 2008.

LEE, S.C.; PROSKY, L.; DEVRIES, J.W. Determination of total, soluble and insoluble dietary fiber in foods. Enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 75, p. 395-416, 1992.

LEE, W. J.; LUCEY, J. Formation and physical properties of yogurt. **Journal of Animal Science**, v. 23, n. 9, p. 1127-1136, 2010.

LEE, W.J.; LUCEY, J.A. Formation and physical properties of yogurt. Asian Australas. **Journal of Animal Science**, Seoul, v.23, n.9, p.1127-1136, 2010.

LEE, Y.K. et al. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, 1999. 211p.

LIMA JÚNIOR, C. A. **Ritmos circadianos em *Gracilaria birdiae* (Rhodophyta): oscilação do desempenho fotossintético e caracterização enzimática da nitrato redutase**. 2013. 91 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

LOLLO, P. C. B. et al. Probiotic yogurt offers higher immune-protection than probiotic whey beverage. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 118-124, 2013.

LORDAN S.; ROSS R.P.; STANTON C. Marine bioactives as functional food ingredients: Potential to reduce the incidence of chronic diseases. **Marine Drugs**, v. 9, p. 1056–100, 2011.

LORENZO, V. P. et al. **Estudo fitoquímico com fins farmacológicos da alga bentônica *Caulerpa racemosa***. 2010. 172 f. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 1-2, p. 1-17, 2001.

LYRA, G. de M. et al. Phylogeny of Gracilariaceae (Rhodophyta): evidence from plastid and mitochondrial nucleotide sequences. **Journal of phycology**, v. 51, n. 2, p. 356-366, 2015.

MACHADO, T. A.D. G. **Propriedades nutricionais, reológicas e sensoriais de iogurte caprino probiótico adicionado de mel de abelha nativa *Melipona scutellaris***. 2015. 88 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

MAGALHÃES, K. T. et al. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 693-702, 2011.

MARAFON, A. P. **Otimização das propriedades reológicas e sensoriais de iogurtes probióticos enriquecidos com proteínas lácteas**. 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado) — Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MCHUGH, D. J. **A guide to seaweed industry**. FAO Fisheries Technical Paper n° 441. Rome: FAO, 2003. 105p.

MILLEDGE, J.J.; NIELSEN, B.V.; BAILEY, D. High-value products from macroalgae: the potential uses of the invasive brown seaweed, *Sargassum muticum*. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v.15, p. 67, 2016.

MOHAMED, S.; HASHIM, S. N.; RAHMAN, A. H. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. **Trends in Food Science & Technology**, v. 23, p. 83-96, 2012.

MONTEAGUDO-MERA, A. et al. *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. **Journal of Functional Foods**, v. 4, p. 531–541, 2012.

MOSKOWITZ, H. R.; BECKLEY, J. H.; RESURRECCION, A.V. A. **Sensory and consumer research in food product design and development**. Ames, Iowa: Blackwell Pub, 2012.

MOUSSAVI M.; ADAMS M.C. An *in vitro* study on bacterial growth interactions and intestinal epithelial cell adhesion characteristics of probiotic combinations. **Curr Microbiol**, v. 60, n.5, p. 327–335, 2010.

NAGAI, T.; YUKIMOTO, T. Preparation and functional properties of beverages made from sea algae. **Food Chemistry**, v. 81, p. 327-332, 2003.

NEUMANN, A.I.C.P.; ABREU, E.S.; TORRES, E.A.F.S. Alimentos saudáveis, alimentos funcionais, fármaco alimentos, nutracêuticos... você já ouviu falar?. **Revista Higiene Alimentar**, v.14, n.71, p. 19-22, 2000.

NEUMANN, P. et al. Alimentos saudáveis, alimentos funcionais, fármaco alimentos, nutracêuticos....você já ouviu falar?. **Higiene Alimentar**, v. 14, p. 19-23, 2002.

NEVES, E. O. et al. **Estudo estrutural, termodinâmico e reológico das gomas gelana e tara em meios aquosos**: efeito da concentração, pH e força iônica. 2015. 142 f. Tese (Doutorado) — Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

NIKAEDO, P. H. L.; AMARAL, F. F.; PENNA, A. L. B. Caracterização tecnológica de sobremesas lácteas achocolatadas cremosas elaboradas com concentrado protéico de soro e misturas de gomas carragena e guar. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 397-404, 2004.

O'FLAHERTY S.; KLAENHAMMER T.R. The role and potential of probiotic bacteria in the gut, and the communication between gut microflora and gut / host. **International Dairy Journal**, v. 20, n.4, p. 262-268, 2010.

OLIVEIRA, E.C.; MIRANDA, G.E.C. Aspectos sociais e econômicos da exploração de algas marinhas no Brasil. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE FICOLOGIA, 4., 1998, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Sociedade Ficológica da América Latina e Caribe Sociedade Brasileira de Ficologia, 1998. p.359-369

O'SULLIVAN, D. J. Primary sources of probiotic cultures. In: **Probiotics in food safety and human health**. Boca Raton: Taylor e Francis, 2006.

OLIVEIRA, C. S. D. **Prospecção de compostos bioativos nas macroalgas *Himanthalia elongata*, *Laminaria ochroleuca* e *Undaria pinnatifida***. 2015. 87 f. Tese (Doutorado) – Universidade de Aveiro, Portugal, 2015.

OLIVEIRA, C.P. **Potencialidade de bactérias lácticas e bifidobactérias na biopreservação de alimentos**. 2004. 120 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2004.

OLIVEIRA, E. C. **Algas Marinhas**: um recurso ainda pouco explorado pelo Brasil. Panorama da Aquicultura 41. 1997. Disponível em: <http://www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/revistas/41/ALGA_S.asp>. Acesso em: 15 jun. 2016.

OLIVEIRA, E. M. G. et al. Technological , physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. **Scientia Agricola**, v. 69, n. 6, p. 370-379, 2012.

OLIVEIRA, M.N. et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, p.1-21, 2002.

ORNELLAS, L. H. **Técnica e dietética, seleção e preparo de alimentos**. 8. ed. São Paulo: Atheneu. São Paulo, 2006. 296p. 296p.

PADILHA, M. **Queijo petit-suisse probiótico e simbiótico**: características tecnológicas e emprego de técnicas dependentes e independentes de cultivo na avaliação da sobrevivência dos probióticos no produto e em ensaios de sobrevivência *in vitro*. 2013. 122 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

PANGESTUTI R.; KIM S.K. An overview of phycocolloids: the principal commercial seaweeds extracts. In: Kim SK, Chojnacka K (eds) **Marine algae extracts: processes, products and applications**. Wiley, Weinheim v.2, p.319–330, 2015.

PANORAMA DA AQUICULTURA. Algas: Ibama dá permissão para a produção. **Panorama da Aquicultura**, v.18, n.108, p. 22-25, 2008.

PASCHOAL, V. **Fitoterapia funcional: dos princípios ativos à prescrição de fitoterápicos – Parte 1**. São Paulo: VP Editora, 2008.

PASCUA, Y.; KOÇ, H. E.A., FOEGEDING, E. Food structure: Roles of mechanical properties and oral processing in determining sensory texture of soft materials. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.18, p. 324-333, 2013.

PATARRA, R.F. **Cultivo de macroalgas... Que futuro?**. 2014. Disponível em: <<http://ptdocz.com/doc/362882/cultivo-de-algas...-que-futuro%3F>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

PEDROSO, R. A. **Avaliação da influência de amido e carragena nas características físico-químicas e sensoriais de presunto cozido de peru**. 2006. 74 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

PENGZHAN, Y. et al. Polysaccharydes from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and preliminary studies on their antihyperlipidemia activity. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, p. 21-27, 2003.

PEREIRA L. **Littoralof Viana do Castelo – ALGAE**. Uses in agriculture, gastronomy and food industry (Bilingue). Viana do Castelo: Câmara Municipal de Viana do Castelo, 2010.

PEREIRA, D. C. et al. Seasonal changes in the pigment composition of natural population of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 4, p. 874-880, 2012.

PEREIRA, H. et al. Polyunsaturated fatty acids of marine macroalgae: potential for nutritional and pharmaceutical applications. **Marine Drugs**, v.10, p.1920-1935, 2012.

PEREIRA, L. **As algas marinhas e respectivas utilidades**. 2010. 19 f. Monografia (Graduação) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010a.

PEREIRA, L. **Extração, caracterização e utilização das carragenanas**. 2010b. Disponível em: <<http://www.cienciaviva.pt/rede/oceanos/1desafio/Artigosintesesobrecarragenanas.pdf>>. Acesso em: 20 mai. 2014.

PEREIRA, L.C.; SOUZA, C.H.B.; BEHRENS, J.H.; SAAD, S.M.I. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium sp.* in co-culture improve sensory acceptance of potentially probiotic petit-suisse cheese. **Acta Alimentaria**, v.39, n.3, p.265-276, 2010.

PEREIRA, T. L. **Reologia aplicada nas indústrias: farmacêutica, alimentícia, cosmética e química**. 2005. Disponível em: <<http://amigonerd.net/trabalho/22894-reologia-aplicada-nas-industrias-farmaceutica>>. Acesso em: 14 jul. 2014.

PEREIRA, V. G.; GÓMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 229-240, abr./jun. 2007.

PERES, J. C. F. et al. Avaliação de atividade antifúngica de extratos de macroalgas marinhas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, p. 294-299, 2012.

PITHVA, S. et al. Potential of probiotic *lactobacillus* strains as food additives. In: EL-SAMRAGY, Y. (ed.). **Food Additive**. [s.l.]: InTech, 2012. p. 175-190.

PLASTINO, E.M. **Diversidade intraespecífica em algas gracilarióides**. 2004. 46 f. Tese (Livre-Docência) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

PLASTINO, E.M.; OLIVEIRA, E.C. *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta), a new species from the tropical South American Atlantic with a terete frond and deep spermatangial conceptacles. **Phycologia**, v.41, p.4, p. 389-396, 2002.

PLASTINO, E.M.; URSI, S.; FUJII M.T. Color inheritance, pigment characterization, and growth of a rare light green strain of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). **Phycological Research**, v. 52, p.45-52, 2004.

PUJA K.; Reddy, C.R.K.; BHAVANATH, J .H. A. Comparative evaluation and selection of a method for lipid and fatty acid extraction from macroalgae. **Analytical Biochemistry**, v.415, p.134–144, 2011.

PURWANDARI U.; SHAH N.P.; VASILJEVIC T. Effects of exopolysaccharide-producing strains of *Streptococcus thermophilus* on technological and rheological properties of set-type yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 17, n.11, p. 1344–1352, 2007.

QUEIROZ, M.I.; TREPTOW, R.O. **Análise sensorial para avaliação da qualidade dos alimentos**. Rio Grande: Editora da FURG, 2006. 266p.

RAMLOV, F.; PLASTINO, E. M.; YOKOYA, N. S. Efeitos do ágar no crescimento de explantes e na formação de calos em morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 607-615, 2009.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; Eichhorn, S. E. **Biologia vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 830pp.

REID, G. et al. New scientific paradigms for proiotics and prebiotics. **Journal Clinical Gastroenterology**, v. 37, n. 2, p. 105-118, 2003.

REVISTA AGROPECUÁRIA CATARINENSE. Brasil conhece seu primeiro censo aquícola. In: **Revista Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.27, n.1, p. 6, mar./jun.2014.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. Instituto Mauá de Tecnologia. São Paulo: Edgard Blucher, 2004. 184 p.

RIBEIRO, M. C. E. et al. Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. **Food Research International**, v. 66, p. 424-431, 2014.

ROBERFROID, M.B. Concepts and strategy of functional food science: the european perspective. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, n.6 (suppl.), p.1660-1664, 2000.

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

ROCHA, F.B. et al. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Brazilian Journal of Farmacognosy**, v. 17, n. 4, p. 631-639, 2007.

ROCHA, H. A. O.; ALVES, L. G.; LEITE, E .L. Aproveitamento integral de algas marinhas (Capítulo 4.10 – p. 454-463). In: GONÇALVES, A. A. (Ed.). **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo, SP: Atheneu, 2011.

ROCHA, H.A.O.; COSTA, L.S.; LEITE, E.L. Structural and biological insights into antitumor seaweed sulfated polysaccharides. In: (Cap 11). **Seaweed: ecology, nutrient composition and medicinal uses**. Nova York: Nova Publishers, 2012.

RUPÉREZ, P.; AHRAZEM, O.; LEAL, J. A. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 840–845, 2002.

RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweeds. **European Food Research and Technology**, v. 212, n.3, p.349-354, 2001.

RUSHDY, A. A.; GOMAA, E. Z. Antimicrobial compounds produced by probiotic *Lactobacillus brevis* isolated from dairy products. **Annals of Microbiology**, v.63, p.81-90, 2013.

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

SAARELA, M. et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v.84, p.197-215, 2000.

SACCARO, D. M. **Efeito da associação de culturas iniciadoras e probióticas na acidificação, textura e viabilidade em leite fermentado**. 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SAHA, D.; BHATTACHARYA, S. Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 47, n. 6, p. 587–597, 2010.

SÁNCHEZ-MUNIZ F.J. et al. Algae and cardiovascular health. In: DOMINGUEZ H., editor. Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals. (Chap.11). Oxford, Woodhead Publishing, p Series in food science, technology and nutrition, v. 256, p. 369-715, 2013.

SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, p.341-347, 1998.

SANTOS, J. P. **Avaliação do teor e análise qualitativa do ágar das espécies *Gelidiella acerosa* (forsskal) *feldmannand G. Hamel* (Gelidiales, Rhodophyta) e *Gracilaria domingensis* (kutzin) *sonder ex dickie* em costões rochosos dos municípios de ilhéus e Uruçuca**. 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2011.

SAXELIN, M. et al. The technology of probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v.10, p.387-392, 1999.

SCHULTZ MOREIRA, A. R. **Derivados cárnicos con algas**: implicaciones sobre el metabolismo lipoproteico, estatus antioxidante y protección hepática. 2014. 296 f. Tese (Doutorado) – Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2014.

SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.894-907, 2000.

SILVA, A. S. et al. Viability of *Lactobacillus casei* in chocolate flan and its survival to simulated gastrointestinal conditions. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, suppl. 2, p. 3163-3170, 2012.

SILVA, I. B. **Diversidade de algas marinhas**. 2010. Disponível em: <http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Diversidade_Algas_Marinhas_Ingrid_Balesteros.pdf>. Acesso em: 5 jun. 2016.

SILVA, L. M. T. A. da. **Efeitos da radiação UV-B em variantes cromáticas de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta)**: crescimento, conteúdo pigmentar, fotossíntese e ultra-estrutura. 2009. 146 f. Tese (Doutorado) –Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SILVA, S. M. C. S; MURA, J. D. P. **Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia**. 2 ed. Cidade: Roca. 2011. 1304p.

SILVA, T. M. S. da. **Comportamento do ácido elágico em bebidas lácteas simbióticas suplementadas com L-triptofano e polpa de frutas vermelhas durante armazenamento refrigerado**. 2015. 57 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SIMEONI, C.P. et al. Microencapsulação de probióticos: inovação tecnológica na indústria de alimentos. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.18, p. 66-75, 2014.

SOUKOULIS, C. et al. Industrial yogurt manufacture: monitoring of fermentation process and improvement of final product quality. **Journal Dairy Science**, v.90, p.2641-2654, 2007.

SPADA, J.C. **Sobremesas à base de soja**: estudo de diferentes variáveis de processo, busca de correlações entre propriedades e análise de interações entre componentes da formulação. 2015. 219 f. Tese (Doutorado) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

STANTON, C. et al. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, p.198-203, 2005.

STONE, H. S.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**. San Diego: Academic Press, 1993. 308p.

_____. **Sensory evaluation practices**. 3. ed. New York: Academic Press, 2004. 408 p.

SUMARMONO, J.; SULISTYOWATI, M.; SOENARTO. Fatty acids profiles of fresh milk, yogurt and concentrated yogurt from peranakan etawah goat milk. **Procedia Food Science**, v. 3, p. 216-222, 2015.

SWAIN, M. R. et al. Fermented fruits and vegetables of Asia: a potential source of probiotics. **Biotechnology Research International**, v. 2014, n. 2014, p.1-19, 2014.

SZCZESNIAK, A. S. Classification of textural characteristics. **Journal of Food Science**, v. 28, n. 4, p. 385-389, 1963.

_____. Texture is a sensory property. **Food Quality and Preference**, v.13, p.215-225, 2002.

TABARSA, M. et al. Chemical compositions of the marine algae *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca* (Chlorophyta) as a potential food source. **Journal Science Food Agriculture**, v. 92, n.12, p. 2500-2506, 2012.

TÁRREGA, A.; COSTELL, E. Colour and consistency of semi-solid desserts: Instrumental and sensory measurements. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 655-661, 2007.

TÁRREGA, A.; DURÁN, L.; COSTELL, E. Rheological characterization of semisolid dairy desserts. Effect of temperature. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 1, p. 133-139, 2005.

TAVARES ESTEVAM A.C. et al. Effect of aqueous extract of the seaweed *Gracilaria domingensis* on the physicochemical, microbiological, and textural features of fermented milks. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 4, p. C874–C880, 2016.

TERADA, R.; INOUE, S.; NISHIHARA, G.N. The effect of light and temperature on the growth and photosynthesis of *Gracilariopsis chorda* (Gracilariales, Rhodophyta) from

geographically separated locations of Japan. **J Journal of Applied Phycology**, v. 25, p. 1863-1872, 2013.

TONON, T. et al. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. **Hytochemistry**, v. 61, p. 15-24, 2011.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, n. 1, p. 225-241, 2014.

URSI, S. **Crescimento in vitro de Gracilaria sp. (Gracilariales, Rhodophyta): análise da diversidade intraespecífica**. 2000. 83 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

URSI, S. et al. Intraspecific variation in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): growth, and agar yield and quality of color strains under aquaculture. **Botanica Marina**, v. 56, p. 241–248, 2013.

URSI, S. et al. Intraspecific variation of photosynthesis, respiration and photoprotective carotenoids in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales: Rhodophyta). **Marine Biology**, v.142, p. 997-1007, 2003.

VALDERRAMA, D. et al. **Social and economic dimensions of carrageenan seaweed farming**. Rome: FAO, 2014.

VALENCIA, M. S 2015. **Desenvolvimento de sobremesa láctea cremosa de chocolate adicionada de fruto oligossacarídeo e *Lactobacillus para casei subsp. para Casei LBC 81***. 2015. 69 f. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

VASCONCELOS, B. M. F.; GONÇALVES, A. A. Macroalgas e seus usos: alternativas para as indústrias brasileiras. **Revista Verde**, v. 8, n. 5, p. 125-140, 2013.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics-From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v.18, n.7, p.714-728, 2008.

VÁSQUEZ, S. M.; SUAREZ, H. Y.; ZAPATA, S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas em la conservación de la carne. **Revista Chilena de Nutrición**, Santiago, v. 36, n. 1, p. 64-71, mar. 2009.

VIDIGAL, M. C. T. R. et al. Concentrado proteico do soro melhora a qualidade sensorial de sobremesa láctea diet. **Ciência Rural**, v. 42, n. 12, p. 2272-2279, 2012.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p.139-145, 2004.

VIEGAS, R. P. **Leites fermentados probióticos produzidos a partir de bactérias ácido-lácticas e adicionados de concentrado protéico de soro lácteo: características físico-**

químicas, microbiológicas e sensoriais. 2008. 70 f. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

VILLANUEVA N.D.M.; DA SILVA M.A.A.P. Comparative performance of the nine-point hedonic, hybrid and self-adjusting scales in the generation of internal preference maps. **Food Qual Prefer**, v.20, n.1, p. 1–12, 2009.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Enumeration of *L. casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v.10, n.4, p.271-275, 2000.

WENDLING, L. K.; WESCHENFER, S. Probióticos e alimentos lácteos fermentados - Uma revisão. **Revista do Instituto Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 68, n. 395, p. 49-57, nov/dez., 2013.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**, v.84, n.1, p.14-21, 2011.

WÜSTENBERG, T. **General overview of food hydrocolloids cellulose and cellulose derivatives in the food industry**: fundamentals and applications. Weinheim: Wiley-VCH VerlagGmbH & Co. KGaA, 2015.

YANG, M.; KIM, M. S. Molecular analyses for identification of the Gracilariaceae (Rhodophyta) from the Asia–Pacific region. **Genes & Genomics**, v. 37, n. 9, p. 775-787, 2015.

YOKOYA, N. S. Bioprospecção e aplicações biotecnológicas das macroalgas marinhas. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 62., 2010, Natal. **Anais...** Natal: SBPC, 2010. Disponível em:

<http://www.sbpcnet.org.br/livro/62ra/mesas_redondas/MR%20Nair%20Sumie%20Yokoya.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2016.

YOSHIMURA, C. Y.; CUNHA, S. R.; OLIVEIRA, E. C. Avaliação da viabilidade de cultivo em campo de *Gracilaria domingensis* (*Gracilariales*, *Rhodophyta*) na Armação do Itapocoroy (Penha, Santa Catarina). In: BRANCO, J. O.; MARENZI, A. W. C. **Bases ecológicas para um desenvolvimento sustentável**: estudos de caso em Penha, SC. Itajaí: Univali, 2006. p. 211-226.

YOW, Y.Y; LIM, P.E; PHANG, S.M. Genetic diversity of *Gracilaria changii* (*Gracilariaceae*, *Rhodophyta*) from west coast, Peninsular Malaysia based on mitochondrial *cox1* gene analysis. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p.219-226, 2011.

4. CAPÍTULO I

Artigo 1

Effect of Aqueous Extract of the Seaweed *Gracilaria domingensis* on the Physicochemical, Microbiological, and Textural Features of Fermented Milks

Submetido em: 20 de novembro de 2015

Aceito em: 05 de Fevereiro de 2016

Publicado em: Março de 2016

Periódico: Journal of Food Science, 81(4), 874-880

Impact Factor JCR 2015: 1.649

Qualis: B₂ para Ciências Biológicas I (Triênio 2010 – 2012)

Effect of Aqueous Extract of the Seaweed *Gracilaria domingensis* on the Physicochemical, Microbiological, and Textural Features of Fermented Milks

Adriana Carneiro Tavares Estevam, Flávia Carolina Alonso Buriti, Tiago Almeida de Oliveira, Elaine Virginia dos Santos Pereira, Eliane Rolim Florentino, and Ana Lúcia Figueiredo Porto

Abstract: The effects of the *Gracilaria domingensis* seaweed aqueous extract in comparison with gelatin on the physicochemical, microbial, and textural characteristics of fermented milks processed with the mixed culture SAB 440 A, composed of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, were investigated. The addition of *G. domingensis* aqueous extract did not affect pH, titratable acidity, and microbial viability of fermented milks when compared with the control (with no texture modifier) and the products with added gelatin. Fermented milk with added the seaweed aqueous extract showed firmness, consistency, cohesiveness, and viscosity index at least 10% higher than those observed for the control product ($P < 0.05$). At 4 h of fermentation, the fermented milks with only *G. domingensis* extract showed a texture comparable to that observed for products containing only gelatin. At 5 h of fermentation, firmness and consistency increased significantly ($P < 0.05$) in products with only seaweed extract added, a behavior not observed in products with the full amount of gelatin, probably due to the differences between the interactions of these ingredients with casein during the development of the gel network throughout the acidification of milk. The *G. domingensis* aqueous extract appears as a promising gelatin alternative to be used as texture modifier in fermented milks and related dairy products.

Keywords: back extrusion test, dairy foods, fermentation, gelatin substitute, gracilariaceae

Practical Application: Despite more artisanal cultivation of *Gracilaria* seaweeds, the economical return is still unsure for some small producers. The use of a *Gracilaria domingensis* aqueous extract for the production of fermented milks would involve a technology adaptable at a small scale.

Introduction

Seaweeds are used throughout the world in a wide range of applications, including their consumption as food, particularly in countries such as Korea, Japan, and China. Seaweeds also can be used for the extraction of phycocolloids, which are natural chemical compounds with gelling properties having scientific and technological applicability. Agars and carrageenans are important phycocolloids, which are obtained by extraction of certain species of red seaweed (Rhodophyceae) belonging to families Gelidiaceae and Gracilariaceae. Compared to gelatin, the main advantage of agar is the capacity to form a consistent gel at ambient temperature,

in a low concentration in water (Norziah and others 2006; Bezerra and Marinho-Soriano 2010; Gómez-Ordóñez and others 2010).

In recent decades, the artisanal cultivation of *Gracilaria* seaweeds has increased in the Brazilian Northeast (Hayashi and others 2014; Ayres-Ostrock and others 2016). *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie appears among the seaweeds used directly as a food or as a source of agar (Yoshimura and others 2006). However, the development of food products using seaweeds by these small producers is still scarce, since they lack information about how to use these raw materials in food processing through an accessible technology. Moreover, a diversification in their economic activity is required to ensure the final destination of these seaweeds, in order to allow the social development of these communities.

Fermented milks are very popular products which can achieve a microbiological and physical-chemical quality when produced, even at a small scale, through the employment of well-controlled hygienic procedures and the use of selected dairy cultures (Holzapfel 2002; Walstra and others 2006). *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* are the starters used in the production of yogurt; however, it is possible to produce fermented milks with no *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, such as those fermented with cultures composed of *Lactobacillus acidophilus*, *bifidobacteria*, and *S. thermophilus*, in order to avoid postacidification and increase product quality (Tamime and others 2005). The use of mixed cultures containing *L. acidophilus* and

MS 20151926 Submitted 11/20/2015, Accepted 2/5/2016. Authors Tavares Estevam and Porto are with Keizo Asami Laboratory of Immunopathology, Federal Univ. of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901, Recife, PE, Brazil. Author Alonso Buriti is with Dept. of Pharmacy, Center of Biological and Health Sciences, State Univ. of Paraíba, R. Juvêncio Arruda, s/n, 58429-600, Campina Grande, PB, Brazil. Author de Oliveira is with Dept. of Statistics, Center of Sciences and Technology, State Univ. of Paraíba, R. Juvêncio Arruda, s/n, 58109-790, Campina Grande, PB, Brazil. Authors Pereira and Florentino are with Dept. of Chemistry, Center of Sciences and Technology, State Univ. of Paraíba, R. Juvêncio Arruda, s/n, 58109-790, Campina Grande, PB, Brazil. Author Porto is with Dept. of Morphology and Animal Physiology, Federal Rural Univ. of Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, 52171-900, Recife, PE, Brazil. Direct enquires to author Porto (E-mail: analuporto@yahoo.com.br).

Table 1—Central composite design used for the production of fermented milks.

Assays	Proportion of each texture modifier in the fermented milks (x_1 ; x_2)	Amounts of each texture modifier (g) in 100 g of fermented milk	
		<i>G. domingensis</i> dried powder (x_1)	Gelatin (x_2)
A1	(-1; -1)	0	0
A2	(1; -1)	0.4	0
A3	(-1; 1)	0	0.4
A4	(1; 1)	0.4	0.4
A5	(0; 0)	0.2	0.2
A6	(0; 0)	0.2	0.2
A7	(0; 0)	0.2	0.2

Bifidobacterium can have a positive influence on the human body, since they are traditional probiotic microorganisms, which can confer health benefits on the host by improving the intestinal microbial balance when administered in adequate amounts (FAO/WHO 2006; Bedani and others 2013).

In view of these opportunities, the development of a fermented milk produced with *G. domingensis* extract and a mixed culture containing *L. acidophilus* and bifidobacteria appears as a strategy of product diversification through the use of seaweed available in the Brazilian Northeastern coast, besides obtaining a food with an improved texture, an important quality attribute in fermented milks (Ciron and others 2011). This study evaluated the influence of aqueous extract of *G. domingensis* seaweed on the physicochemical, microbiological, and instrumental texture features of fermented milks produced with a mixed culture of *B. animalis* subsp. *lactis*, *L. acidophilus*, and *S. thermophilus*, in comparison with a traditional hydrocolloid (gelatin). In order to better evaluate the effects of the seaweed on the texture parameters of fermented milk products, the chemical composition of both *G. domingensis* aqueous extract and dehydrated powder used for the extract preparation was also evaluated.

Materials and Methods

Production of aqueous extract of *G. domingensis* seaweed

Dried *G. domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie seaweed was purchased from Associação de Monitores Integrados da Cooperativa de Pesca, Aquicultura e Agricultura de Baleia (COOPAMAB, Itapipoca, Ceará, Brazil) and milled using a rotor mill type cyclone, model TE-651 (Tecnal, Piracicaba, Brazil). The *G. domingensis* aqueous extract was prepared to facilitate the use of this seaweed as a thickener in formulated milk, in order to increase the viscosity of the final product, avoiding the formation of crystals that would negatively affect the texture (crystals occur with the direct use of dried seaweed powder), and maintaining the homogeneous appearance of the fermented milks.

To obtain the aqueous extract of *G. domingensis*, the proportions of the milled seaweed in 200 mL distilled water were defined according to the experimental design (Table 1). This solution was kept in a water bath at 100 °C for 1 h. The extract obtained in this step was filtered through a cotton net and the final volume was adjusted to 200 mL, which was added to the other ingredients and additional water up to a total volume of 1500 mL. The mean solids content of the milk base mix was 11.8%.

Experimental design and fermented milk production

Seven formulations of fermented milks were produced in assay lots, denoted A1 to A7, using a central composite design, with the

purpose of evaluating the effects of the aqueous extract obtained from *G. domingensis* seaweed (x_1) in comparison with the commercial hydrocolloid gelatin (x_2) during the incubation process of fermented milk production. The different assays produced in this study are shown in Table 1.

For the production of the fermented milks, a lyophilized mixed culture consisting of *B. animalis* subsp. *lactis*, *L. acidophilus*, and *S. thermophilus* (Culture SAB 440 A; Sacco, Cadorago, Italy: 5 UC per packet) was used. Skimmed milk powder (Nestlé, Aracatuba, Brazil: 260 g) was reconstituted in 1.74 L distilled water, heat-treated at 90 °C for 5 min and cooled to 46 °C for the dissolution of 1 packet of lyophilized mixed culture. After homogenization, the dissolved culture was distributed into sterile tubes (10 mL) and frozen at 18 °C. The culture inoculum was prepared using 19.5 g skimmed milk powder reconstituted in 130.5 mL distilled water, heat-treated at 90 °C for 5 min, cooled to 46 °C and immediately added to the frozen dissolved culture (10 mL) for incubation at 37 °C during 4 h.

All the fermented milks were produced in amounts of 1500 mL of final product with skimmed milk powder, aqueous extract of *G. domingensis* and/or commercial powdered gelatin (Royal, São Paulo, Brazil), distilled water, and culture inoculum. The proportions of each ingredient used in fermented milk production are shown in Table 2. For the fermented milk production, the skimmed milk powder was reconstituted with distilled water and incorporated with the aqueous extract of *G. domingensis* and/or with commercial gelatin, heated at 90 °C for 5 min and cooled to 46 °C for the addition of the culture inoculum. After that, products were fermented at 37 °C during 5 h.

Samples were collected before fermentation (0 h) and at 1-h intervals for 5 h to determine, in triplicate, the pH, titratable acidity, microbial viability, and instrumental texture.

Mean composition of *G. domingensis* dried powder and aqueous extract

Moisture, total solids, ash, and protein contents were determined for *G. domingensis* (dried powder and aqueous extract). Moisture and total solids were determined in triplicate by drying 2 g samples at 105 °C. Ash was determined gravimetrically in triplicate by heating the dried samples at 550 °C to constant weight. Analytical procedures for the determination of moisture, total solids, and ash content of samples followed the standard methods of the Instituto Adolfo Lutz (IAL 2008). Protein was estimated by measuring the nitrogen content of triplicate samples by the micro-Kjeldahl method and multiplying by a conversion factor (6.25), according to AOAC official methods 690.52 and 991.20 (AOAC International 2005). Fat content of dried *G. domingensis* samples was obtained for triplicate samples through extraction

Effect of aqueous extract of the seaweed...

Table 2—Ingredients used for the production of fermented milks studied (A1 to A7), according to the experimental design described in Table 1.

Items	Assays						
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
Aqueous extract prepared with 6 g <i>G. domingensis</i> powder (mL)	0	200	0	200	0	0	0
Aqueous extract prepared with 3 g <i>G. domingensis</i> powder (mL)	0	0	0	0	200	200	200
Gelatin (g)	0	0	6.0	6.0	3.0	3.0	3.0
Skimmed milk powder (g)	195	195	195	195	195	195	195
Inoculum (mL)	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5
Total ^a (mL)	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500

^aDistilled water was added in each formulation up to a total volume of 1500 mL.

with petroleum ether, using the Soxhlet device (IAL 2008). Total dietary fiber (TDF) of dried *G. domingensis* samples was determined according to AOAC method 985.29 (AOAC International 2005). Available carbohydrates (total carbohydrates without TDF) were obtained by difference for dried *G. domingensis* in order to achieve 100 % (w/w) of the total composition (FAO 2003).

Physical-chemical and microbiological analysis

The pH values and titratable acidity of *G. domingensis* (dried and aqueous extract) and of fermented milks during the incubation process at 37 °C were determined in triplicate samples, according to the analytical procedure of the Instituto Adolfo Lutz (IAL 2008). The pH of samples was analyzed using a pH meter, model TEC-5 (Tecnal). Titratable acidity was expressed in terms of g/100 g *G. domingensis* (dried and aqueous extract) and in terms of g/100 g fermented milks (expressed as lactic acid).

The microbiological counts of fermented milks during the incubation process at 37 °C (0 h, 2 h, and 5 h) were determined in triplicate through the total plate count for cultivable mesophilic and thermophilic obligate or facultative aerobic bacteria, using Aerobic Plate Count agar - APC (Difco, Becton Dickinson, Sparks, Md., U.S.A.) modified by the addition of 1% (w/v) lactose, after 48 h of incubation at 37 ± 1 °C.

Instrumental texture

Instrumental texture of fermented milks after 3, 4, and 5 h of incubation at 37 °C was determined in triplicate with a TA.XTplus Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Surrey, UK), using the back extrusion test, performed according to the equipment instructions. At each sampling period, fermented milks were distributed into polypropylene flasks (approximately 300 mL) and maintained at 4 °C for 24 h before the analyses, the time necessary to complete texture stabilization. An acrylic compression disc (35 mm diameter) was thrust into a cylindrical container (50 mm diameter × 70 mm height) filled with samples at 4 °C up to a height of 40 mm. The starting distance of the disc was set at 30 mm above the top of the sample surface. The disc penetrated into the sample to a depth of 10 mm at 1 mm/s, and returned at 20 mm/s speed. The parameters measured consisted of firmness, consistency, cohesiveness, and viscosity index, obtained by using the Exponent software version 4.0.6.0 (Stable Micro Systems).

Statistical analysis

The composition of seaweed dried powder and aqueous extract are presented as means ± standard deviations. Means and standard errors are presented for fermented milk data. Differences between fermented milk assays and incubation period were sta-

tistically analyzed using analysis of variance (ANOVA), followed by the *post hoc* Tukey test ($P < 0.05$). Before ANOVA evaluation, data was checked for the normality and homogeneity of variances using the Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively. When this assumption was not verified, the equivalent nonparametric tests were applied. For the pH, titratable acidity, microbial viability, and texture parameters of fermented milks the following model was considered: $y_{ijk} = \mu + A_i + T_j + (AT)_{ijk} + \varepsilon_{ijk}$, where y_{ijk} is the dependent variable, μ is the overall mean, A_i is the assay effect, T_j is the incubation period effect, and ε_{ijk} is the residual random error. Statistical analysis was performed using the SAS (Statistical Analysis Systems) software version 9.4 (SAS Inst. Inc., Cary, N.C., U.S.A.).

Results and Discussion

Physicochemical parameters of *G. domingensis* dried powder and aqueous extract

Table 3 shows the results of pH and physicochemical composition of the dried *G. domingensis* and the seaweed aqueous extract at 0.4%. No titratable acidity and neutral pH values were obtained for seaweed powder and aqueous extract, factors that favor the consumption of *G. domingensis* as food and its use as ingredient in formulated dairy products. The contents of moisture, ash, fat, protein and carbohydrates found in this study for the *G. domingensis* powder was close to the values found in other studies with the genus *Gracilaria* (Marinho-Soriano and others 2006; Batista 2008), including the species *G. domingensis* (Pereira 2009; França Pires and others 2012). Protein was the major component of the total solids obtained in the seaweed aqueous extract, while carbohydrates were the major constituents of the dried seaweed. In this manner, most of the carbohydrates from the seaweed powder are insoluble; they were not present in the aqueous extract, since they were retained in the filtration process. The total dietary fiber content of dried *G. domingensis* used in this study was 63.46 g/100 g, equivalent to 95.8% of the total carbohydrate amount of this seaweed.

Although the amino acid composition and biological activity of proteins of some *Gracilaria* species, including *G. domingensis*, are known, to which high levels of essential amino acids, except methionine and cysteine, were reported (Gressler and others 2010), there is still a lack of information about the functional properties (for example, gelling, stabilizing, and emulsifying capacity) of these proteins in food products. At the same time, seaweeds are a rich and readily renewable source of structural polysaccharides with texture modifying properties in foods, most of which are not digested in the human gastrointestinal tract and can be considered as dietary fiber (Gómez-Ordóñez and others 2010, 2012).

Table 3—Physicochemical parameters and mean composition of *Gracilaria domingensis* dried powder and seaweed aqueous extract at 0.4% (mean $\pm$ standard deviation).

Items	<i>Gracilaria domingensis</i> dried powder	Seaweed aqueous extract produced with 0.4% <i>G. domingensis</i> dried powder
Titrate acidity (g/100 g)	0.00	0.00
pH	7.30 $\pm$ 0.01	7.14 $\pm$ 0.01
Moisture (g/100 g)	12.03 $\pm$ 0.49	96.64 $\pm$ 0.01
Total solids (g/100 g)	88.17 $\pm$ 0.55	3.56 $\pm$ 0.48
Ash (g/100 g)	11.25 $\pm$ 0.60	0.12 $\pm$ 0.07
Protein (g/100 g)	10.06 $\pm$ 0.03	2.09 $\pm$ 0.12
Fat (g/100 g)	0.45 $\pm$ 0.13	N.D. ^a
Carbohydrates (g/100 g) ^b	66.21	N.D.
Total dietary fiber (g/100 g)	63.46	N.D.

^aN.D., not determined.^bObtained by difference according to FAO (2003).

According to Gómez-Ordóñez and others (2010), the dietary fiber content of seaweeds can vary from 33% to 75%, and the soluble fractions can correspond to 50% to 85% of the total dietary fiber content. In this study during the filtration process, insoluble fiber and associated compounds (for example, minerals) were trapped in the mesh, which can explain the lower values of ash in the seaweed aqueous extract. Moreover, it is well known that a considerable amount of structural polysaccharides that predominate in Rhodophyta seaweeds (for example, agar and carrageenan) is water-soluble (Gómez-Ordóñez and others 2010; Mohamed and others 2012). Therefore, soluble carbohydrates were present in the *G. domingensis* aqueous extract obtained in this study, thus contributing together with the proteins present to texture and stability of the fermented milks processed, as it will be discussed later.

Physicochemical and microbiological parameters during the incubation process for fermented milk production

The pH values, titrate acidity, and the microbial population during the incubation process are shown in Table 4.

In general, the addition of the *G. domingensis* aqueous extract and/or gelatin did not affect the acidification pattern of the fermented milks studied. Significant decreases ($P < 0.05$) were successively observed in the pH values between 0 and 5 h of fermentation, except for the A6 assay between 4 and 5 h. Except for A2, the first significant increase in the production of lactic acid was only perceived in the second hour of fermentation ($P < 0.05$). Significant differences were observed between the assays for titrate acidity from the first to the 4th h of fermentation ($P < 0.05$). Despite the pH values close to or lower than 5.0 for all assays from the third hour, this fermentation period were still insufficient to produce a firm curd, completely formed, in all fermented milks. These weak curds were instrumentally observed, since lower values of firmness, consistency, cohesiveness, and viscosity index were obtained in comparison with the data achieved for the subsequent fermentation sampling periods, particularly for the A1 and A5 assays (Table 4). All parameters evaluated in the fermentation process were considered appropriate after 4 h, particularly the titrate acidity values above 0.9 g/100 g in all experiments (Table 4), which are commonly found at the end of fermentation in fermented milks such as yogurt (Ordóñez Pereda and others 2005). At 5 h, no significant difference between assays concerning titrate acidity was observed ($P > 0.05$), and the maximum production of lactic acid was achieved.

A slight, although significant, difference ($P < 0.05$) concerning the microbial populations between the assays was observed

before the fermentation process (0 h) (Table 4). However, this difference cannot be attributed to the different concentrations of *G. domingensis* aqueous extract and/or gelatin used in the fermented milks, since no microbial metabolism is observed in this step. All the significant differences between the assays concerning the microbial viability observed throughout the fermentation process ($P < 0.05$) reflected the variation already observed before the fermentation (Table 4) and, therefore, are not attributable to the presence of the seaweed aqueous extract and/or gelatin. Although the *G. domingensis* aqueous extract did not improve the microbial growth during the fermented milk production, it has been reported that lactic acid bacteria and bifidobacteria were able to metabolize these carbohydrates after reduction of their molar mass. In the study of Wu and others (2007), *Enterococcus faecalis* BCR13076 and *Lactobacillus rhamnosus* BCR14068 were able to metabolize oligosaccharides obtained from the enzymatic hydrolysis of *Gracilaria* sp. polysaccharide extract. However, no significant change ($P > 0.05$) in microbial populations (including lactobacilli/enterococci and bifidobacteria) of controlled batches containing *Gracilaria* sp. oligosaccharides (16.3 to 143.8 kDa) and fecal inoculum was observed in the study of Ramnani and others (2012).

The fermented milks produced in this study met the criteria of the Brazilian legislation and the Codex Alimentarius standard of 7.0 log cfu/mL minimum total microbial viability (Brasil 2007; Codex Alimentarius 2010).

Instrumental texture of fermented milks

Progression of instrumental texture properties of the assays during the fermentation process is shown in Table 5. In general, both *G. domingensis* aqueous extract and gelatin were able to increase the texture values of fermented milks A2 to A7 when compared to control assay A1, with no addition of texture modifier.

From 3 to 5 h of the fermentation, the A2 assay, with only the *G. domingensis* extract added as texture modifier, differed significantly from the control A1 concerning firmness ($P < 0.05$). Except at 4 h, the firmness in A2 was significantly higher than that of A3, with only gelatin added as texture modifier ($P < 0.05$). The firmness in A2 at 3 h and 5 h did not differ significantly from A4, with the full amounts of both *G. domingensis* aqueous extract and gelatin as texture modifiers ($P > 0.05$). In all the products studied, the changes observed for consistency throughout the fermentation process were similar to those observed for firmness (Table 5).

No significant change was observed for cohesiveness of A1, A2, and A4 assays between 3 and 5 h of fermentation ($P > 0.05$). On

Effect of aqueous extract of the seaweed...

Table 4–Physicochemical and microbial parameters during the incubation process at 37 °C for fermented milk production. See Table 1 and 2 for the description of fermented milks A1 to A7.

Parameters	Time (h)	Assays (mean values) ^{a,b}							Standard error
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	
pH	0	6.37 bA	6.23 dA	6.30 dA	6.32 cDA	6.44 aA	6.36 bcA	6.31 dA	0.01
	1	6.19 cB	6.06 cB	6.13 dB	6.12 dB	6.37 aB	6.27 bB	6.12 dB	0.01
	2	5.44 cC	5.35 cC	5.41 cDC	5.38 deC	6.09 aC	5.62 bC	5.39 dC	0.01
	3	4.95 cD	4.94 cD	4.91 cD	4.98 bD	5.04 aD	4.82 dD	4.98 bD	0.01
	4	4.83 bcE	4.87 bE	4.80 cE	4.87 bE	4.79 cE	4.67 dE	4.92 aE	0.01
	5	4.75 aF	4.73 abF	4.70 bcF	4.76 aF	4.66 cDF	4.64 dE	4.77 aF	0.01
Titratable acidity (g/100 g of product expressed as lactic acid)	0	0.237 aD	0.257 aE	0.250 aD	0.243 aE	0.220 aE	0.240 aD	0.243 aE	0.01
	1	0.277 abD	0.327 aD	0.283 abD	0.286 bE	0.233 bE	0.247 bD	0.273 abE	0.01
	2	0.500 bC	0.610 aC	0.500 bC	0.500 bD	0.303 dD	0.427 cC	0.530 bD	0.01
	3	0.907 abB	0.940 aB	0.850 cB	0.747 dC	0.703 dC	0.900 abcB	0.877 bcC	0.01
	4	0.957 bB	0.923 bcB	1.020 aA	0.897 cB	0.920 bcB	1.063 aA	0.937 bcB	0.01
	5	1.040 aA	1.087 aA	1.070 aA	1.033 aA	1.067 aA	1.060 aA	1.073 aA	0.01
Microbial viability (log cfu/mL)	0	7.39 cC	7.60 abC	7.69 aC	7.54 abcC	7.48 bcC	7.48 bcC	7.55 abC	0.03
	2	8.92 cB	9.05 bcB	9.22 aB	9.06 abB	8.81 dB	9.12 abB	8.97 bcB	0.03
	5	9.29 cA	9.43 bcA	9.49 bA	9.43 bcA	9.65 aA	9.56 abA	9.31 cA	0.03

^aa,b,c,d Different lower case letters in a row denote significant differences between the assays for a same sampling period ($P < 0.05$).^bA,B,C,D,E,F Different capital letters in a column denote significant differences between the sampling periods for a same assay ($P < 0.05$).**Table 5**–Instrumental texture measurements of fermented milks during incubation. See Table 1 and 2 for the description of fermented milks A1 to A7.

Parameters	Time (h)	Assays (mean values) ^{a,b}							Standard error
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	
Firmness (mN)	3	102.0 cB	152.8 aB	122.1 bB	162.8 aA	113.7 bC	153.9 aC	120.1 bB	2.16
	4	112.6 cB	152.4 cB	152.1 cA	173.0 bA	157.4 cB	190.8 aB	125.6 dB	2.16
	5	128.3 dA	172.2 bA	150.0 cA	164.5 bA	218.6 aA	222.0 aA	161.7 bcA	2.16
Consistency (mN _g)	3	984.0 bB	1316.8 aB	1066.5 bB	1350.5 aA	1032.2 bC	1329.7 aC	1056.6 bB	16.37
	4	1071.8 dB	1288.6 cB	1268.3 cA	1437.0 bA	1339.7 cB	1562.0 aB	1103.1 dB	16.37
	5	1165.5 dA	1469.4 bA	1291.4 cA	1370.2 cA	1769.4 aA	1776.8 aA	1378.1 cA	16.37
Cohesiveness (mN)	3	47.2 cA	75.7 aA	62.1 bB	71.3 aA	48.3 cC	74.6 aC	58.1 bcB	2.21
	4	52.3 cA	72.0 bA	77.5 abA	79.3 abA	77.9 abB	86.6 aB	59.2 cB	2.21
	5	58.1 cA	79.5 bA	75.7 bA	78.0 bA	99.1 aA	102.7 aA	74.0 bA	2.21
Viscosity index (mN _g)	3	20.0 bA	45.8 aA	35.6 abA	46.3 aA	23.6 abB	43.7 abB	33.6 abA	0.03
	4	25.5 bA	46.2 abA	44.6 abA	69.4 aA	48.2 abB	48.7 abB	45.2 abA	0.03
	5	35.3 dA	56.9 abcdA	48.8 cdA	67.8 abcA	75.3 abA	79.1 aA	54.0 bcdA	0.03

^aa,b,c,d Different lower case letters in a row denote significant differences between the assays for a same sampling period ($P < 0.05$).^bA,B,C Different capital letters in a column denote significant differences between the sampling periods for a same assay ($P < 0.05$).

the other hand, a significant increase was verified for cohesiveness of A3 and A5 to A7 assays between 3 and 5 h ($P < 0.05$). Contrary to what was found for firmness and consistency, no significant difference concerning cohesiveness was verified between A2 and A3 at 5 h, ($P > 0.05$). Likewise, no significant difference between A2 and A4 was seen for cohesiveness during all sampling periods ($P > 0.05$).

Regarding the viscosity index, the A2 assay differed significantly from A1 (control) only at 3 h of fermentation ($P < 0.05$). On the other hand, the A3 assay did not differ significantly from A1 and A2 with respect to the viscosity index in all sampling periods evaluated ($P > 0.05$). Moreover, significant differences between A2 to A7 assays in relation to the viscosity index were not observed ($P > 0.05$), except for A5 and A7 which differed from A3 at 5 h ($P < 0.05$). The viscosity index of fermented milks did not differ significantly between the sampling periods ($P > 0.05$), except for the A5 and A6 assays which showed a significant increase at 5 h of fermentation ($P < 0.05$).

For the A3 assay, processed with the full amount of gelatin, it was verified that formation of gel was complete at 4 h of fermentation since no significant difference for all the texture parameters

evaluated was verified between 4 and 5 h ($P < 0.05$). At 4 h of fermentation, the A3 assay showed a pH of 4.80. According to Ares and others (2007), gelatin interacts with the casein matrix of fermented milks, developing a stronger 3-dimensional network. In the study by Fizzmann and others (1999), the gelatin was responsible for the final formation of the gel in milks at a pH of 5.3. According to those authors, the microstructure of the gel formed at that pH was based on a network of gelatin contained inside the casein micelles. The authors reported that gelatin had the appearance of a network of thin, smooth, compact layers and that the casein micelles can be seen as small granules evenly distributed throughout the network. Similar results were found in this study for the A4 assay, processed with the full amounts of both *G. domingensis* seaweed extract and gelatin, in which the formation of gel was complete at 3 h of fermentation when the product still at a higher pH (4.98), since no significant difference for all the texture parameters evaluated was verified between 3 and 5 h of fermentation ($P < 0.05$).

On the other hand, the A2 assay, processed with the full amount of *G. domingensis* aqueous extract, showed significant increases in firmness and consistency between 4 and 5 h ($P < 0.05$), with

the pH varying from 4.87 to 4.73 within this period. Concerning the behavior of red seaweed carbohydrates in milk products, either agar or carrageenans are able to modify their texture and stability; nonetheless, agar does not show milk specificity and does not interact with the casein micelles to affect the gel network as carrageenans are able to do (Piculell 2006; Stanley 2006; Alexander and others 2008). Since agar is the main polysaccharide found in *Gracilaria* species (Barros and others 2013), it is expected that the gel formation pattern in fermented milk A2 is similar to that found in milk products with added agar. In agar-milk gels the polysaccharide is homogeneously distributed and casein micelles are still free diffusing in the void spaces (Alexander and Dalgleish 2007; Corredig and others 2011). Due to this fact, from 4 to 5 h of fermentation, casein micelles were probably still free to form a firmer curd while the acid production increased up to 5 h in the A2 assay. Similar behavior was also observed in the A5 to A7 assays, processed with half the amounts of seaweed aqueous extract and gelatin.

Conclusions

Regarding the physicochemical composition of *G. domingensis*, the carbohydrates were the major constituents of the dried seaweed, while protein was the main component of total solids in the seaweed aqueous extract. A texture modifier capacity of the *G. domingensis* aqueous extract on fermented milks was verified, probably due to the presence of proteins and also soluble polysaccharides, since agar is the main carbohydrate found in *Gracilaria* species. The titratable acidity, pH, and microbial population profiles during the fermentation period were similar for the control assay and for the fermented milks containing different levels of gelatin and/or seaweed; therefore, the use of these ingredients did not interfere in the fermentation process. The values of the instrumental texture parameters obtained throughout the fermentation process for products containing seaweed aqueous extract were similar or higher to that obtained for the fermented milk containing only gelatin as texture modifier. Therefore, the *G. domingensis* aqueous extract appears to be a promising bulking agent and a gelatin alternative to be used as texture modifier in fermented milks and related dairy products, including those processed in small plant facilities. It is easy to be obtained through accessible technology, allowing a diversification in the economic activity of the artisanal seaweed producers.

Acknowledgments

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support. The authors also thank Federal Univ. of Pernambuco, Federal Univ. of Campina Grande and State Univ. of Paraíba for technical assistance.

Author Contributions

A.C.T. Estevam performed the research, collected the data, interpreted the results, and prepared the manuscript; E.C.A. Buriti assisted in data interpretation and manuscript revision. T.A. Oliveira performed and interpreted the statistical analyses. E.V. dos Santos Pereira helped in the execution of the practical experimental aspect. E.R. Florentino worked as a co-advisor, designing the study and tracking the research progress. A.L.F. Porto worked as an advisor, guiding the research, and also interpreted the results and reviewed the manuscript.

References

- Alexander M, Dalgleish DG. 2007. Diffusing wave spectroscopy of aggregating and gelling systems. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 12:179–86.
- Alexander M, Pika I, Dalgleish DG. 2008. Investigation of particle dynamics in gels involving casein micelles: a diffusing wave spectroscopy and rheology approach. *Food Hydrocol* 22:1124–34.
- AOAC International. 2005. Official methods of analysis of AOAC International. 18th ed. Gaithersburg, Md.: AOAC International.
- Azer G, Gonçalves D, Pérez C, Reolón G, Segura N, Lema P, Gámbaro A. 2007. Influence of gelatin and starch on the instrumental and sensory texture of stirred yogurt. *Int J Dairy Technol* 60:263–9.
- Ayres-Ostrock LM, Mauger S, Platino EM, Oliveira MC, Valero M, Destombe C. 2016. Development and characterization of microsatellite markers in two agarophyte species, *Gracilaria birkiae* and *Gracilaria caudata* (Gracilariaceae, Rhodophyta), using next-generation sequencing. *J Appl Phycol* 28:653–62.
- Batista SIM. 2008. Efeito da substituição da farinha de peixe por farinha de algas *Gracilaria* sp. e *Ulva rigida* no crescimento e nos parâmetros metabólicos da dourada (*Sparus aurata*). [MSc dissertation]. Algarve, Portugal: Universidade do Algarve. 58 p. Available from: <https://capientia.ualg.pt/bitstream/10400.1/319/1/TESE%20SARA%20BATISTA%20Final.pdf>. Accessed 2015 July 7.
- Barros FCN, da Silva DC, Sombra VG, Maciel JS, Freitas JPA, Freitas ALP, de Paula RCM. 2013. Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudata* (Agardh). *Carbohydr Polym* 92:598–603.
- Bedani R, Rossi EA, Saad SMI. 2013. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiol* 34:382–9.
- Bezerra AF, Marinho-Soriano E. 2010. Cultivation of the red seaweed *Gracilaria birkiae* (Gracilariaceae, Rhodophyta) in tropical waters of northeast Brazil. *Biomass Bioenerg* 34:1813–7.
- Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2007. Instrução normativa n. 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados. Diário Oficial da União, 24 October. p 4–7.
- Ciron CIE, Gee VI, Kelly AL, Auty MAE. 2011. Effect of microfluidization of heat-treated milk on rheology and sensory properties of reduced fat yogurt. *Food Hydrocol* 25:1470–6.
- Codex Alimentarius. 2010. Codex standard for fermented milks. CODEX STAN 243–2003. Available from: http://www.codexalimentarius.org/download/standards/400/CXS_243e.pdf. Accessed 2015 July 7.
- Corredig M, Shaufluit N, Kristo E. 2011. Polysaccharide-protein interactions in dairy matrices, control and design of structures. *Food Hydrocol* 25:1833–41.
- FAO. 2003. Food energy: methods of analysis and conversion factors. Report of a technical workshop. FAO Food and Nutrition Paper 77. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO/WHO. 2006. Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and Nutrition Paper 85, Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Fizman SM, Iluch MA, Salvador A. 1999. Effect of addition of gelatin on microstructure of acidic milk gels and yogurt and on their rheological properties. *Int J Dairy J* 9:895–901.
- França Pires VC, Torres MT, Albuquerque AP, Calado CMB, Santos KMA, Florentino ER, Florentino IM, Tejo MC. 2012. Caracterização físico-química da macroalga *Gracilaria domingensis*. Congresso Brasileiro de Química. Available from: <http://www.abq.org.br/cbq/2012/trabalhos/10/1154-13804.html>. Accessed 2015 July 9.
- Gómez-Ordóñez E, Jiménez-Escrig A, Rupérez P. 2010. Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast. *Food Res Int* 43:2289–94.
- Gómez-Ordóñez E, Jiménez-Escrig A, Rupérez P. 2012. Molecular weight distribution of polysaccharides from edible seaweeds by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC). *Talanta* 93:153–9.
- Gressler V, Yokoyama NS, Fujii MT, Colepicolo P, Mancini Filho J, Torres RP, Pinto E. 2010. Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. *Food Chem* 120:585–90.
- Hayashi I, Bulboa C, Kradolfer P, Soriano G, Robledo D. 2014. Cultivation of red seaweeds: a Latin American perspective. *J Appl Phycol* 26:719–27.
- Holzapfel WH. 2002. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int J Food Microbiol* 75:197–212.
- IAL. 2008. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4th ed. São Paulo, Brazil: Instituto Adolfo Lutz. 1020 p.
- Marinho-Soriano E, Moreira WSC, Carneiro MAA. 2006. Some aspects of the growth of *Gracilaria birkiae* (Gracilariaceae, Rhodophyta) in an estuary in northeast Brazil. *Aquacult Int* 14:327–36.
- Mohamed S, Hashim SN, Rahman HA. 2012. Seaweeds: a sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends Food Sci Technol* 23:83–96.
- Norziat MH, Foo SL, Karim AA. 2006. Rheological studies on mixtures of agar (*Gracilaria chungho*) and κ-carrageenan. *Food Hydrocol* 20:204–17.
- Ordóñez Pereda JA, Cambero Rodríguez MI, Fernández Álvarez I, García Sanz MI, de Fernando Minguión GDG, Hoz Perales I, Selgas Cortecero MD. 2005. Tecnología de alimentos. Vol. 2 – Alimentos de origen animal. Porto Alegre, Brazil: Artmed. 279 p.
- Pereira DC. 2009. Variação no conteúdo proteico e pigmentar em variantes cromáticas de *Gracilaria domingensis* nas populações naturais de rio de fogo – RN [MSc dissertation]. Natal, Brazil: Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 79 p. Available from: <http://repositorio.ufrn.br:8080/jspui/bitstream/123456789/12482/1/DinaelzaCP.pdf>. Accessed 2015 July 9.
- Picullell L. 2006. Gelling carrageenans. In: Stephen AM, Phillips GO, Williams PA, editors. Food polysaccharides and their applications. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press. p 239–87.
- Rammani P, Chittarari R, Tuohy K, Grant J, Hotchkiss S, Philp K, Campbell R, Gill C, Rowland I. 2012. In vitro fermentation and prebiotic potential of novel low-molecular-weight polysaccharides derived from agar and alginate seaweeds. *Anaerobe* 18:1–6.
- Stanley NE. 2006. Agars. In: Stephen AM, Phillips GO, Williams PA, editors. Food polysaccharides and their applications. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press. p 217–38.
- Tamime AY, Saeedi M, Sondergaard AK, Mistry VV, Shah NP. 2005. Production and maintenance of viability of probiotic micro-organisms in dairy products. In: Tamime A, editor. Probiotic dairy products. Oxford, United Kingdom: Blackwell. p 39–72.

Effect of aqueous extract of the seaweed . . .

Valente IMP, Gouveia A, Rema P, Matos J, Gomes EF, Pinto IS. 2006. Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 252:85–91.

Walstra P, Wouters JTM, Geurts TJ. 2006. Fermented milks. In: Walstra P, Wouters JTM, Geurts TJ, editors. *Dairy science and technology*. 2nd ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press. p 551–73.

Wu SC, Wang FJ, Pan CL. 2007. Growth and survival of lactic acid bacteria during the fermentation and storage of seaweed oligosaccharides solution. *J Mar Sci Technol* 15:104–14.

Yoshimura CY, Cunha SR, Oliveira EC. 2006. Avaliação da viabilidade de cultivo em campo de *Gracilaria domingensis* (Gracilariaceae, Rhodophyta) na Armação do Itapocoroy (Penha, Santa Catarina). In: Branco JO, Marenzi AWC, editors. *Bases ecológicas para um desenvolvimento sustentável: estudos de caso em Penha, SC, Itajaí, Brazil: Univali*. p 211–26.

CAPÍTULO II

Artigo 2

Aqueous extract of *Gracilaria birdiae* (Plastino & Oliveira) as a texture modifier in fermented milks

Submetido em: 05 de Julho de 2017

Aceito em: 22 de Dezembro de 2017

Disponível online em: 26 de dezembro de 2017.

Publicado em: Abril de 2018

Periódico: LWT - Food Science and Technology, 90(4), 418-423

Impact Factor JCR 2016: 2.329

Qualis: B₁ para Ciências Biológicas I



Aqueous extract of *Gracilaria birdiae* (Plastino & Oliveira) as a texture modifier in fermented milks

Adriana Carneiro Tavares Estevam^a, Flávia Carolina Alonso Buriti^b, Tiago Almeida de Oliveira^c, Elainy Virginia dos Santos Pereira^d, Eliane Rolim Florentino^d, Ana Lúcia Figueiredo Porto^{a,e,*}

^a Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901, Recife, PE, Brazil

^b Departamento de Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, R. Juvêncio Arruda, s/n, 58429-600, Campina Grande, PB, Brazil

^c Departamento de Estatística, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual da Paraíba, R. Juvêncio Arruda, s/n, 58429-600, Campina Grande, PB, Brazil

^d Departamento de Química, Center de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual da Paraíba, R. Juvêncio Arruda, s/n, 58429-600, Campina Grande, PB, Brazil

^e Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, 52171-900, Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Phycocolloids
Fermented dairy products
Gelatin alternative
Instrumental texture
Thickener

ABSTRACT

This study evaluated the physicochemical characteristics of *Gracilaria birdiae* and the effects of aqueous extract of this seaweed on the physicochemical, microbiological and textural features of milk fermented with a mixed culture of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. The seaweed powder contained 68.61 g 100 g⁻¹ dietary fibre and the seaweed aqueous extract was composed of 2.44 g 100 g⁻¹ total solids. The seaweed did not inhibit the growth of cultured microorganisms and all fermented milk assays achieved similar microbial viability and acid production after 5 h at 37 °C. Nonetheless, the microbial viability tended to be above 9 log cfu ml⁻¹ in the assays added to *G. birdiae* even after 2 h of fermentation, with increased acid production at this period compared to the products without seaweed. When the seaweed extract was compared to gelatin as a texture modifier, the effect of *G. birdiae* was higher than the animal hydrocolloid. Moreover, the interaction effect of these two ingredients was about a half that of the seaweed alone. The desirability function showed that similar texture parameters obtained for the final product prepared using gelatin at 0.4 g 100 g⁻¹ would be obtained using only *G. birdiae* at 0.3 g 100 g⁻¹.

1. Introduction

Seaweeds are sources of a range of nutritious compounds such as carotenoids, vitamins, minerals, essential fatty acids, proteins, and dietary fibre (Lordan, Ross, & Stanton, 2011), which explains, in part, their continued consumption as food, not only in Asia, but also in Western countries (Hotchkiss & Trius, 2010). Among these compounds, the soluble dietary fibre fraction of Rhodophyta (red seaweeds) contains sulphated carbohydrates, which have been described as biologically active compounds (Ahmadi, Moghadamtousi, Abubakar, & Zandi, 2015) and are also partially fermentable by colonic microbiota (Cockburn & Koropatkin, 2016). These are high weight polysaccharides referred as phycocolloids (Pangestuti & Kim, 2015). The cultivation of *Gracilaria*, a genus of seaweeds, has been increased considerably in Brazil, with the main focus on the phycocolloid production (Ursi et al., 2013). Phycocolloids are commonly used as texture modifier in food products, particularly dairy applications (Pangestuti & Kim, 2015).

Gelatin, in parallel, an ingredient derived by irreversible hydrolysis

of the ossein proteins (edible proteins from animal bone) and collagen, is one the most frequent texture modifier used in fermented milks due to its property to stabilise and confer a sheen-like appearance to the product. Nonetheless, when gelatin is used as texture modifier alone, the final product may have a jelly-like characteristic, tending to stir out lumpy, which is undesirable (Chandan & O'Rell, 2013). Moreover, the issue of gelatin replacement exists for vegetarian diets (Jaswir et al., 2016). Even between lacto-vegetarians, in which the intake of dairy products is allowed, these consumers tend to avoid foods which come from or contain ingredients derived from animal sources, such as meat, rennet and gelatin (Charles, 2014).

Fermented milks are recognized as an important source of nutrients and minerals with high bioavailability (Roux, Slobodianik, Cano, & Perdigón, 2003). Fermented milk production involves the use of lactic acid bacteria and other selected microorganisms as starter cultures, which are added to milk to produce lactic acid by fermentation of the milk's lactose or other sugars added to the dairy mix, and also to bring desired changes and attributes, including in flavour and texture

* Corresponding author. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, 52171-900, Recife, PE, Brazil.
E-mail address: analuporto@yahoo.com.br (A.L.F. Porto).

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.052>

Received 8 July 2017; Received in revised form 20 December 2017; Accepted 22 December 2017
Available online 26 December 2017

0023-6438/ © 2017 Published by Elsevier Ltd.

McBurn & Koropatkin, 2016; Vedomuthu, 2013). Some cultures used for the production of fermented milks contain *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium*, known by their capability to impart health-promoting properties to the consumers as probiotics (Vedomuthu, 2013; Ikaya, 2014).

In this context, the use of the aqueous extract of *Gracilaria* species as an interesting option as an alternative to gelatin to be incorporated as texture modifier in fermented milks. However, there are concerns in respect to the influence of such seaweed on the microorganisms of lactic culture since antimicrobial properties have been reported for certain *Gracilaria* species (Tüney, Çadirci, Ünal, & Sukatar, 2014; Balasankar & Pushparaj, 2014), which would result in an inhibitory effect on bacterial growth, slow fermentation and production.

The influence of the aqueous extract of *Gracilaria birdiae* (Plastino & Pereira) seaweed, in comparison with gelatin, on the microbial growth, acid production and instrumental texture parameters throughout milk fermentation using a mixed culture composed of *Lactobacillus animalis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus thermophilus* was evaluated in this study. The physicochemical properties of *G. birdiae* dried powder and aqueous extract were also presented in this study.

Material and methods

Production and characterisation of the seaweed aqueous extract

G. birdiae seaweed was purchased in a dried milled powder from Associação de Moradores Integrados da Cooperativa de Pesca, Aquicultura e Cultura de Baleia (COOPAMAB, Itapipoca, Ceará, Brazil). The aqueous extract of this seaweed was prepared, as described in a previous manuscript for *Gracilaria domingensis* (Tavares Estevam et al., 2016), by adding 200 ml of distilled water with the proportions of *G. birdiae* dried powder defined by central composite design used in this study (Table 1). The seaweed solution was maintained in water bath at 100 °C for 1 h. The seaweed extract was filtered using a cotton net and its volume was adjusted to 200 ml. This volume was used with the other ingredients to achieve a total formulation of 1500 ml for fermented milk production.

G. birdiae dried powder and aqueous extract were characterised regarding moisture, total solids and ash content, following the analytical standard procedures of the Instituto Adolfo Lutz (2008). Moisture and total solids were determined in triplicate by drying 2 g samples at 70 °C. Ash was determined gravimetrically in triplicate by heating dried samples at 550 °C up to constant weight. Protein, fat, total dietary fibre and total carbohydrates were also obtained for the *G. birdiae* dried powder. Protein was estimated by measuring the samples nitrogen content in triplicate by using the micro-Kjeldahl method and multiplying by the conversion factor of 6.25, according to the official methods AOAC 690.52 and 991.20 (AOAC International, 2005). The fat

Table 2

Proportions of ingredients used in the fermented milks (assays A1 – A7) according to the central composite design described in Table 1.

Item	Assays						
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
Extract prepared with 6 g <i>G. birdiae</i> (ml)	0	200	0	200	0	0	0
Extract prepared with 3 g <i>G. birdiae</i> (ml)	0	0	0	0	200	200	200
Gelatin (g)	0	0	6.0	6.0	3.0	3.0	3.0
Skimmed milk powder (g)	195	195	195	195	195	195	195
Inoculum (ml)	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5
Total (ml)	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500

content was obtained in triplicate from the ether extractions using the Soxhlet device (Instituto Adolfo Lutz, 2008). Total dietary fibre was determined following the official method AOAC 985.29 (AOAC International, 2005). Total carbohydrates were determined by the sum of the constituents protein, fat, moisture and ash and subtracted by the total weight, according to Food and Agricultural Organization of the United Nations (2003). *G. birdiae* aqueous extract was also analysed regarding the pH using a pH-meter (model TEC-5, Tecnal, Piracicaba, Brazil).

2.2. Experimental design

Fermented milks were produced according to a central composite experimental design totalizing seven assays, denoted A1 to A7 (Table 2), in order to evaluate the effects of the *G. birdiae* aqueous extract (x_1) in comparison with a commercial texture modifier – gelatin (x_2) throughout milk fermentation.

2.3. Production of fermented milks

The production of fermented milks of this study followed the procedures previously described by Tavares Estevam et al. (2016) for the development of fermented milks with *Gracilaria domingensis* seaweed.

The fermented milks were produced using the SAB 440 A lyophilised mixed culture (Sacco, Cadorago, Italy, 5 UC per sachet), composed of *Streptococcus thermophilus*, *L. acidophilus* and *B. animalis* subsp. *lactis*. One sachet of this culture was dissolved in reconstituted skimmed milk (Nestlé, Araçatuba, Brazil, 260 g powder in 1.74 L distilled water) previously heat-treated for 5 min at 90 °C, followed by cooling down to 46 °C. The dissolved culture was distributed in portions of 10 mL into sterile tubes and frozen at –18 °C. This volume of culture was used to prepare the inoculum, using 19.5 g of skimmed milk reconstituted in 130.5 mL distilled water previously heat-treated for 5 min at 90 °C, followed by cooling down to 46 °C, in which the frozen culture was dissolved.

The fermented milks were prepared using skimmed milk powder, *G. birdiae* aqueous extract and/or powdered gelatin (Royal, São Paulo, Brazil), distilled water and culture inoculum, according to the proportions shown in Table 2. The milk powder was reconstituted using the distilled water, added of *G. birdiae* aqueous extract and/or gelatin (except for A1 assay), heated for 5 min at 90 °C, cooled to 46 °C, then added of the culture inoculums and fermented for 5 h at 37 °C, in order to achieve acidity higher than 0.6 g lactic acid g⁻¹, as established in fermented milk standards (Brasil, 2007; Codex Alimentarius, 2010).

2.4. Titratable acidity and microbial analysis

The acid production ($\Delta t-t_0$) in assays A1 to A7 was assessed by titration at 1-h intervals throughout the 5 h incubation at 37 °C and expressed in terms of g 100 g⁻¹ lactic acid (Instituto Adolfo Lutz, 2008). The microbial viability was determined in assays A1 to A7 in

Table 1
Central composite design for the independent variables *G. birdiae* aqueous extract (x_1) and gelatin (x_2) used in the fermented milk assays of this study.

Coded variables		Amounts of each texture modifier (g) in 100 g of fermented milks	
<i>G. birdiae</i> extract (x_1)	Gelatin (x_2)	<i>G. birdiae</i> extract (x_1)	Gelatin (x_2)
–1	–1	0	0
1	–1	0.4	0
–1	1	0	0.4
1	1	0.4	0.4
0	0	0.2	0.2
0	0	0.2	0.2
0	0	0.2	0.2

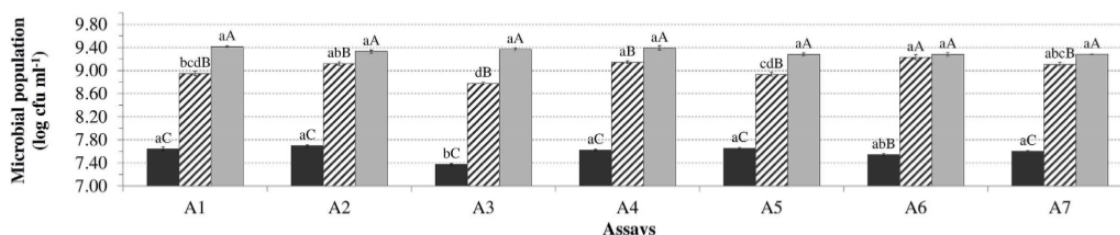


Fig. 1. Microbial population (log cfu ml⁻¹) of assays A1 to A7 before (■) and during incubation process at 37 °C after 2 h (▨) and 5 h (■). Error bars indicate the standard deviations. For the same sampling period, a,b different lowercase letters denote significant differences between the different assays. For a same assay, A, B different capital letters denote significant differences between the different sampling periods.

triplicate before the fermentation (0 h) and at 2 h and 5 h of incubation at 37 °C through the total plate count for cultivable mesophilic and obligate or facultative bacteria, using Aerobic Plate Count agar – APC (Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) modified by the addition of 1% (w v⁻¹) lactose, after 48 h of incubation at 37 ± °C.

2.5. Instrumental texture analysis

The instrumental texture was determined in triplicate for the assays A1 to A7 at 3 h, 4 h and 5 h of fermentation with a texture analyser TA. XTplus (Stable Micro Systems, Surrey, UK), employing the back extrusion test, according to the equipment instructions. At each sampling period, fermented milks were distributed in polypropylene plastic pots with tamper (approximately 300 ml) and maintained under refrigerated conditions at 4 °C for 24 h before the analyses, a necessary period to complete the stabilization of texture. Prior the tests, an acrylic disc (50 mm diameter × 70 mm height) was filled with the samples at 4 °C up to reach 40 mm height. An acrylic disc (35 mm diameter) was positioned at 30 mm above the top of the sample surface, which was thrust onto the sample at a depth of 10 mm at 1 mm s⁻¹ speed, with a return at 20 mm s⁻¹ speed. The measured parameters firmness, consistency, cohesiveness and viscosity index were obtained by means of Exponent software version 4.0.6.0 (Stable Micro Systems).

2.6. Statistical analysis

The results were presented as means ± standard deviations. Data were checked for the normality and homogeneity of variances using the Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively. Differences between fermented milk assays and incubation period were statistically analysed using analysis of variance (ANOVA), followed by the post-hoc Tukey test, with $P < .05$, or the equivalent non-parametric tests for data lacking normality and homogeneity of variances. For the parameters of fermented milks, the following model was considered: $y_{ijk} = \mu + A_i + T_j + (AT)_{ij} + e_{ijk}$, where y_{ijk} is the dependent variable, μ is the overall mean, A_i is the assay effect, T_j is the incubation period effect and e_{ijk} is the residual random error. Statistical analysis was performed using the SAS (Statistical Analysis Systems) software version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

The experimental results of texture for fermented milks after 5 h of incubation at 37 °C were applied to obtain the regression models, as a function of the proportions of texture modifiers ($x_1 = G. birdiae$ extract and $x_2 = \text{gelatin}$) present in the formulations: $\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2$, where $\hat{y}$ is the dependent variable, β_i are the coefficients estimated by the regression model and x_i is the independent variables using the STATISTICA software version 9.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical parameters of *G. birdiae* dried powder and aqueous extract

The total carbohydrates (70.70 g 100 g⁻¹) were the main constituent of *G. birdiae* dried powder, which contained 68.61 g 100 g⁻¹ of dietary fibre (equivalent to 97.04 g 100 g⁻¹ of the total carbohydrates). The moisture content represented 13.42 g 100 g⁻¹ of the seaweed dried powder, similar amount to that verified for *Gracilaria* species (Batista, 2008; Tavares Estevam et al., 2016). The protein and ash contents of *G. birdiae* powder were 11.06 g 100 g⁻¹ and 4.49 g 100 g⁻¹, respectively, also in similar amounts to those verified in other study for *G. birdiae* (França Pires et al., 2012). The fat content (0.33 g 100 g⁻¹) represented the minor constituent of *G. birdiae* seaweed extract, also similar to that verified for *Gracilaria* species, including *G. birdiae* (Florêncio, Florentino, Da Silva, Fernandes, & Cavalcanti, 2012).

Regarding the *G. birdiae* seaweed extract, it showed 2.44 g 100 g⁻¹ of total solids and 0.06 g 100 g⁻¹ of ash. Moreover *G. birdiae* extract showed a neutral pH (6.93 ± 0.03) and did not show titratable acidity (0.00 g 100 g⁻¹), similar results to those found in a previous study of this research group for *G. domingensis* seaweed extract (Tavares Estevam et al., 2016).

3.2. Microbiological and titratable acidity measurements in fermented milks

The microbial population observed during the production of fermented milks is shown in Fig. 1. No inhibitory effect of *G. birdiae* on growth of microorganisms from mixed culture used in the production of the fermented milks was observed. On the contrary, the microbial viability after 2 h of fermentation tended to be slightly higher, above 9 log cfu ml⁻¹, for most of the assays with added *G. birdiae*, although all fermented milks achieved similar values for this parameter after 5 h. A similar trend was also found for the mean titratable acidity increments (Δt-t0) during the incubation process of these fermented milks (Fig. 2). Considering the acidity produced in the beginning of fermentation (0–2 h period), assays with *G. birdiae* aqueous extract showed the highest increment in the titratable acidity, particularly for samples with extract at the highest amount of seaweed powder (assays A2 and A4), which differed significantly from those with no seaweed added, assays A1 (negative control without any texture modifier) and A3 (positive control with gelatin). Specifically, for the assay A4, with the highest amount of both *G. birdiae* and gelatin, the acidity production stabilized after 4 h of fermentation, since it did not differ from values at 5 h ($p > .05$). Nonetheless, an increment of at least 0.7 g 100 g⁻¹ in titratable acidity was verified for all assays after 5 h of fermentation, the period in which a completely formed and stable curd was observed for these products, which was also concurrently to the stabilization of the microbial growth.

This trend of a faster acid production in the beginning of the incubation process for the assays with added *G. birdiae* extract might be

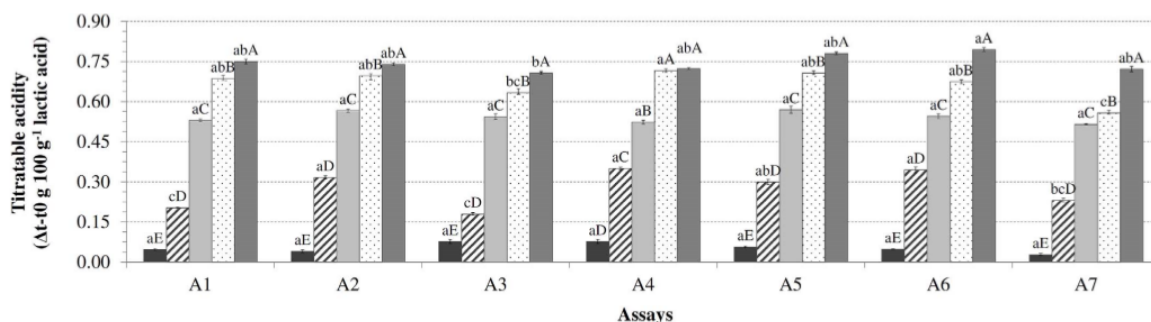


Fig. 2. Acidity production ($\Delta t-t_0$ g 100 g⁻¹) in assays A1 to A7 during incubation process at 37 °C after 1 h (■), 2 h (▨), 3 h (▩), 4 h (▪) and 5 h (▬). Error bars indicate the standard deviations. For the same sampling period, a,b different lowercase letters denote significant differences between the different assays. For a same assay, A, B different capital letters denote significant differences between the different sampling periods.

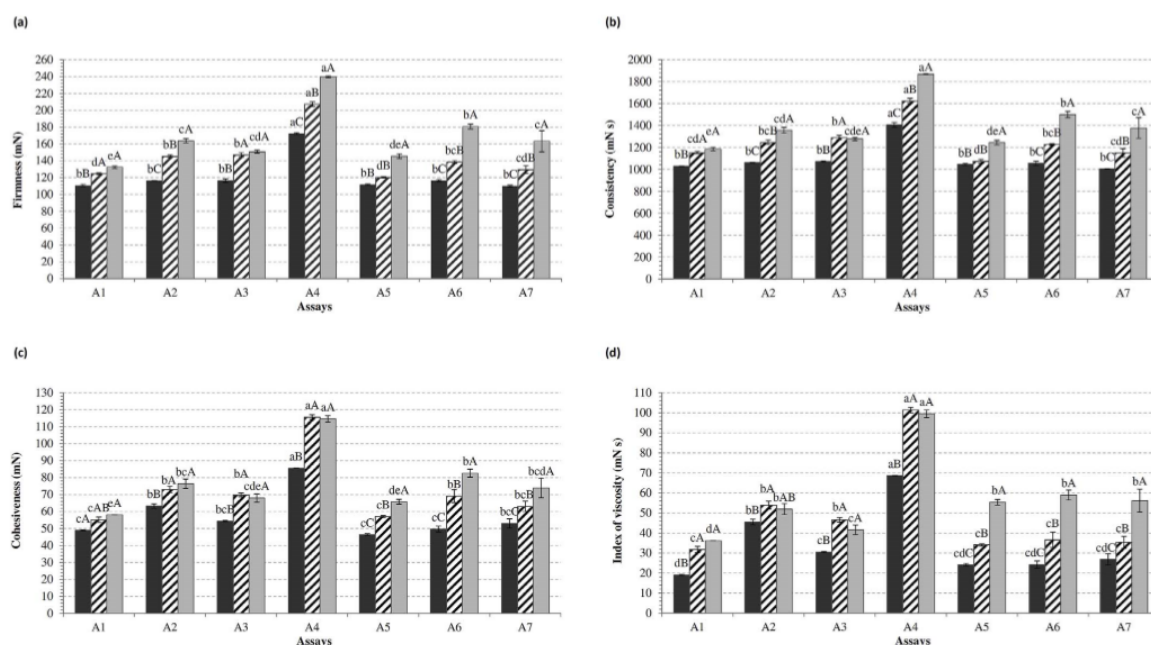


Fig. 3. Instrumental texture parameters firmness (a), consistency (b), cohesiveness (c), and index of viscosity (d) obtained for assays A1 to A7 after 1 h (■), 2 h (▨), 3 h (▩), 4 h (▪) and 5 h (▬) of incubation at 37 °C. Error bars indicate the standard deviations. For the same sampling period, a,b different lowercase letters denote significant differences between the different assays. For a same assay, A, B different capital letters denote significant differences between the different sampling periods.

Table 3

Coefficients (β) with their respective standard-errors [SE] and quality analysis of the model for the texture parameters of fermented milks at 5 h of incubation at 37 °C.

Item	Values			
	Firmness	Consistency	Cohesiveness	Viscosity index
<i>G. birdiae</i> extract (x_1)	30.11 [3.87]	190.58 [28.42]	16.22 [2.09]	18.39 [1.02]
Gelatin (x_2)	23.53 [3.87]	150.98 [28.42]	12.02 [2.09]	13.25 [1.02]
<i>G. birdiae</i> extract $\times$ Gelatin ($x_1 x_2$)	14.39 [3.87]	105.16 [28.42]	7.08 [2.09]	10.53 [1.02]
P (model)	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.001
P (lack of fit)	0.157	0.287	0.106	0.758
Adjusted R ²	0.844	0.807	0.835	0.968

related to this ingredient acting as a source of some carbohydrates that could be metabolized by the microorganisms of the mixed culture used in the production of the fermented milks. Wu, Wang, and Pan (2007) reported that some lactic acid bacteria (*Lactobacilli* and *Enterococci*) were able to grow in the presence of *Gracilaria* sp. oligosaccharides. On the other hand, such a trend was not verified in a previous study of our research group with *Gracilaria domingensis* aqueous extract also used as gelatin alternative in fermented milks, in which the seaweed interfered neither in the microbial viability of lactic culture nor in the acidic production throughout the incubation process (Tavares Estevam et al., 2016). Moreover, the effect of *G. birdiae* on milk acidification in this study probably did not involve all the microorganisms present in the mixed culture used. In a recent study with dairy desserts (Tavares Estevam et al., 2017), only *S. thermophilus* and *B. animalis* from SAB 440 A culture were able to grow after the addition of *G. birdiae* or *G. domingensis* in the products. In that study, however, no significant difference

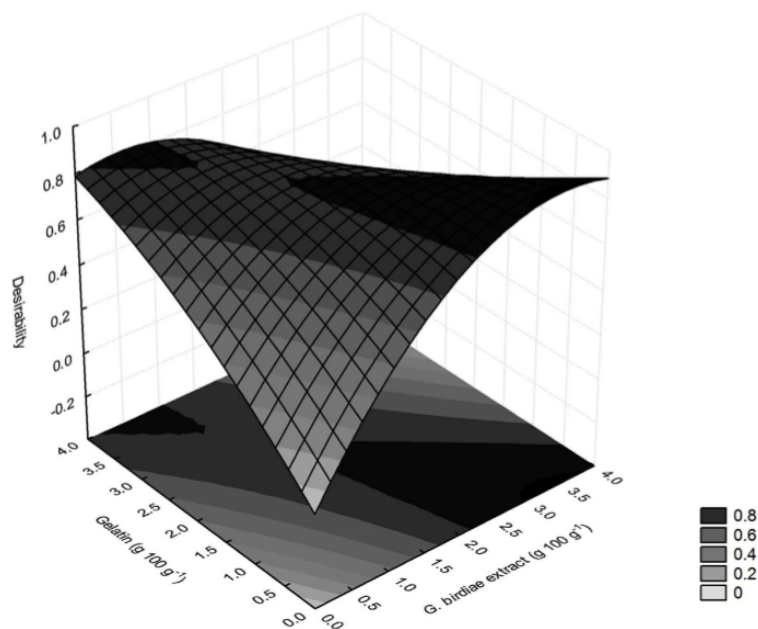


Fig. 4. Contour plot obtained for the desirability response (scale 0–1) of fermented milks' texture as a function of *G. birdiae* aqueous extract ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) and gelatin ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$).

was verified between the populations of a same microorganism, regardless the seaweed used in the products.

3.3. Instrumental texture measurements in fermented milks

The instrumental texture data obtained for the fermented milks studied are shown in Fig. 3. The behaviour of the texture parameters during the fermentation process indicates that the interactions of either the *G. birdiae* extract or gelatin with the milk constituents increased with the time and collaborated with the strengthening of the curd. Assays with either sole *G. birdiae* extract (A2) or gelatin (A3), or the combination of both, showed significantly higher values of firmness, consistency, cohesiveness, and viscosity index after 5 h of incubation when compared to the negative control assay A1, without these ingredients added ($p < .05$). Particularly for the assay A2, this significant increase compared to A1 was already noted for cohesiveness and viscosity index from the 3rd hour of fermentation, and for firmness from the 4th hour ($p < .05$). In fact, phycocolloids from red seaweeds, such as *G. birdiae*, are known by their hydrophilic properties, being able to form high viscous and stable solutions at a large range of pH (Pangestuti & Kim, 2015) and to interact electrostatically with casein micelles in milk (Dalglish & Corredig, 2012).

As found for assay A2, cohesiveness and viscosity index were significantly increased from the 3rd hour of fermentation, and firmness from the 4th hour for the assay with sole gelatin as texture modifier A3 in comparison with A1 ($p < .05$). Moreover, a significantly higher value than A1 was also noted for cohesiveness in A3 from the 4th hour of fermentation. Nonetheless, assay A2 showed significant gains of firmness and consistency at the 5 h of incubation; such gains were suppressed by the addition of only gelatin to fermented milk A3. Similar results were also observed in the previous study of our research group when the effects of *G. domingensis* aqueous extract as texture modifier in fermented milks were compared with those of gelatin (Tavares Estevam et al., 2016). In that study, product with only gelatin was also unable to increase its firmness and consistency between 4 h and 5 h of fermentation, contrarily to the product with only the seaweed extract. The phenomenon observed for the products with only gelatin probably

resulted from the prisoning of casein micelles inside the compact gelatin layer, a characteristic of the casein/gelatin three-dimensional gel networks (Fiszman, Lluch, & Salvador, 1999). On the other hand, the products added of seaweed extract were still able to gain firmness and consistency up to 5 h probably due to the void spaces present in networks of phycocolloids (such as agar) with milk (Alexander & Dalglish, 2007; Corredig, Sharafbafi, & Kristo, 2011). In this case, casein micelles would still be free to complete the curd formation in these spaces up to the end of the fermentation process.

In general, when a sole ingredient or their mixtures at the half of the maximum concentration were used in this study, the strengthening of the curd in comparison with the negative control product were perceived later than the product with both *G. birdiae* extract and gelatin combined at a maximum concentration in the assay A4. For this product, an additive effect of both ingredients was already noted at the 3rd hour of fermentation in which all texture parameters analysed were significantly higher, not only than those observed for A1, but also than all other assay produced ($p < .05$). Moreover, the values observed for all texture parameters of the assay A4 at the 3rd hour of fermentation were already higher than those observed for the assay A3 at the 5th hour, which could imply in an excessively strengthened curd.

Therefore, for the purpose of obtaining a curd with a similar texture than that achieved for the positive control assay A3 after 5 h of fermentation, the regression models of firmness, consistency, cohesiveness and viscosity index at this sampling period were used as responses for the desirability profile. The coefficients and quality analysis of those models are shown in Table 3. The models were significant ($P < .005$) and able to explain more than 80% of the variation observed according with their adjusted R^2 values. Significant lack of fit was not verified ($p > .05$), indicating that the models fit to the experimental data. The most fitted model was obtained by the viscosity index, with the highest adjusted R^2 . For all the texture parameters, the coefficients of the *G. birdiae* extract (x_1) were higher than obtained for gelatin (x_2), showing that the seaweed exerted a slightly higher influence on the texture responses of the fermented milks.

The coefficients of the interaction of *G. birdiae* extract with gelatin ($x_1 x_2$) were positive and about half of that obtained for the seaweed

alone for all texture parameters, reflecting in the higher texture parameter values of the assays in which these ingredients were combined when compared to the negative control assay A1, and also for the additive effect on the texture modifier properties of the assay A4 when compared to A2 and A3. The contour plot generated for the desirability profile of the fermented milks' texture parameters at 5 h of the incubation process is shown in Fig. 4. In a scale of 0–1, a desirability value of 0.955 was obtained considering the addition of only seaweed at a proportion of 0.3 g 100 g⁻¹ *G. birdiae* powder in fermented milks (equivalent to the addition of 200 ml aqueous extract prepared with 4.5 g *G. birdiae* powder in a total formulation of 1500 ml).

4. Conclusions

The *G. birdiae* aqueous extract were able to act as thickening in the fermented milks using the proportions tested. Moreover, the effect of *G. birdiae* on the texture parameters of fermented milks at the end of fermentation process was higher than the effect of gelatin tested at the same concentrations. The addition of *G. birdiae* extract to milk did not exhibited any inhibitory effect on fermentation; on the contrary, the seaweed resulted in a slight stimulation of the growth of the microorganisms from the mixed culture added to milk and the acid production at the beginning of the incubation process, although without resulting in changes on these parameters at the end of fermentation. In general, *G. birdiae* seaweed extract showed to be a potential alternative to gelatin to be used as a texture modifier in fermented milks.

Acknowledgements

The authors thankfully acknowledge the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Project No. 402529/2012-0) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) by the financial support. The authors also acknowledge the Universidade Federal de Pernambuco, Universidade Federal de Campina Grande and Universidade Estadual da Paraíba by the technical assistance.

References

- Ahmadi, A., Moghadamtousi, Z. S., Abubakar, S., & Zandi, K. (2015). Antiviral potential of algae polysaccharides isolated from marine sources: A review. *BioMed Research International*. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/825203>.
- Alexander, M., & Dalgleish, D. G. (2007). Diffusing wave spectroscopy of aggregating and gelling systems. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12, 179–186.
- AOAC International (2005). *Official methods of analysis of AOAC International* (18th ed.). Gaithersburg: AOAC International.
- Balasankar, T., & Pushparaj, A. (2014). Antimicrobial activity of red seaweed *Gracilaria corticata* against human pathogenic bacterial strains. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2, 1901–1904.
- Batista, S. I. M. (2008). *Efeito da substituição da farinha de peixe por farinha de algas Gracilaria sp. e Ulva rigida no crescimento e nos parâmetros metabólicos da dourada (Sparus aurata)*. M.Sc. Dissertation. Algarve, Portugal: Universidade do Algarve.
- Brasil Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2007). Instrução normativa No. 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados. *Diário Oficial da União*, (2005), 4–7 24 Oct.
- Chandan, R. C., & O'Rell, K. (2013). Ingredients for yogurt manufacture. In R. C. Chandan, & A. Kilara (Eds.). *Manufacturing yogurt and fermented milks* (pp. 217–237). (2nd ed.). Chichester: John Wiley & Sons.
- Charles, C. L. (2014). *Comparing vegan and vegetarian attitudes, beliefs and perceptions with risk for disordered eating behaviors*. M.Sc. Thesis. New York, USA: Syracuse University.
- Cockburn, D. W., & Koropatkin, N. M. (2016). Polysaccharide degradation by the intestinal microbiota and its influence on human health and disease. *Journal of Molecular Biology*, 428, 3230–3252.
- Codex Alimentarius (2010). *Codex standard for fermented milks. CODEX STAN 243–2003 (revised and amended)*. www.fao.org/input/download/standards/400/CXS_243e.pdf, Accessed date: 17 November 2011.
- Corredig, M., Sharafbafi, N., & Kristo, E. (2011). Polysaccharide protein interactions in dairy matrices, control and design of structures. *Food Hydrocolloids*, 25, 1833–1841.
- Dalgleish, D. G., & Corredig, M. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 449–467.
- Fiszman, S. M., Lluch, M. A., & Salvador, A. (1999). Effect of addition of gelatin on microstructure of acidic milk gels and yoghurt and on their rheological properties. *International Dairy Journal*, 9, 895–901.
- Florêncio, I. M., Florentino, E. R., Da Silva, F. L. H., Fernandes, V. S., & Cavalcanti, M. T. (2012). Estudo da extração de ágar da macroalga *Gracilaria caudata* J. Agardh para utilização em fins alimentícios. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 7(2), 71–78.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2003). *Food energy: Methods of analysis and conversion factors*. Report of a technical workshop. FAO Food and Nutrition Paper 77. Rome: FAO.
- França Pires, V. C., Torres, M. T., Albuquerque, A. P., Calado, C. M. B., Santos, K. M. A., Florentino, E. R., et al. (2012). *Caracterização físico-química da macroalga Gracilaria birdiae*. Recife, PE, Brazil: Congresso Brasileiro de Química. 14–18 October 2012. Abstract 1154 <http://www.abq.org.br/cbq/2012/trabalhos/10/1154-13804.html>.
- Hotchkiss, S., & Trius, A. (2010). Seaweed the new “superfood”? In R. Gormley, & F. Holm (Eds.). *Functional foods: Some pointers for success*. Dublin: UCD Institute of Food and Health.
- Instituto Adolfo Lutz (2008). *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos* (4th ed.). São Paulo: IAL.
- Jaswir, I., Alotaibi, A., Jamal, P., Octavianti, F., Lestari, W., Hendri, R., et al. (2016). Optimization of extraction process of plant-based gelatin replacer. *International Food Research Journal*, 23, 2519–2524.
- Lordan, S., Ross, R. P., & Stanton, C. (2011). Marine bioactives as functional food ingredients: Potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Marine Drugs*, 9, 1056–1100.
- Pangestuti, R., & Kim, S. K. (2015). An overview of phycocolloids: The principal commercial seaweeds extracts. In S. K. Kim, & K. Chojnacka (Eds.). *Marine algae extracts: Processes, products and applications* (pp. 319–330). Weinheim: Wiley.
- Roux, M. E., Slobodianik, N. H., Cano, P. G., & Perdigón, G. (2003). Mucosal immune system and malnutrition. In R. Fuller, & G. Perdigón (Eds.). *Gut flora, nutrition, immunity and health* (pp. 155–177). Oxford: Blackwell.
- Tavares Estevam, A. C., Alonso Buriti, F. C., De Oliveira, T. A., Pereira, E. V. S., Florentino, E. R., & Porto, A. L. F. (2016). Effect of aqueous extract of the seaweed *Gracilaria domingensis* on the physicochemical, microbiological, and textural features of fermented milks. *Journal of Food Science*, 81, C874–C880.
- Tavares Estevam, A. C., de Almeida, M. C., de Oliveira, T. A., Florentino, E. R., Alonso Buriti, F. C., & Porto, A. L. F. (2017). Comparison of dairy desserts produced with a potentially probiotic mixed culture and dispersions obtained from *Gracilaria birdiae* and *Gracilaria domingensis* seaweeds used as thickening agents. *Food & Function*, 8, 3075–3082.
- Tüney, I., Çadirci, B. H., Ünal, D., & Sukatar, A. T. (2006). Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (Izmir, Turkey). *Turkish Journal of Biology*, 30, 171–175.
- Ursi, S., Costa, V. L., Hayashi, I., Pereira, R. T. L., Paula, E. J., & Plastino, E. M. (2013). Intraspecific variation in *Gracilaria birdiae* (Gracilariaceae, Rhodophyta): growth, and agar yield and quality of color strains under aquaculture. *Botanica Marina*, 56, 241–248.
- Vedamuthu, E. R. (2013). Starter cultures for yogurt and fermented milks. In R. C. Chandan, & A. Kilara (Eds.). *Manufacturing yogurt and fermented milks* (pp. 115–148). (2nd ed.). Chichester: John Wiley & Sons.
- Wu, S. C., Wang, F. J., & Pan, C. L. (2007). Growth and survival of lactic acid bacteria during the fermentation and storage of seaweed oligosaccharides solution. *Journal of Marine Science and Technology*, 15, 104–114.
- Yerlikaya, O. (2014). Starter cultures used in probiotic dairy product preparation and popular probiotic dairy drinks. *Food Science and Technology*, 34, 221–229.

5. CAPÍTULO III

Artigo 3

Comparison of dairy desserts produced with a potentially probiotic mixed culture and dispersions obtained from *Gracilaria birdiae* and *Gracilaria domingensis* seaweeds used as thickening agents

Submetido em: 26 de Maio de 2017.

Aceito em: 27 de Junho de 2017

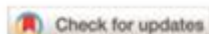
Publicado em: Setembro de 2017

Periódico: Food & Function, 2017, 8, 3075 - 3082

Impact Factor: 3.247

Qualis: B₁ para Ciências Biológicas I

PAPER

Cite this: *Food Funct.*, 2017, **8**, 3075

Comparison of dairy desserts produced with a potentially probiotic mixed culture and dispersions obtained from *Gracilaria birdiae* and *Gracilaria domingensis* seaweeds used as thickening agents

Adriana Carneiro Tavares Estevam,^a Michele Correia de Almeida,^b
Tiago Almeida de Oliveira,^b Eliane Rolim Florentino,^b
Flávia Carolina Alonso Buriti^c and Ana Lúcia Figueiredo Porto^{a,d}

Dairy desserts have emerged as interesting options for the incorporation of probiotics, bioactive ingredients and alternative sources of thickeners. This shows an opportunity to investigate the use of *Gracilaria* seaweeds in the formulation of potentially probiotic dairy desserts. This study aimed to compare the effects of dispersions obtained from *Gracilaria domingensis* and *Gracilaria birdiae* used as thickening agents on texture properties of dairy desserts fermented with SAB 440-A, composed of the starter *Streptococcus thermophilus* and the potential probiotics *Bifidobacterium animalis* and *Lactobacillus acidophilus*, and also to study their physicochemical characteristics, microbial viability and sensory acceptability. No significant differences between desserts with *G. birdiae* or *G. domingensis* dispersions regarding total solids, ash and fat content, as well as pH, titratable acidity, the viability of the microorganisms of the mixed culture and sensory acceptability were verified ($P > 0.05$). Nonetheless, the dessert with *G. domingensis* dispersion showed higher dietary fibre content and significantly increased firmness than the one produced with *G. birdiae* ($P < 0.05$). Moreover, *B. animalis* was able to maintain higher populations, above $7 \log \text{cfu g}^{-1}$ during 21 days of storage of desserts, in the presence of either *G. birdiae* or *G. domingensis* dispersions, despite the fact that *L. acidophilus* has shown low viability in the final products. Therefore, the *G. domingensis* dispersion is suitable to be used as a thickening agent to produce dairy desserts with enhanced firmness and good sensory acceptability, it being also advisable to use only *B. animalis* as a probiotic for this product.

Received 26th May 2017,
Accepted 27th June 2017
DOI: 10.1039/c7fo00776k

rsc.li/food-function

Introduction

Currently, seaweeds are being used with multiple purposes in food, cosmetic and pharmaceutical industries. Most seaweeds are natural sources of dietary fibre and phycocolloids, such as alginate, carrageenan and agar, with the ability to act as emul-

sifiers, stabilizers and thickeners.¹ Additionally, seaweeds have been seen with great potential as supplements for functional food production since they have shown relevant biological or pharmacological properties as antioxidants, anti-inflammatories, and antivirals, among others.¹

A rich algal biodiversity is distributed along the Brazilian coast, being of economic and social importance for the local communities. The artisanal cultivation of some *Gracilaria* species has been emerging in Brazil, including the species *Gracilaria birdiae* and *Gracilaria domingensis*.² However, the development of food products using seaweeds by these small producers is still scarce and a diversification in their economic activity is required to ensure the final destination of the cultivated seaweed, as well as the social development of these communities.³ Concurrently, these *Gracilaria* species have also attracted the interest of the scientific community due to

^aKeizo Asami Laboratory of Immunopathology, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

E-mail: analuportof@yahoo.com.br; Fax: +55 81 21268485; Tel: +55 81 33206391

^bCenter of Sciences and Technology, State University of Paraíba, R. Juvêncio Arruda, s/n, 58109-790 Campina Grande, PB, Brazil

^cCenter of Biological and Health Sciences, State University of Paraíba, R. Juvêncio Arruda, s/n, 58429-600 Campina Grande, PB, Brazil

^dDepartment of Morphology and Animal Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, 52171-900 Recife, PE, Brazil

the bioactive potential reported for their polysaccharide fraction, including antioxidant,^{4,5} anticoagulant,⁵ gastrointestinal-protective⁶ and antitumor⁷ effects. Therefore, there is a strong opportunity to explore the use of these seaweeds in food products whose technology is adaptable at a small scale.³

Dairy desserts, traditionally made using ingredients that are able to interact with milk proteins for contributing to the products' texture and stability, have emerged as interesting options for the incorporation of probiotics.⁸ The major bacteria used as probiotic cultures in the development of functional foods are *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*⁸ since they provide physiological benefits to the consumer and are generally resistant to gastric acid and bile.⁹ Milk based desserts have the advantage of being stored at low temperatures, which makes them less exposed to abusive temperatures, allowing probiotics to have higher viability at the time of consumption. Besides, desserts are consumed by people of all ages and they are composed of milk proteins, fat and lactose as well as other compounds that are required for bacterial growth.^{8,9}

Along with probiotics, several other microorganisms are known for their significance for food production. Lactic acid bacteria (LAB), working as starters, have been extensively employed in food fermentation, including the production of milk products.^{9,10} Among these LAB, some *Streptococcus thermophilus* strains are useful in the production of fermented milks with increased firmness, maintaining proper viscosity and consistency during cold storage.¹¹

The use of dispersions of *Gracilaria* species (*G. domingensis* and *G. birdiae*) harvested in the Brazilian Northeast coast with a mixed culture containing the starter *S. thermophilus* and probiotic microorganisms may contribute to consumers' health, by delivering beneficial bacteria, and also may add texture and firmness stability throughout the product's cold storage. Nonetheless, there are some concerns regarding the survival of the probiotics and sensorial acceptance in fermented dairy desserts containing *Gracilaria* dispersions, mainly due to some species being reported to show antimicrobial properties^{12,13} and marine off flavour.¹⁴

This study aimed to compare the influence of dispersions from *G. domingensis* and *G. birdiae* used as thickening agents on the texture profile of dairy desserts fermented with a mixed culture composed of the starter *Streptococcus thermophilus*, plus the probiotics *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and *Lactobacillus acidophilus*, with guava as the flavouring. Moreover, the physicochemical characteristics, probiotic viability, and sensory properties of these products were also evaluated.

Materials and methods

Production of dispersions from *G. birdiae* and *G. domingensis* seaweeds

G. birdiae and *G. domingensis* seaweed were purchased from Associação de Moradores Integrados da Cooperativa de Pesca, Aquicultura e Agricultura de Baleia (COOPAMAB, Itapipoca,

Ceará, Brazil). *G. birdiae* was purchased as a dried milled powder. *G. domingensis* was purchased in a dried form and was further milled using a cyclone type rotor mill model TE-651 (Tecnal, Piracicaba, Brazil), as described in a previous manuscript.³ The milled seaweeds were used to facilitate the obtention of the dispersions to be used as texture modifiers in fermented dairy desserts, avoiding the formation of crystals that would negatively affect the texture and maintaining the homogeneous appearance of the final product.³

The dispersions of *G. birdiae* and *G. domingensis* were prepared separately using 17.5 g of each milled seaweed in 700 ml distilled water. The suspensions containing the powdered seaweeds were kept at 90 °C in a water bath for 1 h. These suspensions were filtered through a cotton net and the final weight of each dispersion was adjusted to 700 g with distilled water. The dispersions of *G. birdiae* and *G. domingensis* were heated at 90 °C for 10 min, cooled and kept at 50 °C to be used in the dairy dessert formulations.

Production of the fermented milk base

A lyophilized mixed culture, constituted of the starter microorganism *Streptococcus thermophilus* and the potentially probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and *Lactobacillus acidophilus* (SAB 440-A, Sacco, Cadorago, Italy), was used for preparing the fermented milk base added to the dairy desserts.

The mixed culture SAB 440-A was dissolved in 2 L of reconstituted milk powder (Nestlé, Araçatuba, Brazil) in distilled water, 13 g per 100 ml, and heated at 90 °C for 5 min and cooled to 46 °C. After the complete dissolution, the dissolved culture was distributed into sterile flasks and frozen at -18 °C until use for preparing the fermented milk base.

For the production of 500 g of fermented milk base, 67 g of skimmed milk powder (Molico, Nestlé) was reconstituted using 363 g of distilled water. The reconstituted milk was heated at 90 °C for 5 min and cooled to 50 °C for the addition of 70 g of the mixed culture previously dissolved in reconstituted milk. The milk base was fermented at 37 °C for 4 h. At the end of the fermentation process, the milk base was divided into two portions for addition in the two trials of dairy dessert with seaweed dispersions, one with *G. birdiae* and the other with *G. domingensis*.

Production of dairy desserts

For use in the dairy desserts studied, frozen guava pulp (Agroindustrial Frutnaã Ltda., Recife, Brazil, 806 g), sucrose (Estrela, Biosev, Arès, Brazil, 387 g) and skimmed milk powder (Molico, Nestlé, 258 g) were mixed and heated at 90 °C for 10 min and cooled to 50 °C. This mix was divided into two portions of 675 g each for incorporating 225 g of the fermented milk base and 600 g of the dispersions of *G. birdiae* or *G. domingensis*, totaling 1500 g of the final product for each trial. Each trial of dairy dessert of each batch (ca. 100 g) was packaged into appropriate polypropylene plastic pots with caps for food products (45 mm height, 65 mm diameter, 145 ml total volume, Plasom, Orleans, Brazil) and stored under refrigeration at 4 °C for 21 days.

Mean composition of fermented dairy desserts

The mean composition was determined on the first day of storage for *G. birdiae* and *G. domingensis* dairy desserts. Moisture, total solids and ash were analyzed in sextuplicate for each batch of each trial, according to the analytical methods of the Instituto Adolfo Lutz.¹¹ The moisture and total solids content were determined by drying 2 g samples at 105 °C. Ash was determined by heating the dried samples at 550 °C to constant weight. The protein content was estimated by measuring the nitrogen content of 0.2 g samples of each batch and trial, in octuplicate, through the microKjeldahl method and multiplying by the conversion factor of 6.38.¹⁶ Fat was determined in quadruplicate for each batch of each trial according to Folch and co-workers.¹⁷ Total dietary fibre (TDF) of the fermented dairy desserts was determined in a pool prepared with three batches for each dessert according to the AOAC 985.29 method.¹⁶ Available carbohydrate content (carbohydrate excluding TDF) and total carbohydrates (including TDF) were obtained by difference in order to achieve 100 g per 100 g of their total composition.¹⁸

Physicochemical analysis

The pH values and titratable acidity were determined in triplicate throughout the storage of the fermented dairy desserts for the three batches of each trial, after 1, 7, 14 and 21 days. The pH values of the samples were measured with a pH meter (Tecnal model TEC 5, Piracicaba, Brazil). Titratable acidity was determined according to the appropriate standard methods¹⁵ and expressed in terms of g lactic acid per 100 g.

Textural measurement

Instrumental texture of fermented dairy desserts was evaluated after 1, 7, 14 and 21 days of storage for each batch, in duplicate, with a TA.XT Plus Texture Analyser (Stable Micro Systems, Surrey, UK). A compression test was performed on 100 g samples in the individual plastic pots, at 4 °C, by a 35 mm diameter acrylic disc. The disc penetrated into the sample to a depth of 10 mm, at a 1 mm s⁻¹ speed, and returned at 20 mm s⁻¹ speed. The parameters measured consisted of firmness and adhesiveness, obtained by using the Exponent software version 4.0.6.0 (Stable Micro Systems).

Microbiological analysis

The viability of *S. thermophilus*, *B. animalis* and *L. acidophilus* was evaluated in the dairy desserts throughout the storage after 1, 7, 14 and 21 days. The milk base used in the production of dairy desserts was also sampled at the beginning (0 h) and at the end of fermentation process (ca. 4 h). With this purpose, 25 g portions of each sample were collected aseptically and blended with 225 ml of saline solution (0.85 g per 100 g) and submitted to serial dilutions with the same diluent.

Populations of *S. thermophilus* were determined by pour plating 1 ml of each dilution in M17 agar (Difco, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) with added α -lactose monohydrate (Vetec, Sigma-Aldrich, Rio de Janeiro,

Brazil, 5 g L⁻¹), followed by incubation at 37 °C, for 48 h.¹⁹ Populations of *B. animalis* were determined by pour plating 1 ml of each dilution in modified DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS) agar (Difco, Sparks, MD, USA), prepared as a basal medium, to which dicloxacillin (Sigma, St Louis, MO, USA), L-cysteine hydrochloride monohydrate (Merck, Darmstadt, Germany) and lithium chloride (Vetec, Sigma-Aldrich, Rio de Janeiro, Brazil) sterile solutions were added to reach a concentration of 0.5 mg L⁻¹, 0.5 g L⁻¹ and 1 g L⁻¹, respectively, followed by anaerobic incubation (anaerobiosis generator Anaerobac, Probac, São Paulo, Brazil) at 37 °C for 72 h.¹⁹ Populations of *L. acidophilus* were determined by pour plating 1 ml of each dilution in MRS agar (Difco) acidified to pH 5.4 with acetic acid, followed by incubation at 37 °C for 72 h.²⁰

Sensory evaluation

The sensory evaluation of the present study was approved by the State University of Paraíba Ethics Research Committee – Campina Grande, Paraíba State, Brazil (Certificate of Appreciation Presented to Ethics – CAAE no. 31582714.9.0000.5187) and was carried out at the Laboratory of Sensory Analysis of Federal University of Campina Grande, Center of Technology and Natural Resources. The dairy desserts were evaluated after 7 days of refrigerated storage (4 °C) through acceptability tests, using the hybrid hedonic scale (0 = disliked extremely, 5 = neither liked nor disliked, 10 = liked extremely),²¹ focusing on attributes of flavour, consistency, appearance and colour, and also on the overall acceptability. On the sampling day, 60 consumers (untrained volunteers) were recruited, based on interest in dairy desserts and dairy product consumption habits. The samples, maintained under refrigeration prior to the tests, were in agreement with the Brazilian regulatory standards regarding sanitary quality,²² since coliforms at 35 °C and 45 °C, coagulase positive *Staphylococcus*, *Bacillus cereus* and *Salmonella* spp. were not detected. Both dessert trials were served at the same time, in a balanced random presentation, in individual disposable plastic dessert cups codified with three random digits. Undergraduate and graduate students, professors, and also staff members of the university participated in the sensory analysis. From the 60 volunteers recruited for the sensory evaluations, 21 were males and 39 were females. Most of the volunteers (98.3%) were under 37 years old. These volunteers gave informed consent to participate in this study prior to the sensory analysis sections.

Statistical analysis

The results for dispersions of *G. birdiae* and *G. domingensis* seaweed were subjected to the unpaired Student's *t* test or Mann-Whitney *U* test, with *P* < 0.05, using the STATISTICA v.8.0 software (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Statistical analysis of the data obtained on dairy desserts was performed using the SAS (Statistical Analysis Systems) software version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The results obtained from replicates were expressed as means $\pm$ standard deviation (SD). Prior to the statistical comparisons, data were checked

for the normality and homogeneity of variances using Shapiro-Wilk and graphical analyses, respectively. When these assumptions were not verified, the Box-Cox transformation was applied. The Friedman test was used to analyse differences between desserts regarding their mean composition data, with $P < 0.05$. For the comparisons of data obtained during storage, differences between the dessert trials and the sampling periods were statistically analysed using repeated measures analysis of variance, followed by the *post hoc* Tukey test, with $P < 0.05$.

Results and discussion

Mean composition of dairy desserts

The mean composition of the dairy desserts is shown in Table 1. Moisture, total solids, ash and fat did not differ significantly between desserts processed with *G. birdiae* and *G. domingensis* ($P > 0.05$). On the other hand, the protein content was slightly higher, although significant, for desserts containing *G. birdiae* ($P < 0.05$), whose dispersion had the highest yield of solid extraction. In fact, a protein content slightly higher for *G. birdiae* seaweed dried powder, 11.06 ± 0.03 g per 100 g (unpublished data), was verified in preliminary studies when compared to *G. domingensis*, 10.06 ± 0.03 g per 100 g, as reported previously.³ Inversely, the total dietary fibre content obtained for dessert with *G. domingensis* added tended to be twice higher than that obtained for dessert with *G. birdiae*. The dietary fibre content in different species of *Gracilaria* were reported to vary from 20 to 60 g per 100 g (in dry matter),^{3,23,24} which could explain the differences between the dessert formulations regarding this nutrient. Concurrently, since the dietary fibre content in guava fruit (dry matter) can be higher than 50 g per 100 g (as reported by Ramírez and Pacheco de Delahaye²⁵) it is also important to consider the contribution of the addition of guava pulp to the overall content of dietary fibre of these desserts. Moreover, slightly reduced total and available carbohydrates were also verified for *G. domingensis* dessert.

Table 1 Mean composition of guava dairy desserts produced with SAB 440-A culture and dispersions of *G. birdiae* and *G. domingensis*

Parameters	Trial	
	<i>Gracilaria birdiae</i>	<i>Gracilaria domingensis</i>
Moisture (g per 100 g)	75.31 $\pm$ 0.15	75.28 $\pm$ 0.25
Total solids (g per 100 g)	24.69 $\pm$ 0.15	24.72 $\pm$ 0.26
Ash (g per 100 g)	1.27 $\pm$ 0.05	1.30 $\pm$ 0.08
Fat (g per 100 g)	0.256 $\pm$ 0.46	0.443 $\pm$ 0.26
Protein (g per 100 g)	4.87 $\pm$ 0.55 ^A	4.50 $\pm$ 0.61 ^B
Total dietary fibre (g per 100 g)	1.14	2.23
Total carbohydrates (g per 100 g)	17.16	16.25
Available carbohydrates (g per 100 g)	16.02	14.02

^{A,B} Within a row, values followed by a different superscript capital letter differ significantly between the trials ($P < 0.05$).

Physicochemical and textural parameters

The pH, titratable acidity and the instrumental texture parameters of firmness and adhesiveness obtained for the dairy desserts are shown in Table 2. There was no significant difference between desserts produced with *G. birdiae* and *G. domingensis* regarding the pH and titratable acidity throughout the storage ($P > 0.05$). Moreover, the pH and acidity values were maintained constant for the two desserts, without significant differences between the sampling periods ($P > 0.05$). Despite the fermentation of part of the milk base used for the production of the dairy desserts, it corresponded to only 15% (w/w) of the total product. The values of pH and titratable acidity obtained in this study were comparable to those obtained for probiotic non-fermented dairy desserts, as those found in the study of Aragon-Alegro and co-workers²⁶ with mousses with *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 82 added with or without the prebiotic inulin. In that study, the authors verified that the mean pH and titratable acidity ranged from 6.26 to 5.37 and from 0.016 to 0.026 ml per 100 g, respectively, during 28 days of storage.

In relation to the instrumental texture, *G. birdiae* dispersion resulted in firmness values significantly lower than desserts with *G. domingensis*. These values for desserts with *G. birdiae* were 4 fold lower at the first day of storage and 7 fold lower after 21 days. During the production of the dispersions, it was verified that gel formation occurred quickly for the ones with *G. birdiae* (data not shown). However, the *G. domingensis* dispersion resulted in a higher firmness to the products, which increased with the time period. There was a significant effect of the storage time on the firmness values for desserts with *G. domingensis* dispersion ($P < 0.05$). According to the adjusted regression model obtained for desserts with *G. domingensis* ($\hat{y} = 5351.99 + 100.07t$, where $\hat{y}$ is the estimation of firmness in mN and t is the time of storage in days), there was an increment of 100.07 mN for each day of storage of this product. Despite the more fluid texture, the firmness values of desserts with *G. birdiae* dispersion remained stable during the entire storage period, without significant differences ($P > 0.05$). In the case of adhesiveness, the effects of both trial and storage time were significant ($P < 0.05$). The adhesiveness values for desserts with *G. birdiae* dispersion were significantly higher than those with *G. domingensis* in the first day of storage. Moreover, this parameter reduced significantly for the two desserts by the 7th day. Nonetheless, the adhesiveness values remained constant from the second week up to the end of storage, without significant differences between the trials and the sampling periods ($P > 0.05$). It is important to emphasize that syneresis was not verified for the two desserts during the whole storage period (data not shown).

It is possible that the differences in the firmness of dessert trials is related to the gelling polysaccharides and also to the variations in the polysaccharide fractions of *G. birdiae* and *G. domingensis*, with a possible association with the proportion of 3,6-anhydrogalactopyranoside.

Table 2 Physicochemical and instrumental texture parameters (means $\pm$ SD) of guava dairy desserts produced with SAB 440-A culture and dispersions of *G. birdiae* and *G. domingensis*

Trial	Time (days)	Parameter			
		pH	Titrateable acidity (g lactic acid per 100 g)	Firmness (mN)	Adhesiveness (mN s)
<i>G. birdiae</i>	1	5.74 $\pm$ 0.07	0.041 $\pm$ 0.001	1240.06 $\pm$ 316.6 ^A	428.80 $\pm$ 69.8 ^{ab}
	7	5.66 $\pm$ 0.09	0.042 $\pm$ 0.002	1106.93 $\pm$ 212.3 ^A	318.74 $\pm$ 25.2 ^{ab}
	14	5.58 $\pm$ 0.13	0.042 $\pm$ 0.002	1140.78 $\pm$ 328.5 ^A	290.35 $\pm$ 17.3 ^{ab}
	21	5.49 $\pm$ 0.14	0.045 $\pm$ 0.002	1037.02 $\pm$ 144.3 ^A	297.97 $\pm$ 25.1 ^{ab}
<i>G. domingensis</i>	1	5.72 $\pm$ 0.05	0.040 $\pm$ 0.003	5090.83 $\pm$ 139.1 ^{ab}	354.73 $\pm$ 20.8 ^A
	7	5.64 $\pm$ 0.13	0.041 $\pm$ 0.002	6679.49 $\pm$ 378.1 ^{ab}	307.86 $\pm$ 29.9 ^A
	14	5.57 $\pm$ 0.13	0.042 $\pm$ 0.002	6531.21 $\pm$ 518.7 ^{ab}	283.20 $\pm$ 34.1 ^A
	21	5.49 $\pm$ 0.16	0.041 $\pm$ 0.003	7409.68 $\pm$ 588.4 ^{ab}	279.02 $\pm$ 27.2 ^A

^{ab}Within a column, for the same trial, values followed by a different superscript lowercase letter differ significantly between sampling days ($P < 0.05$). ^{AB}Within a column, for the same day, values followed by a different superscript capital letter differ significantly between the trials ($P < 0.05$).

According to Souza and co-workers,⁴ the 3,6-anhydrogalactopyranoside content in *Gracilaria* agars is an important component in the control of gel textural quality. To obtain the soluble polysaccharides of *G. birdiae* extracted with hot water, they found galactopyranoside (65.4%), 3,6-anhydrogalactopyranoside (25.1%), 6-O-methylgalactopyranoside (9.2%), and a sulfate content of 8.4%. In the study of Guimarães and co-workers,²⁷ the main constituent of *G. domingensis* water-soluble polysaccharides were galactopyranoside (20.6–36.6%), 3,6-anhydrogalactopyranoside (38.1–44.0%), 6-O-methylgalactopyranoside (12.4–20.4%), glucopyranoside (4.2–20.0%), and a sulfate proportion of 12.4–17.8%. Therefore, a higher proportion of 3,6-anhydrogalactopyranoside in *G. domingensis*, as reported by Guimarães and co-workers,²⁷ might imply higher values of firmness, as observed in this study.

Microbiological parameters

During the production of the fermented milk base used for the production of dairy desserts, the populations of the starter *S. thermophilus* varied from 7.05 log cfu g⁻¹ to 7.76 log cfu g⁻¹ between the beginning and the end of the fermentation process. Within the same periods, the viability of the potential probiotics *L. acidophilus* and *B. animalis* increased from 6.08

log cfu g⁻¹ to 6.84 log cfu g⁻¹ and from 6.71 log cfu g⁻¹ to 7.77 log cfu g⁻¹, respectively.

Populations of *S. thermophilus*, *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* for desserts with dispersions of *G. birdiae* and *G. domingensis* during 21 days of storage are shown in Table 3. Regarding *S. thermophilus* and *B. animalis* throughout the processing of the dairy desserts, a slight increase in the viability of these microorganisms was observed in the final product at the first day of storage compared to the values obtained from the milk base. On the other hand, the survival of *L. acidophilus* reduced in the final product, reaching values lower than 6 log cfu g⁻¹ on the 1st day of storage. Nonetheless, the viability of *S. thermophilus*, *L. acidophilus* and *B. animalis* remained stable during the whole storage period, without significant differences either between the dairy desserts with *G. birdiae* and *G. domingensis* dispersions or between the sampling days ($P > 0.05$), showing that both seaweeds did not influence the viability of the microorganisms in the dairy desserts. Particularly for the starter *S. thermophilus* and the potential probiotic *B. animalis*, their populations in desserts during the storage were around 8 log cfu g⁻¹ and 7.5 log cfu g⁻¹, respectively.

To provide health benefits, the suggested concentration for probiotic bacteria is, at least, 6 log cfu ml⁻¹ or g⁻¹ of a product

Table 3 Populations of *S. thermophilus*, *B. animalis* and *L. acidophilus* (means $\pm$ SD) of guava dairy desserts produced with SAB 440-A culture and dispersions of *G. birdiae* and *G. domingensis*

Trial	Parameter	Time (days)			
		1	7	14	21
<i>G. birdiae</i>	<i>S. thermophilus</i> (log cfu g ⁻¹)	8.09 $\pm$ 1.95	8.56 $\pm$ 2.18	8.33 $\pm$ 1.65	8.11 $\pm$ 1.45
	<i>B. animalis</i> (log cfu g ⁻¹)	7.89 $\pm$ 2.41	7.57 $\pm$ 2.41	7.39 $\pm$ 2.09	7.51 $\pm$ 1.73
	<i>L. acidophilus</i> (log cfu g ⁻¹)	5.95 $\pm$ 0.70	5.72 $\pm$ 0.99	5.94 $\pm$ 0.75	6.12 $\pm$ 0.63
<i>G. domingensis</i>	<i>S. thermophilus</i> (log cfu g ⁻¹)	8.44 $\pm$ 2.52	8.42 $\pm$ 2.18	8.26 $\pm$ 1.54	7.79 $\pm$ 1.54
	<i>B. animalis</i> (log cfu g ⁻¹)	7.34 $\pm$ 2.64	7.63 $\pm$ 2.41	7.86 $\pm$ 2.41	7.32 $\pm$ 1.87
	<i>L. acidophilus</i> (log cfu g ⁻¹)	5.93 $\pm$ 0.75	5.74 $\pm$ 0.81	5.85 $\pm$ 0.63	5.81 $\pm$ 0.60

Values did not differ significantly either between sampling days or between the trials ($P > 0.05$).

during its shelf life.^{10,36,38} As verified in this study, only *B. animalis* was able to survive in the desserts studied above the viability recommended in order to result in a probiotic effect. Due to these reasons, the development of foods with adequate doses of probiotics at the time of consumption has been considered a challenge, because several factors during processing and storage affect the viability of these microorganisms.^{9,10}

Similar to the results found for desserts with seaweed dispersions of this study, that were also added with guava pulp, previous studies with dairy products with fruit pulps or juices added also reported a low viability of *L. acidophilus*.^{29–30} Considering those same fruits added to dairy products, a higher viability was reached when other probiotic lactobacilli or bifidobacteria species were used,^{19,30} similar to that which was observed in this study for *B. animalis*.

Generally, the incorporation of fruit pulps in dairy products can result in a decrease of the viability of some probiotic species due to the reduction of the pH by its organic acid composition or due to the presence of components with inhibitory action on microorganisms.^{8,38} In the same way, since the population of *L. acidophilus* in both desserts with *Gracilaria* dispersion added was not maintained the same in the period between the end of the fermentation process and the first day of storage (contrary to that observed for *S. thermophilus* and *B. animalis*), a possible inhibitory effect of the seaweeds on the lactobacilli studied cannot be discarded. According to Tüney and co-workers,¹³ some *Gracilaria* species can produce prostaglandin and C20 compounds with potential antimicrobial effect. Despite it being reported for other *Gracilaria* species (e.g. *G. gracilis* and *G. corticata*), other lactic acid bacteria (e.g. *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus pneumoniae*) were inhibited by the solvent extracts of these seaweeds.^{13,33} Due to these reasons, it is recommended to plan carefully the probiotic cultures, fruits and other ingredients to be added simultaneously to probiotic food because the survival of some probiotic microorganisms can be negatively affected by these components.²⁸ On the other hand, the maintenance of the food pH between 5.5 and 6.5 can maintain the viability of most of the probiotics.¹⁰ In this study, it is probably the maintenance of the pH between 5.49 and 5.74 that helped with the survival of the probiotic *B. animalis*. Due to the low survival of *L. acidophilus* from mixed culture in the desserts of this study, it is suggested to inoculate *L. acidophilus* and *B. animalis* separately, using a high initial concentration for the first microorganism, or even to use only *B. animalis* as a probiotic for this product.

Sensory evaluation

The results of the sensory evaluation are shown in Table 4. The scores for desserts with *G. domingensis* dispersion, which showed the highest firmness values in the instrumental texture analysis, were, in general, slightly increased (particularly flavour, consistency and overall acceptability) compared to desserts added with *G. birdiae* dispersion, even with no significant differences between them ($P > 0.05$). The lowest scores, below 7 for the two trials, were obtained by flavour. The

Table 4 Acceptability scores (means $\pm$ SD) of guava dairy desserts produced with SAB 440-A culture and dispersions of *G. birdiae* and *G. domingensis*

Sensory attribute	Trial	
	<i>G. birdiae</i>	<i>G. domingensis</i>
Flavour	6.22 $\pm$ 2.28	6.55 $\pm$ 1.77
Consistency	6.81 $\pm$ 2.22	7.03 $\pm$ 1.86
Appearance	7.26 $\pm$ 1.87	7.30 $\pm$ 1.39
Colour	7.21 $\pm$ 1.92	7.23 $\pm$ 1.65
Overall acceptability	6.71 $\pm$ 2.11	7.00 $\pm$ 1.48

Values did not differ significantly between the trials ($P > 0.05$).

highest scores, above 7 for the two desserts, were obtained for the attributes appearance and colour, probably due to the addition of guava pulp, which gives desserts an attractive visual aspect. The overall acceptability of the desserts of this study was comparable to that obtained by Iluriti and co-workers,³¹ between 6.8 to 7.6, also using the hybrid hedonic scale, for refrigerated mousses produced with the probiotic *L. acidophilus* LA-5, skimmed milk, guava pulp, whey protein concentrate, with or without the prebiotic inulin and, the same way for the desserts of this study, without the addition of milk fat.

Conclusions

The *G. domingensis* dispersion resulted in higher thickening property in dairy desserts when compared with *G. birdiae*. The variations in the polysaccharide fractions reported in the literature for the seaweeds used in this study were possibly related to the increased firmness values observed for dairy desserts with the *G. domingensis* dispersion. The desserts with dispersions of either *G. birdiae* or *G. domingensis* were shown to be appropriate as a vehicle for *B. animalis* from the SAB 440-A culture, which was able to maintain higher populations, above $7 \log \text{cfu g}^{-1}$ during 21 days of storage, therefore in sufficient amounts to be effective for health *in vivo*, despite the product formulations having not been favourable for the survival of *L. acidophilus* of the same culture. Moreover, the differences in the texture of the desserts studied were also probably associated to the slightly increased acceptability scores, although not significant, for the product with *G. domingensis* dispersion. As a result, the *G. domingensis* dispersion is suitable to be used as a thickening agent to produce dairy desserts with enhanced firmness and good sensory acceptability, it being suggested to use only *B. animalis* as a probiotic for this product.

Acknowledgements

The authors acknowledge Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Project 402529/2012-0) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support. The

authors also acknowledge the Federal University of Pernambuco, Federal University of Campina Grande and State University of Paraíba for the technical assistance.

References

- 1 R. Pangestuti and S. K. Kim, An overview of phycocolloids: the principal commercial seaweeds extracts, in *Marine algae extracts: processes, products and applications*, ed. S. K. Kim and K. Chojnacka, Wiley, Weinheim, 2015, pp. 319–330.
- 2 L. Hayashi, C. Bulboa, P. Kradolfer, G. Soriano and D. Robledo, Cultivation of red seaweeds: a Latin American perspective, *J. Appl. Phycol.*, 2014, **26**, 719–727.
- 3 A. C. Tavares Estevam, F. C. Alonso Buriti, T. A. de Oliveira, E. V. S. Pereira, E. R. Florentino and A. L. F. Porto, Effect of aqueous extract of the seaweed *Gracilaria domingensis* on the physicochemical, microbiological, and textural features of fermented milks, *J. Food Sci.*, 2016, **81**, C874–C880.
- 4 B. W. S. Souza, M. A. Cerqueira, A. I. Bourbon, A. C. Pinheiro, J. T. Martins, J. A. Teixeira, M. A. Coimbra and A. A. Vicente, Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*, *Food Hydrocolloids*, 2011, **27**, 287–292.
- 5 G. P. Fidelis, R. B. G. Camara, M. F. Queiroz, M. S. Santos Pereira Costa, P. C. Santos, H. A. O. Rocha and L. S. Costa, Proteolysis, NaOH and ultrasound-enhanced extraction of anticoagulant and antioxidant sulfated polysaccharides from the edible seaweed, *Gracilaria birdiae*, *Molecules*, 2014, **19**, 18511–18526.
- 6 R. O. Silva, A. P. M. Santana, N. S. Carvalho, T. S. Bezerra, C. B. Oliveira, S. R. B. Damasceno, L. S. Chaves, A. L. P. Freitas, P. M. G. Soares, M. H. L. P. Souza, A. L. R. Barbosa and J. R. Medeiros, A sulfated-polysaccharide fraction from seaweed *Gracilaria birdiae* prevents naproxen-induced gastrointestinal damage in rats, *Mar. Drugs*, 2012, **10**, 2618–2633.
- 7 L. E. Fernández, O. G. Valiente, V. Mainardi and J. L. Bello, Isolation and characterization of an antitumor active agar-type polysaccharide of *Gracilaria domingensis*, *Carbohydr. Res.*, 1989, **190**, 77–83.
- 8 F. C. A. Buriti and S. M. I. Saad, Chilled milk-based desserts as emerging probiotic and prebiotic products, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2014, **54**, 139–150.
- 9 C. R. Soccol, L. P. S. Vandenberghe, M. R. Spier, A. B. P. Medeiros, C. T. Yamaguchi and J. D. Lindner, The potential of probiotics: a review, *Food Technol. Biotechnol.*, 2010, **48**, 413–434.
- 10 A. G. Cruz, A. E. C. Antunes, A. L. O. P. Sousa, J. A. F. Faria and S. M. I. Saad, Ice cream as a probiotic food carrier, *Food Res. Int.*, 2009, **42**, 1233–1239.
- 11 U. Purwandari, N. P. Shah and T. Vasiljevic, Effects of exopolysaccharide-producing strains of *Streptococcus thermophilus* on technological and rheological properties of set-type yoghurt, *Int. Dairy J.*, 2007, **17**, 1344–1352.
- 12 T. Balasankar and A. Pushparaj, Antimicrobial activity of red seaweed *Gracilaria corticata*, against human pathogenic bacterial strains, *World J. Pharm. Sci.*, 2014, **2**, 1901–1904.
- 13 I. Tüney, B. H. Çadirci, D. Ünal and A. T. Sukatar, Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (İzmir, Turkey), *Turk. J. Biol.*, 2006, **30**, 171–175.
- 14 C. M. B. Calado, V. C. França Pires, E. R. Florentino, I. M. Florêncio, F. C. A. Buriti and M. T. Torres, *Gracilaria cornea*, (Gracilariales, Rhodophyta) seaweed: characterization and suitability for cake production, in *4th SOLABIAA Latin American Congress, SOLABIAA*, Florianópolis, 2015. Available from http://www.congresso2015.solabiao.com.br/resources/anais/4/1447030311_ARQUIVO_9441719.pdf.
- 15 Instituto Adolfo Lutz, *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, IAL, São Paulo, 2008.
- 16 AOAC International, *Official methods of analysis of the AOAC International*, AOAC International, Gaithersburg, 2005.
- 17 J. Folch, M. Less and S. Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, 1957, **226**, 497–509.
- 18 FAO, *Food energy: methods of analysis and conversion factors - report of a technical workshop*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2003.
- 19 F. C. A. Buriti, S. C. Freitas, A. S. Egito and K. M. O. dos Santos, Effects of tropical fruit pulps and partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds on the dietary fibre content, probiotic viability, texture and sensory features of goat dairy beverages, *LWT-Food Sci. Technol.*, 2014, **159**, 196–203.
- 20 M. Song, B. Yun, J. H. Moon, D. J. Park, K. Lim and S. Oh, Characterization of selected *Lactobacillus* strains for use as probiotics, *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, 2015, **35**, 551–556.
- 21 N. D. M. Villanueva and M. A. A. P. da Silva, Comparative performance of the nine-point hedonic, hybrid and self-adjusting scales in the generation of internal preference maps, *Food Qual. Prefer.*, 2009, **20**, 1–12.
- 22 ANVISA, Resolução RDC No. 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, *Diário Oficial da União*, 2001, 10 Jan. (7), 45–53.
- 23 K. J. McDermid, B. Stuercke and O. J. Haleakala, Total dietary fiber content in Hawaiian marine algae, *Bot. Mar.*, 2005, **48**, 437–440.
- 24 M. H. Norziah and C. Y. Ching, Nutritional composition of edible seaweed *Gracilaria changgi*, *Food Chem.*, 2000, **68**, 69–76.
- 25 A. Ramírez and E. Pacheco de Delahaye, Functional properties of starches with high dietetic fiber content obtained from pineapple, guava and soursop, *Interciencia*, 2009, **34**, 293–298.
- 26 L. C. Aragon-Alegro, J. H. A. Alegro, H. R. Cardarelli, M. C. Chiu and S. M. I. Saad, Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse, *LWT-Food Sci. Technol.*, 2007, **40**, 669–675.

- 27 M. Guimarães, A. G. Viana, M. E. Rabello Duarte, S. D. Ascêncio, M. E. Platino and D. Nosedá, Low-molecular-mass carbohydrates and soluble polysaccharides of green and red morphs of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta), *Bot. Mar.*, 2007, **50**, 314–317.
- 28 F. C. A. Buriti, T. R. Komatsu and S. M. I. Saad, Activity of passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*) pulps on *Lactobacillus acidophilus* in refrigerated mousses, *Braz. J. Microbiol.*, 2007, **38**, 315–317.
- 29 F. C. A. Buriti, I. A. Castro and S. M. I. Saad, Viability of *Lactobacillus acidophilus* in symbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions, *Int. J. Food Microbiol.*, 2010, **137**, 121–129.
- 30 K. M. O. dos Santos, I. C. de Oliveira, M. A. C. Lopes, A. P. G. Cruz, F. C. A. Buriti and L. M. Cabral, Addition of grape pomace extract to probiotic fermented goat milk: the effect on phenolic content, probiotic viability and sensory acceptability, *J. Sci. Food Agric.*, 2017, **97**, 1108–1115.
- 31 F. C. A. Buriti, I. A. Castro and S. M. I. Saad, Effects of refrigeration, freezing and replacement of milk fat by inulin and whey protein concentrate on texture profile and sensory acceptance of synbiotic guava mousses, *Food Chem.*, 2010, **123**, 1190–1197.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação à composição físico-química da *G. domingensis* e *G. birdiae* seca (em pó), os carboidratos foram os constituintes principais, enquanto a proteína foi o principal componente de sólidos totais no extrato aquoso destas algas. O teor de fibras alimentar foi superior a 95% do total de carboidratos, nas duas algas.

O comportamento da acidez, pH e população microbiana nos leites fermentados, durante o período de incubação, foi semelhante para o ensaio controle e nos ensaios contendo diferentes níveis de gelatina e / ou algas, não resultando, portanto, em interferência destes ingredientes no processo fermentativo.

Os valores dos parâmetros de textura instrumental obtidos durante todo o processo fermentativo para as formulações adicionadas das algas foram semelhantes ou superiores aos obtidos para o leite fermentado contendo apenas gelatina como modificador de textura. Portanto, os extratos das algas atuaram, nos leites fermentados como agente espessante nas concentrações utilizadas, apresentando-se como uma alternativa à gelatina, para ser utilizado como modificador de textura.

Em relação às sobremesas formuladas com os extratos aquosos das *Gracilárias*, não houve diferenças significativas entre elas para sólidos totais, cinzas, lipídeos, pH, acidez, viabilidade microbiana e aceitabilidade sensorial ($p > 0,05$). Entretanto, as variações entre as frações de polissacarídeos destas algas possivelmente estão relacionadas ao aumento do conteúdo de fibra alimentar e valores de firmeza observados nas sobremesas lácteas formuladas com extrato aquoso de *G. domingensis*.

Apenas a sobremesa formulada com *G. domingensis* cumpriu o requisito para uma fonte de produtos de fibra alimentar (2,68 g de fibra alimentar por porção de 120 g), segundo a legislação brasileira, apresentando maior firmeza em relação à produzida com *G. birdiae* ($p < 0,05$). Estas diferenças na textura das sobremesas estudadas também foram provavelmente associadas com a pontuação de aceitabilidade ligeiramente superior, embora não significativa, para o produto com extrato aquoso da *G. domingensis*.

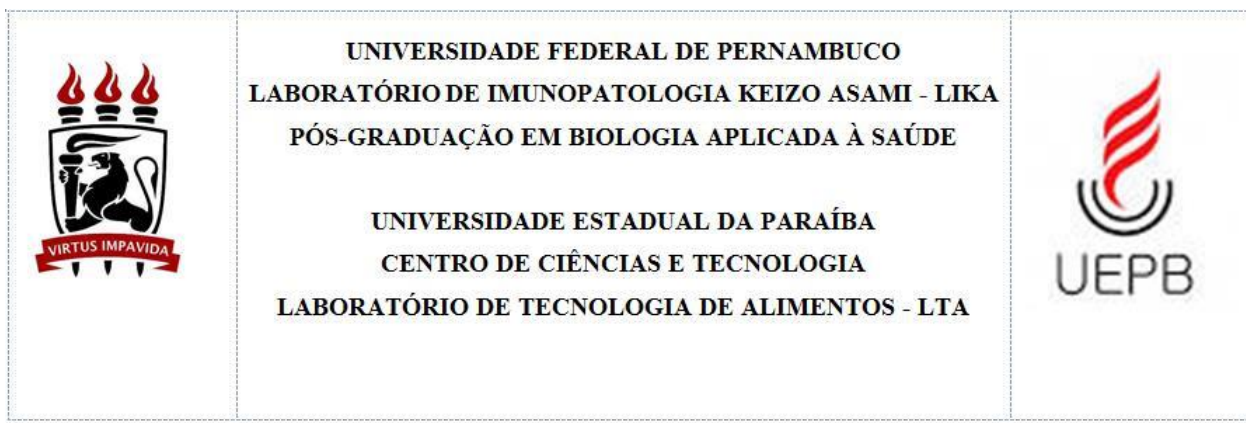
Além disso, *L. acidophilus* mostrou baixa sobrevida nas sobremesas formuladas com as duas algas (6 log ufc g⁻¹). Porém *B. animalis* foi capaz de manter populações mais elevadas, superiores a 7 log ufc g⁻¹, durante 21 dias de armazenamento das sobremesas, na presença dos extratos da *G. birdiae* ou *G. domingensis* e, portanto eficazes como probiótico *in vivo*.

Nas sobremesas, o extrato aquoso da *G. domingensis* foi recomendado para ser usado com a cultura SAB 440-A e polpa de goiaba, obtendo um produto mais firme e em quantidades adequadas de *B. animalis*, além de boa aceitabilidade sensorial.

Por fim, as propriedades espessantes, gelificantes e estabilizantes destas algas são de grande interesse para a indústria e para o consumo humano, podendo contribuir para um uso seguro das algas cultivadas por parte de cooperativas de produtores, que venham favorecer a economia e inclusão social de comunidades locais, bem como ganhos às indústrias de laticínios.

APÊNDICES

A - Termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

OBSERVAÇÃO: para o caso de pessoas maiores de 18 anos e não incluídas no grupo de vulneráveis

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido eu, _____, em pleno exercício dos meus direitos me disponho a participar desta Pesquisa.

Avaliação de extratos de algas do filo Rhodophyta no desenvolvimento de produtos lácteos probióticos.

- ❖ A pesquisa propõe avaliar o comportamento de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* em base láctea adicionada dos extratos aquosos de algas pertencentes ao Filo Rhodophyta.

As rodofíceas são utilizadas como alimento humano e como fonte de hidrocolóides por meio da extração do ágar que pode ser usado na produção de alimentos, principalmente nas indústrias de laticínios (iogurtes, flans, sorvetes, achocolatados) e na fabricação de gelatinas.

A indústria de alimentos, especialmente o setor de laticínios, tem adicionado culturas probióticas para conferir propriedades funcionais aos seus produtos. Leites fermentados e sobremesas lácteas são meios viáveis para a incorporação de ingredientes funcionais, especialmente probióticos, com alegação de promover à saúde.

Declaro ser esclarecido e estar de acordo com os seguintes pontos:

- Ao voluntário só caberá a autorização para **análise sensorial** e não haverá nenhum risco ou desconforto ao voluntário.
- Ao pesquisador caberá o desenvolvimento da pesquisa de forma confidencial, revelando os resultados ao médico, indivíduo e/ou familiares, cumprindo as exigências da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.
- O voluntário poderá se recusar a participar, ou retirar seu consentimento a qualquer momento da realização do trabalho ora proposto, não havendo qualquer penalização ou prejuízo para o mesmo.
- Será garantido o sigilo dos resultados obtidos neste trabalho, assegurando assim a privacidade dos participantes em manter tais resultados em caráter confidencial.
- Não haverá qualquer despesa ou ônus financeiro aos participantes voluntários deste projeto científico e não haverá qualquer procedimento que possa incorrer em danos físicos ou financeiros ao voluntário e, portanto, não haveria necessidade de indenização por parte da equipe científica e/ou da Instituição responsável.
- Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos, o participante poderá contatar a pesquisadora **Adriana Carneiro Tavares Estevam**, pelo contato: adrianacarneirotavares@yahoo.com.br
- Ao final da pesquisa, se for do meu interesse, terei livre acesso ao conteúdo da mesma, podendo discutir os dados, com o pesquisador, vale salientar que este documento será impresso em duas vias e uma delas ficará em minha posse.

Desta forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos e, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo, dato e assino este termo de consentimento livre e esclarecido.

B - Ficha para teste de aceitabilidade

INSTRUMENTO PARA COLETA DE DADOS

Ficha para teste de aceitabilidade

Nome: _____ Data: ____/____/____

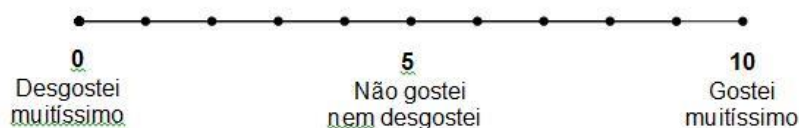
Sexo: Masc. (☐) Fem. (☐)

Idade: _____

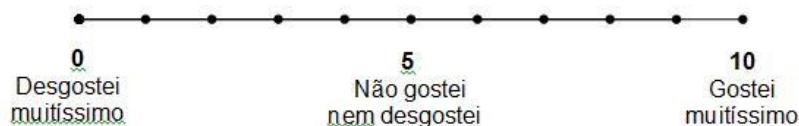
Produto: Sobremesa láctea de goiaba - **Código:** _____

Prove a amostra e marque com um **X** nas escalas abaixo a sua nota para cada característica (sabor, consistência, aparência, cor e aceitação global).

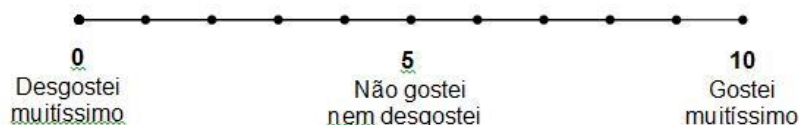
SABOR:



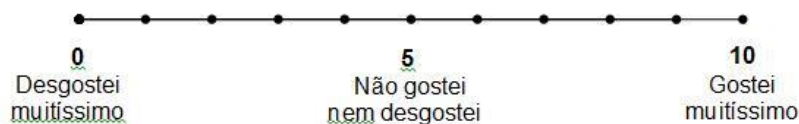
CONSISTÊNCIA:



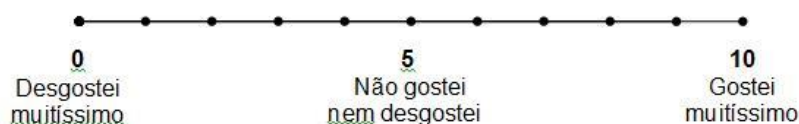
APARÊNCIA:



COR:



ACEITAÇÃO GLOBAL:



Cite a característica que você **mais** gostou na amostra. Comente.



Cite a característica que você **menos** gostou na amostra. Comente.



ANEXOS

I - Aprovação da Pesquisa

Comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos – CEP/UEPB



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS – CEP/UEPB



COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA/
 PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

 Profª Dra. Doralúcia Pedrosa de Araújo
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DO RELATOR: APROVADO

Número do parecer: 31582714.9.0000.5187

Pesquisador: ADRIANA CARNEIRO TAVARES ESTEVAM

Data da 1ª relatoria: 13/07/2014

Data da 2ª relatoria: 12/11/2014

TÍTULO: Estudo cinético de probióticos em base láctea utilizando algas do filo Rhodophyta.

Apresentação do Projeto: Visando a estratégia funcional e escassez informativa sobre a exploração das macro-algas no litoral nordestino, a pesquisa objetiva estudar o desenvolvimento de produtos funcionais visando a aplicação de algas vermelhas pertencentes ao filo Rodophyta nos formulados lácteos coletados no litoral paraibano, utilizadas para diversificação produtiva no setor lácteo.

Objetivo da Pesquisa: Realizar o estudo cinético do crescimento probiótico em base láctea protéica adicionada de algas pertencentes ao filo Rhodophyta.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: A análise sensorial não apresentará riscos para os participantes.

Benefícios: O estudo da utilização da Gracilaria domingensis e Gracilaria birdiae na produção de derivados lácteos visa favorecer, orientar os produtores das algas para diversificação aplicável e garantia de absorção da matéria prima nas variáveis elaborativas. Visualizando a estratégia funcional e escassez informativa sobre a exploração das macro-algas no litoral nordestino, a pesquisa objetivou

diversificação produtiva no setor lácteo. Sendo feita sua caracterização morfológica, físico-química e toxicológica para observação de sua utilização na alimentação humana. Analisou-se o desenvolvimento de fermentações probióticas para bebidas lácteas regionais com adição de algas vermelhas pertencentes ao filo Rodophyta como aditivo nutricional, estabilizante e espessante, além de sua adaptação industrial nos processos fermentativos lácteos para estudo, comparação e aplicação. Além disso, será observada a aceitação das bebidas por parte dos consumidores deste tipo de alimento. Estes processos não só contribuem para aproveitamento de matéria-prima em abundância que está disponível no meio ambiente, mas insere valor agregado e consequentemente ganhos às indústrias de laticínios.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O estudo apresenta uma fundamentação teórica estruturada atendendo as exigências protocolares do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos, da Universidade Estadual da Paraíba, mediante a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde e RESOLUÇÃO/UEPB/CONSEPE/10/2001 que rege e disciplina este CEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Os termos necessários encontram-se aprovados.

Recomendações: O projeto se encontra em sua segunda apreciação, tendo atendido as recomendações realizadas em 13/07/2014.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: O presente estudo encontra-se sem pendências, devendo o mesmo prosseguir com a execução na íntegra de seu cronograma de atividades.

Situação do parecer: Aprovado

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA/
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Profª Dra. Doralúcia Pedrosa de Araújo
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

II - Laudos das Análises

Análise de fibra alimentar das algas

Análise de fibra alimentar das sobremesas

Análise de *Bacillus cereus*



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
LABORATÓRIO DE EXPERIMENTAÇÃO E ANÁLISES DE ALIMENTOS
NONETE BARBOSA GUERRA

Página 1 de 1

CERTIFICADO DE ENSAIO N° 244/14 Data de Emissão: 21/02/2014

SOLICITANTE ADRIANA CARNEIRO TAVARES		DATA DE ENTRADA 10.02.2014
ENDEREÇO DO SOLICITANTE Rua Edesio Silva, 724 – Liberdade – Campina Grande – PB		
NATUREZA DO PRODUTO ALGA		Marca -
Outras Informações: Alga – Gracilaria birdae	Lote -	Data de fabricação: - Data de validade: -
AMOSTRA: aproximadamente 100g, coletada pelo solicitante.		

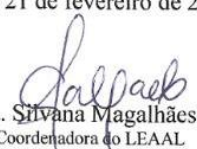
FÍSICO-QUÍMICA

ENSAIO	RESULTADO
Fibra alimentar (g/100g) Método: AOAC, 2002 985.29	68,61
Observações:	-
Conclusão:	-

Informamos que os resultados são referentes a amostra analisada e que a reprodução deste certificado só é permitida na íntegra.

Recife, 21 de fevereiro de 2014


Sebastião Camilo de Melo Filho
Gerente Técnico Setor de Físico-Química


Profa. Dra. Silvana Magalhães Salgado
Coordenadora do LEAAL



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
LABORATÓRIO DE EXPERIMENTAÇÃO E ANÁLISES DE ALIMENTOS
NONETE BARBOSA GUERRA

Página 1 de 1

CERTIFICADO DE ENSAIO Nº 245/14 Data de Emissão: 21/02/2014

SOLICITANTE ADRIANA CARNEIRO TAVARES		DATA DE ENTRADA 10.02.2014
ENDEREÇO DO SOLICITANTE Rua Edesio Silva, 724 – Liberdade – Campina Grande – PB		
NATUREZA DO PRODUTO ALGA		Marca -
Outras Informações: Alga – Gracilaria domingensis	Lote -	Data de fabricação: - Data de validade: -
AMOSTRA: aproximadamente 100g, coletada pelo solicitante.		

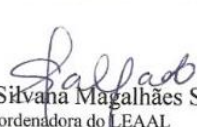
FÍSICO-QUÍMICA

ENSAIO	RESULTADO
Fibra alimentar (g/100g) Método: AOAC, 2002 985.29	63,46
Observações:	-
Conclusão:	-

Informamos que os resultados são referentes a amostra analisada e que a reprodução deste certificado só é permitida na íntegra.

Recife, 21 de fevereiro de 2014


Sebastião Camilo de Melo Filho
Gerente Técnico Setor de Físico-Química


Profa. Dra. Silvana Magalhães Salgado
Coordenadora do LEAAL

 Embrapa Agroindústria de Alimentos	RESULTADO DE ANÁLISE	Página 1 de 1 Número R103815
--	-----------------------------	------------------------------------

DADOS DO CLIENTE

Cliente:	Ana Lúcia Figueiredo Porto - CPF: 25514776468
Endereço:	Rua Dom Manoel de Medeiros s/nº - Dois Irmãos Recife - PE CEP:51170-900
Nome do Material:	Sobremesa de goiaba
Número da Requisição:	0769/2015
Data de Entrada:	19/10/2015
Data da Análise:	20 a 28/10/2015
Código CRA:	1507126 a 1507127

RESULTADOS OBTIDOS
Fibra Alimentar (g/100g)¹

Código CRA	Identificação da Amostra	Resultados
1507126	Amostra 01 – G. BIRDAE	1,14
1507127	Amostra 02 – G. DOHIME	2,23

OBSERVAÇÕES

- ❖ ¹Método: Enzimático-Gravimétrico. POP FQ 015, rev.3.
- ❖ O Resultado da Análise refere-se exclusivamente à amostra ensaiada, sendo o solicitante responsável pela amostragem e coleta do material.
- ❖ Este Resultado de Análise só pode ser reproduzido por completo e com autorização deste laboratório.
- ❖ Prazo máximo para pedido de contra prova de análise é de trinta dias, a partir da data de emissão do Resultado de Análise.

Rio de Janeiro, 29 de outubro de 2015.


 Esdras Sundfeld
 Chefe Adjunto de P&D
 Embrapa Agroindústria de Alimentos


 Sidinéa Cordeiro de Freitas
 Responsável Técnico
 Laboratório de Físico-Química

**SCIENTEC**

Associação para o Desenvolvimento da Ciência e da Tecnologia
Fundada em 1981 – Conveniada com a UFPB
Laboratório de Tecnologia de Alimentos

João Pessoa, 03 de março de 2015.

LAUDO DE ANÁLISE Nº 138/15

SOLICITANTE:	ANA LUCIA FIGUEIREDO PORTO - CNPQ 255.147.764-68
ENDEREÇO:	RUA DOM MANOEL DE MEDEIROS SN CEP: 52171-900
PRODUTO(S):	LEITE FERMENTADO PROBIÓTICO - BIRDAE - BIRD V.P
COLETADO POR:	Pelo interessado (a)
MARCA/PROCEDÊNCIA:	- / -
FAB./VAL./LOTE:	- / - / -
DATA DE ENTRADA:	25.02.2015
DATA DE ANÁLISE:	25.02.2015
AMOSTRA/QUANT.:	Nº. 136/01 (uma)

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

ANÁLISE	RESULTADO
Bacillus cereus (UFC/g)	0,0

Metodologia: - Instrução Normativa Nº 62, 26 de agosto de 2003.

Isabel C. B. Perdigão Batista
Isabel Cristina L. Perdigão Batista
Eng^a Controle de Qualidade
Mat. SIAPE 00336481

CNPJ 08.331.902/0001-12 ☎ (83) 3216-7063
LTA – Laboratório de Tecnologia de Alimentos
☎ (83) 3216-7363 / 91062088 - ☐ (83) 3216-7900
☑ Campus Universitário I – CT, s/n. 58051-970 - João Pessoa/PB
E-mail: scientecassociacao@gmail.com lta@ct.ufpb.br

**SCIENTEC**

Associação para o Desenvolvimento da Ciência e da Tecnologia
Fundada em 1981 – Conveniada com a UFPB
Laboratório de Tecnologia de Alimentos

João Pessoa, 03 de março de 2015.

LAUDO DE ANÁLISE Nº 139/15

SOLICITANTE:	ANA LUCIA FIGUEIREDO PORTO - CNPQ 255.147.764-68
ENDEREÇO:	RUA DOM MANOEL DE MEDEIROS SN CEP: 52171-900
PRODUTO(S):	LEITE FERMENTADO PROBIÓTICO - DOMINGENSIS - DOM. V.P
COLETADO POR:	Pelo interessado (a)
MARCA/PROCEDÊNCIA:	- / -
FAB./VAL./LOTE:	- / - / -
DATA DE ENTRADA:	25.02.2015
DATA DE ANÁLISE:	25.02.2015
AMOSTRA:/QUANT.:	Nº. 137/01 (uma)

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

ANÁLISE	RESULTADO
Bacillus cereus (UFC/g)	0,0

Metodologia: - Instrução Normativa Nº 62, 26 de agosto de 2003.

Isabel C. B. Perdigão Batista
Isabel Cristina L. Perdigão Batista
Eng^a Controle de Qualidade
Mat. SIAPE 00336461

CNPJ 08.331.902/0001-12 ☎ (83) 3216-7063
LTA – Laboratório de Tecnologia de Alimentos
☎ (83) 3216-7363 / 91062088 - ☐ (83) 3216-7900
✉ Campus Universitário I – CT, s/n. 58051-970 - João Pessoa/PB
E-mail: scientecassociacao@gmail.com lta@ct.ufpb.br