UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Alimentos

Influência da matriz de gelado comestível sobre o comportamento e a sobrevivência de cepas
probióticas a condições do trato gastrointestinal simuladas *in vitro*

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad

São Paulo
2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Alimentos

Influência da matriz de gelado comestível sobre o comportamento e a sobrevivência de cepas
probióticas a condições do trato gastrointestinal simuladas *in vitro*

Marcela de Souza Leite

Versão Original

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad

São Paulo
2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

L533i Leite, Marcela de Souza
Influência da matriz de gelado comestível sobre o comportamento e a sobrevivência de cepas probióticas a condições do trato gastrointestinal simuladas in vitro / Marcela de Souza Leite. - São Paulo, 2021.
80 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Saad, Susana Marta Isay

1. Gelados Comestíveis. 2. Probióticos. 3. Lactose. 4. Fermentação. I. T. II. Saad, Susana Marta Isay, orientador.

Marcela de Souza Leite

Influência da matriz de gelado comestível sobre o comportamento e a sobrevivência de cepas
probióticas a condições do trato gastrointestinal simuladas *in vitro*

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profª. Dra. Susana Marta Isay Saad
Orientadora/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, 09 de abril de 2021

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Raphael que me apoiou, me incentivou, me compreendeu em todos os momentos e permitiu que eu realizasse mais este sonho.

A minha mãe Eunice, minhas irmãs Monique e Melissa, minhas tias Leci e Ieda e toda minha família que ficaram torcendo por mim mesmo que de longe.

A minha pequena companheira Kyra, que ficou literalmente ao meu lado (e muitas vezes no meu colo) durante todo o processo de escrita desta dissertação.

Aos meus amigos e colegas do grupo de pesquisa e da pós-graduação, Igor Ucella, Carolina Battistini, Rafael Maluhy, Luiz Garutti, Audrey Coqueiro, Thainá Domingues, Raquel Bedani, Ana Beatriz Ribeiro, Marcos Herkenhoff, Ana Clara Cucick e Juliana Suzuki que pacientemente me ensinaram, apoiaram, ajudaram nos meus experimentos e me proporcionaram momentos de alegria durante todo o mestrado. Sem eles teria sido impossível eu concluir o mestrado.

À minha orientadora Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad, pelo aprendizado e suporte concedido para realização deste trabalho durante esses anos.

À técnica Katia Leani por avaliar as condições sanitárias dos meus gelados comestíveis.

Aos docentes, funcionários e técnicos do Departamento de Tecnologia Bioquímico Farmacêutica.

A Fernanda Peres, que nem sabe da minha existência, mas que disponibilizou conteúdos de qualidade de forma gratuita na internet me ajudando a realizar as análises estatísticas dos meus dados. O trabalho de pessoas como ela democratiza o acesso ao conhecimento e deve ser ressaltado principalmente neste momento de pandemia e numa era de disseminação de tanta informação incorreta.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq – 133799/2018-2) pelo incentivo a pesquisa e bolsa concedida.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho

“Eu do livro
Não me livro
E nem quero me livrar
Se do livro
Eu me livro
Como livre vou ficar?”
Silas Fonseca

RESUMO

LEITE, M.S. **Influência da matriz de gelado comestível sobre o comportamento e a sobrevivência de cepas probióticas a condições do trato gastrointestinal simuladas *in vitro***. 2021. 80 p Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A preocupação com a saúde e o envelhecimento da população têm modificado os hábitos alimentares dos consumidores, fazendo com que a indústria alimentícia desenvolva produtos mais saudáveis como os alimentos probióticos, que podem conferir benefícios à saúde quando administrados como parte de uma dieta usual. O objetivo desta dissertação foi avaliar a influência da matriz (gelados comestíveis) fermentados ou não (*frozen* ou sorvete), com ou sem lactose, sobre a viabilidade e a resistência gastrointestinal simulada *in vitro* dos probióticos adicionados, ao longo de 84 dias de armazenamento ($-18 \pm 3^{\circ}\text{C}$), e comparar o efeito desses fatores sobre a aceitabilidade sensorial (utilizando escala hedônica estruturada de 9 pontos) e tecnológicas (pH, *overrun*, acidez e fração de derretimento) dos produtos. Foram realizados ensaios utilizando o delineamento experimental 2^2 , constituído por dois fatores (fermentação e lactose) em dois níveis (presença ou ausência), resultando em 4 formulações de gelados comestíveis probióticos: sorvete com lactose (SL+), *frozen* com lactose (FL+), sorvete sem lactose (SL-) e *frozen* sem lactose (FL-). As 4 formulações foram inoculadas com a cultura ABT-5 (contendo *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium animalis* Bb-12 e uma cultura *starter* de *Streptococcus thermophilus*) e elaboradas com os mesmos ingredientes, diferenciando-se somente na utilização de produtos isentos de lactose na produção daquelas sem esse açúcar (SL- e FL-). Essas formulações sem lactose foram classificadas como alimentos com baixo teor de lactose. Nas formulações fermentadas (FL+ e FL-) foram encontrados valores inferiores de pH e de *overrun* e superiores de acidez e de fração de derretimento ($p < 0,05$). As 4 formulações revelaram populações superiores a $6,12 \log \text{ UFC/g}$ para *Lactobacillus* spp. e a $6,24 \log \text{ UFC/g}$ para *Bifidobacterium* spp. durante o armazenamento. Com relação à resistência frente às condições gástrica e entérica simuladas *in vitro*, não houve sobrevivência de *L. acidophilus* La-5 após a fase entérica (I e II) em nenhuma formulação e em nenhum período avaliado. Já para *Bifidobacterium animalis* Bb-12, foi observada uma maior resistência da cepa quando incorporada nas formulações com lactose (SL+ e FL+), sendo que a maior sobrevivência foi observada para FL+ (população média de $5,83 \log \text{ UFC/g}$) após 6h de ensaio. Na análise sensorial, não houve diferença significativa entre as 4 formulações ($p > 0,05$) e SL+, FL+, SL- e FL- receberam, no 42º dia de armazenamento, avaliações médias de, respectivamente, 7,56, 7,42, 7,70 e 7,42. Sendo assim, concluiu-se que, durante o período de armazenamento estudado, a presença ou ausência da lactose e/ou da etapa de fermentação não afetou significativamente ($p > 0,05$) as características sensoriais (boa aceitação das 4 formulações) e tecnológicas dos gelados comestíveis estudados, bem como a viabilidade dos probióticos e sua resistência frente às condições gástrica e entérica simuladas *in vitro*. Entretanto, futuros estudos visando uma melhor sobrevivência e resistência dos probióticos nos produtos, sem alterar as excelente a aceitação sensorial, serão necessários.

Palavras-chaves: gelados comestíveis, probióticos, lactose, fermentação.

ABSTRACT

LEITE, M.S. **Influence of ice cream matrix on the behavior and survival of probiotic strains under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions.** 2021. 80 p Dissertation (Master of Science) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

The population's concern with health and aging has changed the eating habits of consumers, leading the food industry to develop healthier products like probiotic foods, which may confer health benefits, when administered as part of a usual diet. The present dissertation aimed to evaluate the influence of the food matrix (ice cream) fermented or not (frozen or ice cream), with or without lactose on the viability and the *in vitro*-simulated gastrointestinal resistance of the probiotics added over the 84 days of frozen storage ($-18 \pm 3^{\circ}\text{C}$), besides comparing the effect of these factors on the sensory acceptance (using a structured 9 points hedonic scale) and technological features (pH, overrun, titratable acidity, and melting fraction) of the products. For this purpose, a 2^2 experimental design, consisting of two factors (fermentation and lactose) in two levels (presence or absence) was carried out, resulting in four probiotic ice cream formulations: ice cream with lactose (SL+), frozen with lactose (FL+), lactose free ice cream (SL-), and lactose free frozen (FL-). The 4 formulations were inoculated with an ABT-5 culture (containing *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium animalis* Bb-12, and a starter culture of *Streptococcus thermophilus*) and produced with the same ingredients, in which the difference consisted only in the use of ingredients absent of lactose in the production of those without this sugar (SL- and FL-). These lactose-free formulations were classified as lactose-reduced foods. In the fermented formulations (FL+ and FL-), lower values of pH and overrun and higher values of acidity and melting fraction were observed ($p < 0,05$). The 4 formulations presented populations above $6.12 \log \text{CFU/g}$ for *Lactobacillus* spp. and $6.24 \log \text{CFU/g}$ for *Bifidobacterium* spp. during storage. Regarding resistance to *in vitro*-simulated gastric and acidic conditions, there was no survival of *L. acidophilus* La-5 after the enteric phase (I and II) in any formulation and period evaluated. For *Bifidobacterium animalis* Bb-12, a higher resistance was observed when the strain was incorporated in formulations with lactose (SL+ and FL+) and FL+ had the highest survival (average population of $5.83 \log \text{CFU/g}$) after 6 hours of assay. In the sensory evaluation, there was no significant difference between the 4 formulations ($p > 0,05$) and SL+, FL+, SL-, and FL-received, on the 42nd day of storage, mean ratings of, respectively, 7.56, 7.42, 7.70, and 7.42. Therefore, it was concluded that, during the storage period studied, the presence or absence of lactose and/or the fermentation stage did not affect ($p > 0,05$) the sensory (good acceptance of the 4 formulations) and technological aspects of the ice creams studied, as well as the viability of probiotics and their resistance to *in vitro*- simulated gastric and enteric conditions. However, future studies aiming at a better survival and resistance of the probiotics in the products, without altering the excellent sensory acceptance, will be necessary.

Keywords: ice-creams, probiotics, lactose, fermentation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Delineamento experimental para elaboração dos gelados comestíveis probióticos fermentados (<i>frozen</i>) e não fermentados (sorvete).	28
Tabela 2 - Proporção dos ingredientes utilizados na produção dos gelados comestíveis.....	31
Tabela 3- Cronograma das análises realizadas	32
Tabela 4- Composição centesimal (%), valor energético (Kcal/100g) e teor de lactose (%) das formulações SL+ (sorvete com lactose), FL+ (<i>frozen</i> com lactose), SL- (sorvete sem lactose) e FL- (<i>frozen</i> sem lactose)	40
Tabela 5 -Valores de pH e acidez obtidos (Média ± Dp) para as formulações SL+ (sorvete com lactose), FL+ (<i>frozen</i> com lactose), SL- (sorvete sem lactose) e FL- (<i>frozen</i> sem lactose), durante os 84 dias de armazenamento a -18°C ± 3°C.....	41
Tabela 6 -Valores de <i>overrun</i> e da fração de derretimento obtidos (média ± DP) para SL+ (sorvete com lactose), FL+ (<i>frozen</i> com lactose), SL- (sorvete sem lactose) e FL- (<i>frozen</i> sem lactose)	43
Tabela 7- Viabilidade (Mediana (1º quartil - 3º quartil)) de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5, <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 e da cultura <i>starter</i> de <i>Streptococcus thermophilus</i> (log UFC/g) para SL+ (sorvete com lactose), FL+ (<i>frozen</i> com lactose), SL- (sorvete sem lactose) e FL- (<i>frozen</i> sem lactose) ao longo do período de armazenamento	46
Tabela 8- Determinação das contagens populacionais dos microrganismos indicadores da qualidade sanitária e presença/ausência de <i>Salmonella</i> spp., obtidas para SL+ (sorvete com lactose), FL+ (<i>frozen</i> com lactose), SL- (sorvete sem lactose) e FL- (<i>frozen</i> com lactose).....	54
Tabela 9- Avaliação sensorial obtida (Média ± Dp) para as 4 formulações SL+ (sorvete com lactose), FL+ (<i>frozen</i> com lactose), SL- (sorvete sem lactose) e FL- (<i>frozen</i> sem lactose) após 7 e 42 dias de armazenamento a -18°C ± 3°C.	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Curva de Fermentação do <i>frozen</i> com lactose (FL+) para n=3	29
Figura 2- Curva de Fermentação do <i>frozen</i> sem lactose (FL-) para n=3	29
Figura 3 -Principais etapas envolvidas na tecnologia de fabricação dos sorvetes e dos <i>frozens</i> probióticos.	30
Figura 4 -Esquema representativo da simulação <i>in vitro</i> das condições gástricas e entéricas .	38
Figura 5 - Imagem de uma amostra de gelado comestível após o teste de derretimento	45
Figura 6 - Sobrevivência de <i>B.animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 em SL+ (sorvete com lactose), FL+ (<i>frozen</i> com lactose), SL- (sorvete sem lactose) e FL- (<i>frozen</i> sem lactose) durante o armazenamento a -18°C por 7,21,42 e 84 dias, antes (viabilidade) e durante o ensaio <i>in vitro</i> com simulação das condições gástricas e entéricas.	49
Figura 7- Sobrevivência de <i>L.acidophilus</i> La-5 em SL+ (sorvete com lactose), FL+ (<i>frozen</i> com lactose), SL- (sorvete sem lactose) e FL- (<i>frozen</i> sem lactose) durante o armazenamento a -18°C por 7,21,42 e 84 dias, antes (viabilidade) e durante o ensaio <i>in vitro</i> com simulação das condições gástricas e entéricas.	51
Figura 8 - Sobrevivência de <i>B.animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 no 84º dia de armazenamento a -18°C comparando as formulações com lactose (SL+ e FL+) e sem lactose (SL- e FL-)	53
Figura 9 - Sobrevivência de <i>B.animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 no 84º dia de armazenamento a -18°C comparando as formulações fermentadas (FL+ e FL-) e não fermentadas (SL+ e SL-)	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	ALIMENTOS PROBIÓTICOS	13
1.2	LACTOBACILOS E BIFIDOBACTÉRIAS	16
1.3	SOBREVIVÊNCIA AO TRATO GASTROINTESTINAL.....	18
1.4	APLICAÇÃO DE PROBIÓTICOS EM MATRIZES ALIMENTARES.....	20
1.5	ALIMENTOS SEM LACTOSE	21
1.6	GELADOS COMESTÍVEIS COMO VEÍCULOS PARA CEPAS PROBIÓTICAS ..	24
2	OBJETIVOS	27
2.1	OBJETIVO GERAL	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	28
3.2	FABRICAÇÃO DOS GELADOS COMESTÍVEIS	29
3.3	PERÍODOS DE ANÁLISES DURANTE O ARMAZENAMENTO	32
3.4	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	32
3.5	CÁLCULO DO VALOR ENERGÉTICO TOTAL.....	33
3.6	DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ E DO pH.....	33
3.7	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LACTOSE.....	33
3.8	<i>OVERRUN</i>	34
3.9	FRAÇÃO DE DERRETIMENTO.....	34
3.10	DETERMINAÇÃO DAS CONTAGENS POPULACIONAIS DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS E <i>STARTER</i>	34
3.11	AVALIAÇÃO SENSORIAL.....	35
3.12	DETERMINAÇÃO DOS PADRÕES MICROBIOLÓGICOS SANITÁRIOS PARA GELADOS COMESTÍVEIS	36
3.13	AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DAS CULTURAS PROBIÓTICAS DE <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 E <i>Bifidobacterium</i> BB-12 ÀS CONDIÇÕES GÁSTRICAS E ENTÉRICAS SIMULADAS <i>IN VITRO</i>	37
3.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	40
4.1	COMPOSIÇÃO CENTESIMA, VALOR ENRGÉTICO E TEOR DE LACTOSE DOS GELADOS COMESTÍVEIS	40
4.2	VALORES DE ACIDEZ E pH.....	41
4.3	<i>OVERRUN</i> E FRAÇÃO DE DERRETIMENTO	43
4.4	CONTAGENS POPULACIONAL DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS E <i>STARTER</i>	45
4.5	RESISTÊNCIA DAS CULTURAS PROBIÓTICAS DE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS LA-5 E BIFIDOBACTERIUM BB-12 ÀS CONDIÇÕES GÁSTRICAS E ENTÉRICAS SIMULADAS <i>IN VITRO</i>	49
4.6	PADRÕES MICROBIOLÓGICOS SANITÁRIOS PARA GELADOS COMESTÍVEIS	54
4.7	AVALIAÇÃO SENSORIAL.....	55
5	PRINCIPAIS RESULTADOS ENCONTRADOS.....	58

6	CONCLUSÃO.....	59
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
8	ANEXOS.....	71
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	71
	ANEXO B – Ficha utilizada na análise sensorial	74
	ANEXO C – Ficha do aluno	75
	ANEXO D – Currículo Lattes	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 ALIMENTOS PROBIÓTICOS

Especialmente na última década, os consumidores começaram a acreditar na relação direta do consumo alimentar com a saúde e passaram a exigir novos tipos de produtos que, além de proverem os nutrientes necessários, previnem doenças relacionadas com a nutrição e promovem o bem-estar físico e emocional. Em virtude disto, as indústrias passaram a explorar este novo mercado fabricando alimentos e bebidas probióticas.

Estima-se que o mercado global dos produtos probióticos atinja um valor de faturamento de 69,3 bilhões de dólares, o que representa um crescimento de 19,9 bilhões de dólares de 2018 até o final de 2023 (MARKETS and MARKETS, 2019). Esse crescimento é devido ao aumento do número de pessoas que passaram a utilizar probiótico e também do aumento de produtos disponíveis no mercado (MCFARLAND, 2015).

A palavra probiótico é derivada do grego e significa "para a vida" (SHOKRYAZDAN et al., 2017). O termo probiótico aperfeiçoou-se ao longo dos anos desde a sua primeira definição, em 1965 (MARKOWIAK; ŚLIZEWSKA, 2017; SÁNCHEZ et al., 2017). Atualmente, a definição aceita internacionalmente de probióticos, é a de “microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios a saúde do hospedeiro” (HILL et al., 2014). No entanto, não existe uma definição desta quantidade adequada, uma vez que a dose efetiva depende de variáveis como o tipo de probiótico (gênero, espécie, linhagem, origem), o veículo selecionado para a cepa probiótica e os tipos de benefícios desejados à saúde (OUWEHAND, 2017).

Apesar da quantidade mínima necessária de células probióticas viáveis não serem universalmente estabelecidas, os níveis aceitos normalmente ficam entre 10^6 a 10^9 UFC/g (DA SILVA et al., 2014). A indústria alimentícia, de forma geral, tem adotado um nível mínimo de 10^6 UFC/ ml no momento do consumo do alimento (HILL et al., 2014). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, não estabelece uma quantidade mínima do probiótico no alimento, desde que seja comprovada a sobrevivência do probiótico ao trato digestório humano e seja demonstrado o benefício da dosagem sugerida, por meio de estudos envolvendo um grupo representativo da população de interesse (ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2018).

Cepas probióticas podem ser isoladas de animais, plantas e do meio ambiente. No entanto, para o uso em animais, elas devem ser isoladas da microbiota intestinal do animal

para uma colonização intestinal mais fácil e para uma aplicação mais específica (SHOKRYAZDAN et al., 2017).

Ressalta-se que os microrganismos probióticos devem ser seguros para o consumo, devem manter-se viáveis no produto durante toda a vida de prateleira, chegarem vivos ao órgão de interesse e sua utilização deve resultar em efeitos benéficos mensuráveis sobre a saúde (MCFARLAND, 2015).

Alguns recursos tecnológicos têm sido utilizados em diversos processos e formulações para manter uma quantidade suficiente de microrganismos nos produtos em uma dose capaz de promover benefícios a saúde. Dentre esses recursos, destacam-se: a seleção de cepas resistentes, a utilização de embalagens com barreiras ao oxigênio, a microencapsulação e a incorporação de compostos prebióticos (FRAKOLAKI et al., 2020). Os prebióticos são definidos como “substratos utilizados seletivamente por microrganismos do hospedeiro, conferindo um benefício à saúde” (GIBSON et al., 2017).

Já a microencapsulação consiste em um processo mecânico ou físico-químico que imobiliza e protege os microrganismos durante o processamento, estocagem e no trato gastrointestinal, em um material encapsulante, liberando-o no sítio de ação adequado para exercer os seus benefícios. As partículas geradas neste processo têm um diâmetro pequeno, de nanômetros a poucos milímetros, dependendo do método e do material utilizado (ĐORĐEVIĆ et al., 2014).

Embora os mecanismos de ação dos probióticos não sejam amplamente comprovados (REID, 2016), experimentos *in vitro* e *in vivo* sugerem os seguintes: interação física da bactéria com o epitélio intestinal (promovem a secreção de muco como um dos mecanismos para melhorar a função da barreira intestinal), interação da bactéria com o sistema imune (modulação e regulação da resposta imune), interação da bactéria com patógenos (exclusão e inibição de patógenos, competindo por sítios de ligação nas células epiteliais e na camada mucosa subjacente, produção de substâncias bactericidas, competição por nutrientes e alteração do metabolismo microbiano) e produção de neurotransmissores (SÁNCHEZ et al., 2017).

A indústria alimentícia tem sofrido com uma série de restrições para alegações de saúde, em alimentos probióticos e prebióticos, em várias partes do mundo (MARTINEZ; BEDANI; SAAD, 2015). Em alguns países da União Europeia, o termo probiótico tem sido restringido para alimentos, mesmo quando são encontrados os critérios mínimos estabelecidos para o produto e nos Estados Unidos as autoridades regulatórias não utilizam o termo probiótico. No Brasil, apesar das limitações e complexidades na regulamentação dos produtos

probióticos, diversos estudos têm sido realizados para desenvolver novos produtos probióticos com boa aceitação pelos consumidores (COLOMBO et al., 2018).

A Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos (ISAPP) recomenda que o termo probiótico seja utilizado somente em produtos que contenham um número mínimo de células viáveis da cepa probiótica, com adequada evidência de que proporcione benefícios à saúde (HILL et al., 2014).

Sniffen *et al* (2018) fizeram uma revisão da literatura existente, até junho de 2018, para auxiliar o público e profissionais de saúde na escolha do produto probiótico mais apropriado para a sua necessidade. Os autores concluíram que os probióticos são eficazes no tratamento de gastroenterite aguda em crianças e na prevenção da diarreia associada ao uso de antibiótico em crianças e adultos. Também encontraram evidências de que os probióticos podem ser usados na prevenção e tratamento da diarreia associada ao *Clostridium difficile*.

Khalesi *et al* (2019) destacaram que a maior parte dos estudos realizados para desvendar o impacto dos benefícios dos probióticos na saúde focam em populações com determinada patologia. Estes autores fizeram uma revisão sistemática sobre os benefícios dos probióticos em adultos saudáveis e concluíram que a suplementação com probióticos em adultos saudáveis pode levar a uma melhoria transitória na concentração de bactéria benéficas na microbiota intestinal. Os autores sugeriram, ainda, que é possível que essa suplementação melhore a função imune, a consistência das fezes, o movimento intestinal e a concentração de *Lactobacillus* na vagina.

MARTINEZ et al. (2015) concluíram que o conhecimento acumulado sobre os efeitos benéficos dos probióticos indicam forte evidência de sua eficácia. Segundo os autores, não se têm conclusões precisas sobre seus efeitos devido à inconsistência entre os diversos estudos e o grande número de variáveis envolvidas. Deve-se salientar a diversidade de cepas utilizadas nos estudos clínicos, os quais, em virtude do fato dos benefícios serem cepa-dependentes, torna difícil concluir qual cepa é realmente efetiva (KHALESİ et al., 2019).

A ISAPP considera dois benefícios associados ao uso de probióticos: a modulação da microbiota intestinal e a modulação do sistema imunológico do hospedeiro (HILL et al., 2014).

Os microrganismos probióticos mais utilizados ainda são bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que possuem um longo histórico de segurança em seu uso (BRODMANN et al., 2017; HIDALGO-CANTABRANA et al., 2017; O'TOOLE; MARCHESI; HILL, 2017).

Porém outros microrganismos recentemente isolados têm se mostrado promissores candidatos a probióticos, embora avaliações mais rigorosas sejam necessárias para garantir que o seu uso seja seguro. Entre eles, podemos destacar os *Bacteroides xylanisolvens*, *Akkermansia muciniphila*, bactérias láticas frutofílicas e *Faecalibacterium prausnitzii* (BRODMANN et al., 2017). Os autores destacaram que esses microrganismos representam só uma pequena fração de potenciais bactérias que talvez possam ser incluídas no desenvolvimento de novos probióticos.

Os novos microrganismos com potencial probiótico têm sido denominados de *Next Generation Probiotic* (NGP) ou Nova Geração de Probióticos. De acordo com O'TOOLE; MARCHESI; HILL (2017), esse termo é uma tentativa de sinalizar a progressão de microrganismos tradicionalmente utilizados e com longos históricos de uso seguro para microrganismos sem aceitação histórica.

Paralelamente, alguns estudos têm demonstrado que células microbianas não viáveis, seus metabólitos ou produtos derivados da ação dos microrganismos sobre os componentes alimentares também podem conferir benefícios à saúde, desde que administrados nas doses corretas. Esses componentes, denominados pós-bióticos, ainda não possuem uma definição oficial, mas tem se tornado objeto de interesse, em virtude de sua segurança e potencial estabilidade (COLLADO; VINDEROLA; SALMINEN, 2019).

1.2 LACTOBACILOS E BIFIDOBACTÉRIAS

A razão para os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* serem os mais utilizados comercialmente é que eles têm um longo histórico de uso seguro (*Generally Regarded as Safe* - GRAS status) (SHOKRYAZDAN et al., 2017). Eles, ainda, são menos suscetíveis a baixos valores de pH, quando comparados a outras bactérias, uma vez que produzem ácidos orgânicos como produtos finais do metabolismo de carboidratos (ŠIPAILIENĖ; PETRAITYTĖ, 2018). Adicionalmente, possuem mecanismos para lidar com o estresse biliar e, desta forma, sobreviver ao trato gastrointestinal (RUIZ; MARGOLLES; SÁNCHEZ, 2013). Ademais, a maior parte do pós-bióticos conhecidos são derivados desses dois gêneros (COLLADO; VINDEROLA; SALMINEN, 2019).

Os *Lactobacillus* spp. são microrganismos que habitam nichos ricos em nutrientes, como alimentos, plantas e o corpo de animais invertebrado e vertebrados, incluindo os humanos (DUAR et al., 2017). Várias espécies desse gênero são essenciais na produção de alimentos fermentados e são usados tanto como cultura *starter* como na preservação de

alimentos (SALVETTI; TORRIANI; FELIS, 2012). Eles também podem produzir diversos tipos de exopolissacarídeos, que são utilizados como agentes texturizantes (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011).

O gênero *Lactobacillus* compreendia 261 espécies, que eram extremamente diversas entre si. Por esse motivo, em 2020, foram reclassificadas em 25 gêneros. As espécies desse gênero são Gram positivas, homofermentativas, termofílicas, não formadora de esporos e em formato de bastonete (ZHENG et al., 2020). Apesar da importância do gênero *Lactobacillus* no trato gastrointestinal para a manutenção da saúde do hospedeiro, essas bactérias representam menos de 0,01% do total de bactérias no trato gastrointestinal (TAVERNITI et al., 2014).

Devido ao seu uso como probiótico, *L.acidophilus* é a espécie melhor caracterizada do gênero *Lactobacillus* (GOPAL, 2011).

As bifidobactérias, por sua vez, são microrganismos Gram-positivos, anaeróbicos, presentes na microbiota de 90% das crianças alimentadas exclusivamente com leite materno e em mais de 5% em adultos saudáveis (TAVERNITI et al., 2014). Foram isoladas, pela primeira vez, de uma amostra de fezes de uma criança por Henry Tissier (1906 apud MCFARLAND, 2015) e pertencem ao filo Actinobactéria, classe Actinobactéria, ordem Bifidobacteriales e família Bifidobacteriaceae. Estão entre as primeiras colonizadoras microbianas do intestino dos recém-nascidos e desempenham papéis importantes no desenvolvimento de sua fisiologia (HIDALGO-CANTABRANA et al., 2017).

Vale destacar que essas bactérias possuem certas estruturas extracelulares e excretam enzimas e/ ou metabólitos bioativos que parecem exercer atividade imunomodulatórias no ambiente intestinal. Entretanto, apesar dos diversos estudos já realizados, esse mecanismo ainda está longe de ser elucidado (ALESSANDRI et al., 2019).

Diversos trabalhos também têm demonstrando resultados positivos do uso de bifidobactérias no tratamento e prevenção de diversas doenças, como diarreia associado ao uso de antibióticos, doenças inflamatórias intestinais e síndrome do intestino irritável. No entanto, mais pesquisas ainda são necessárias para melhorar a solidez destas evidências científicas (HIDALGO-CANTABRANA et al., 2017).

Especificamente *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 foi isolada em 1983, pela Christian Hansen, sendo utilizada para a fabricação de produtos probióticos lácteos. Esta cepa possui alta tolerância ao ácido gástrico e à bile, quando comparada com outras bifidobactérias e sintetiza a enzima hidrolase de sais biliares (BSH). Ela, também, é capaz de inibir importantes patógenos do trato gastrointestinal, através da produção de substâncias

antimicrobianas e pela competição por sítio ativo. Além disso, promove a melhora da função intestinal, principalmente em grupos com média constipação. Estudos clínicos têm demonstrado que a cepa é capaz de aumentar a resistência a infecções respiratórias comuns e reduzir a incidência da duração de infecções agudas do trato respiratório (JUNGENSEN et al., 2014).

A combinação de *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* Bb-12 pode reduzir a incidência e a duração da diarreia induzida por antibióticos (JUNGENSEN et al., 2014).

1.3 SOBREVIVÊNCIA AO TRATO GASTROINTESTINAL

Os avanços nas tecnologias de sequenciamento de DNA alteraram as pesquisas sobre a microbiota intestinal e facilitaram a exploração desta comunidade microbiana complexa, expandindo o nosso entendimento sobre como a saúde humana está intimamente relacionada com os microrganismos presentes nessa microbiota (GHOSH et al., 2019).

O trato gastrointestinal é habitado por uma complexa microbiota, que inclui os três domínios de vida (Archaea, Bacteria e Eukarya). As bactérias correspondem a quase 98% desses microrganismos, sendo as mais abundantes aquelas pertencentes aos filos dos Firmicutes e dos Bacteroidetes (ZHERNAKOVA et al., 2016).

Variações fisiológicas, como o pH, a quantidade de oxigênio, os peptídeos microbianos e a bile influenciam a composição da comunidade microbiana ao longo do trato gastrointestinal (DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2015).

Embora, até o momento, a comunidade científica não tenha chegado a um consenso sobre o que seria uma microbiota saudável, os estudos têm demonstrado correlações entre algumas populações bacterianas na microbiota intestinal e diferentes estados fisiológicos (SÁNCHEZ et al., 2017).

Vários fatores podem modificar a composição e a atividade metabólica da microbiota intestinal, como o tratamento com antibióticos, processos inflamatórios, mudanças de dietas, idade e motilidade gastrointestinal (MARTINEZ; BEDANI; SAAD, 2015).

Vários estudos reconhecem que, para alguns benefícios à saúde, a viabilidade celular não é um pré-requisito (COLLADO; VINDEROLA; SALMINEN, 2019). No entanto, para o uso em alimentos, os microrganismos probióticos devem ser capazes de se manterem viáveis na matriz alimentar durante toda a sua vida de prateleira e sobreviverem à passagem ao longo

do trato gastrointestinal, ou seja, precisa ser ácido e bile-tolerante, de modo a atingir o cólon (FAO/WHO, 2001).

Embora a sobrevivência dos microrganismos probióticos durante a passagem pelo trato gastrointestinal deva ser estudada *in vivo* no animal ao qual o produto é destinado, nem sempre isso é ético e financeiramente possível. Desta forma, modelos *in vitro* que simulam o trato gastrointestinal têm sido utilizados como alternativa, que vão desde modelos estáticos monocompartimentais a dinâmicos multicompartimentais. Os modelos estáticos são os mais utilizados e os mais baratos. Nesses modelos, cada etapa é feita sequencialmente sob pH e temperatura fixos, por um determinado tempo (GUERRA et al., 2012).

Já os modelos dinâmicos podem ser monocompartimentais ou multicompartimentais. Levam em consideração as respostas fisiológicas dinâmicas à introdução de alimentos, permitindo que o pH seja regulado durante a simulação, o trânsito gradual dos compostos digeridos e a injeção das enzimas digestivas em momentos mais precisos (DUPONT et al., 2019). No entanto, esses modelos possuem custos elevados e sua operação é mais complexa (MULET-CABERO et al., 2020).

De acordo com Lucas-González *et al* (2018), vários modelos de digestão *in vitro* foram criados para analisar as mudanças químicas e estruturais de diversas matrizes alimentares, quando submetidas às condições encontradas no trato gastrointestinal. A falta de consenso sobre diversos parâmetros aplicados nos modelos originou resultados que não podiam ser comparados entre laboratórios de pesquisa distintos.

Desta forma, uma rede internacional de especialistas multidisciplinares de mais de 35 países (COST Action INFOGEST) desenvolveu um protocolo detalhado com orientação, recomendação, justificativa e limitações de um modelo estático. A intenção da criação desse protocolo era de que ele fosse fácil de reproduzir, fosse aplicado por grande parte dos cientistas e que os resultados dos laboratórios pudessem ser comparados (MINEKUS et al., 2014). Para validar este protocolo, ele foi aplicado em diversos laboratórios, o que confirmou que a harmonização do modelo melhorou a comparação dos dados e que a metodologia proposta era simples. Contudo, os autores destacaram que os dados para serem realmente validados precisam ser comparados com ensaios *in vivo* (EGGER et al., 2016).

Bohn *et al* (2017) revisaram a aplicação de modelos estáticos de digestão *in vitro* para avaliar a relevância dos dados gerados, quando comparados aos dados *in vivo*. Os autores concluíram que, embora esses modelos sejam muito simples e incapazes de reproduzir os aspectos dinâmicos do trato gastrointestinal, eles são úteis para prever a digestão *in vivo* em alguns casos.

O protocolo desenvolvido pela COST Action INFOGEST foi aprimorado a um protocolo INFOGEST 2.0 (BRODKORB et al., 2019), que também desenvolveu um modelo de digestão *in vitro* semidinâmico. O último inclui aspectos cinéticos cruciais associados com a fase de digestão gástrica, como o decréscimo gradual do pH, o esvaziamento gástrico e a secreção de fluidos e enzimas.

No entanto, é importante salientar que, no caso do protocolo INFOGEST 2.0, os autores destacaram que um método estático com um pH constante de 3,0 para a fase gástrica pode falhar em prever com precisão a sobrevivência do probiótico e que um valor de pH mais baixo ou um modelo gástrico dinâmico deve ser escolhido (BRODKORB et al., 2019).

1.4 APLICAÇÃO DE PROBIÓTICOS EM MATRIZES ALIMENTARES

Os probióticos podem ser consumidos como medicamento, como suplemento ou através de um alimento. Entretanto, a sua utilização através dos alimentos é percebida como uma forma mais natural e mais viável por parte dos consumidores. Além disso, os alimentos probióticos podem ser suplementados com uma ou várias cepas, mas é fundamental que eles sejam mantidos em uma quantidade adequada durante toda a sua vida de prateleira.

Os probióticos podem ser incorporados aos alimentos através de sua adição ao produto final (na forma liofilizada ou encapsulada) ou podem ser responsáveis pelo processo de fermentação e se multiplicarem no alimento durante o processo de produção (FLACH et al., 2018). A fermentação pode ser definida como “a produção de alimentos por meio do crescimento de microrganismos desejados e conversões enzimáticas de componentes alimentares” (MARCO et al., 2019).

Alguns fatores podem afetar a sobrevivência e a multiplicação dos probióticos nos alimentos, incluindo o conteúdo de gordura, pH, açúcar e tipo e concentração de proteínas (SOUZA; GIOIELLI; SAAD, 2017). Como exemplo, o uso de polpa de morango e de banana no desenvolvimento de bebidas não fermentadas probióticas pode ter prejudicado a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La-5 e de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e favorecido a viabilidade de *Lactobacillus casei* BGP93 no trabalho descrito por RIBEIRO et al. (2020).

Marinho et al (2017) demonstraram os benefícios dos antioxidantes na sobrevivência dos probióticos nos alimentos. Já a adição de fibras dietéticas provenientes de frutas e grãos favoreceu a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4357D-5 no sorvete armazenado por 60 dias a -20°C. No entanto, essas mesmas fibras não tiveram efeito positivo na

sobrevivência de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* ATCC 27536 incorporado no produto.

Produtos lácteos são atualmente a matriz alimentar mais comum para a adição de probióticos. Porém, o número expressivo de pessoas intolerantes à lactose ou alérgicas à proteína do leite, ou mesmo a mudança de hábitos alimentares como o veganismo, limitam o consumo destes alimentos, justificando o desenvolvimento produtos não lácteos (MIN et al., 2019; RANADHEERA et al., 2017).

Para se ter uma ideia da mudança de comportamento dos consumidores, segundo dados do Euromonitor (2019), no Brasil, a categoria de bebidas vegetais apresentou um crescimento de 35% entre 2013 e 2018.

Vale destacar que alimentos lácteos são fontes de compostos biológicos ativos, tais como imunoglobulinas, proteínas do soro, peptídeos e lipídios

Entre os alimentos lácteos, os leites fermentados são os principais alimentos nos quais os probióticos são incluídos (VINDEROLA; REINHEIMER; SALMINEN, 2019). Entretanto, outros alimentos lácteos e não lácteos, como queijo *petit-suisse* (VILLARREAL et al., 2013), produto fermentado de soja (BEDANI; ROSSI; SAAD, 2013), sorvete simbiótico (MATIAS et al., 2016), sobremesa de açaí (VASCONCELOS et al., 2014), margarina (SOUZA; GIOIELLI; SAAD, 2017), sorvete de leite de cabra (DA SILVA et al., 2014), queijo tipo mascarpone (DE ALMEIDA et al., 2018) também são bons veículos para diversas cepas probióticas.

Ressalta-se, ainda, que a utilização de probióticos pode ser vantajosa, não só pelas suas características funcionais, como também por suas propriedades tecnológicas (GUIMARÃES et al., 2020).

1.5 ALIMENTOS SEM LACTOSE

Os produtos lácteos ainda constituem os principais alimentos probióticos disponíveis no mercado e a principal matriz estudada para a incorporação desses microrganismos. Inclusive, pode-se destacar o desenvolvimento de alimentos probióticos à base de leite de espécies não bovinas, como cabra, ovelha, asna e camela (RANADHEERA; NAUMOVSKI; AJLOUNI, 2018).

Salienta-se que o açúcar proveniente do leite e seus derivados não é absorvido pelo organismo na forma de lactose e precisa ser hidrolisado pela enzima intestinal β -galactosidase, dando origem à glicose e à galactose (DENG et al., 2015).

Aproximadamente 70% da população mundial diminui a capacidade de produzir a β -galactosidase durante a vida adulta, perdendo a capacidade de digerir a lactose. Os indivíduos que mantêm a capacidade de sintetizar a lactase durante a vida adulta são lactase persistentes, enquanto os demais indivíduos são lactase não persistente. A não persistência da enzima lactase depende do grupo étnico e não é uma doença e sim uma diferença genética (UGIDOS-RODRIGUEZ; MATAALLANA-GONZÁLEZ; SÁNCHEZ-MATA, 2018)

A intolerância à lactose reflete na ocorrência de sintomas como dor abdominal, diarreia e inchaço, após a ingestão da lactose, em indivíduos com incapacidade de digerir ou absorvê-la no intestino delgado (MISSELWITZ et al., 2019).

Há 3 causas para má digestão da lactose: primária, secundária e deficiência congênita. A deficiência primária é o tipo mais comum e ocorre com pessoas que tiveram níveis normais de lactase durante a infância e diminuem a produção de lactase com o passar dos anos. A deficiência secundária é normalmente uma condição temporária e pode ocorrer em consequência de doenças que causam algum tipo de dano à mucosa intestinal. Já a deficiência congênita é um distúrbio raro, onde a enzima lactase é baixa ou totalmente ausente desde o nascimento do indivíduo (HEYMAN, 2006).

Apesar de existirem diversos testes para identificar a intolerância à lactose, nenhum deles pode ser considerado ideal. Esse fato se dá em virtude de que mesmo o teste respiratório que mede a quantidade de hidrogênio liberado pelos pulmões devido à fermentação da lactose não digerida pela microbiota intestinal, pode ser influenciado por fatores confundidores (MATTAR; MAZO; CARRILHO, 2012).

Segundo o Instituto Nacional de Saúde, do Departamento de Saúde e Serviços Humanos do Estados Unidos (NIH), as evidências disponíveis sugerem que adultos e adolescentes diagnosticados com intolerância à lactose podem ingerir, em média, 12 g de lactose em dose única sem desenvolver sintomas ou com sintomas mínimos. No entanto, fatores como atividade da lactase, taxa de esvaziamento gástrico e tempo de trânsito intestinal, metabólitos bacterianos fecais e capacidade de absorção da mucosa do cólon podem influenciar na suscetibilidade dos sintomas de intolerância (SUCHY et al., 2010).

Para o tratamento da intolerância à lactose, pode-se diminuir o consumo de leite e seus derivados ou substituí-los por produtos isentos de lactose ou com baixo teor de lactose. No Brasil, os produtos isentos de lactose são aqueles que possuem menos de 100 mg de lactose por 100 g ou 100 mL do produto. Já os produtos com baixo teor de lactose são aqueles que possuem entre 100 mg e 1 g de lactose para cada 100 g ou 100 mL do produto (ANVISA, 2017).

Ademais, existem evidências de que a promoção do consumo de produtos lácteos sem lactose em países com alta prevalência de intolerância à lactose, além de promover benefícios à saúde, também promovem benefícios econômicos para a sociedade já que existe um mercado muito grande para estes produtos (DEKKER; KOENDERS; BRUINS, 2019).

Alguns estudos também sugerem a utilização de probióticos como tratamento adjuvante na intolerância à lactose. De acordo com a revisão sistemática realizada por Lei *et al* (2020), a suplementação com probióticos em pessoas com intolerância à lactose reduz as cólicas abdominais, diarreia, vômito, assim como o inchaço e a flatulência desses indivíduos.

Para a redução do teor de lactose, o método mais utilizado é a hidrólise pelo método enzimático catalisada pela enzima lactase (β -galactosidase), que pode ser aplicada no leite ou derivados sem tratamento prévio (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012).

A enzima β -galactosidase é amplamente distribuída na natureza, podendo ser encontrada em plantas, órgãos animais, leveduras, bactérias e fungos. No entanto, a extração desta enzima a partir de microrganismos é mais produtiva, sendo que a enzima obtida através de bactérias trabalha com um pH ótimo entre 2,5 e 5,4. É usada principalmente para a hidrólise do soro de leite ácido. A enzima extraída de fungos, por sua vez, possui atividade máxima em pH entre 6,0 e 7,0 e é mais adequada para hidrólise do leite e do soro de leite doce (SAQIB *et al.*, 2017). No Brasil, os microrganismos autorizados para a produção da enzima β -galactosidase são: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus oryzae* expresso em *Aspergillus niger*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces spp.* (ANVISA, 2014).

Vale destacar que a adição da enzima β -galactosidase pode melhorar a propriedade tecnológica dos alimentos já que os monossacarídeos formados pela hidrólise da lactose são fermentados mais facilmente. Consequentemente, ocorre uma redução do período de fermentação de produtos como o iogurte. O aumento da concentração de glicose e galactose também intensifica a doçura dos produtos, uma vez que esses açúcares são mais solúveis e também são menos propensos à cristalização (MLICHOVÁ; ROSENBERG, 2006). Ademais, pode haver melhora na cremosidade de produtos como o sorvete (CHIQUETTI *et al.*, 2016) e prevenir a arenosidade na sua textura, já que a glucose e a lactose são mais solúveis em baixas temperaturas (DEKKER; KOENDERS; BRUINS, 2019).

1.6 GELADOS COMESTÍVEIS COMO VEÍCULOS PARA CEPAS PROBIÓTICAS

O sorvete é um produto com sabor doce e textura macia, apreciado por todas as idades e amplamente consumido. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias e do Setor de Sorvetes - ABIS (2019) o consumo per capita de sorvete no Brasil no ano de 2019 foi de 5,29 L/ ano.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (ANVISA, 2005), os sorvetes ou gelados comestíveis são produtos congelados obtidos a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas ou de uma mistura de água e açúcar e que pode ser adicionado de outros ingredientes desde que não descaracterizem o produto.

O sorvete é considerado um alimento indulgente. Entretanto, devido a mudança de comportamento do mercado consumidor, cientistas e tecnólogos têm se empenhado para melhorar a sua qualidade funcional e nutricional. Pode-se destacar aqui o desenvolvimento do *frozen* iogurte como uma alternativa saudável para o sorvete (HARTEL; RANKIN; BRADLEY JR, 2017).

A estrutura coloidal do sorvete e seu armazenamento em baixa temperatura o tornam uma matriz promissora para aplicação de microrganismos probióticos e compostos bioativos (SOUKOULIS; FISK; BOHN, 2014). Além disso, a sua composição também contribui para a boa viabilidade das cepas probióticas, já que normalmente o sorvete é constituído de proteína do leite, gordura e lactose (CRUZ et al., 2009).

Estudos realizados com sorvetes têm apontado uma boa sobrevivência das culturas probióticas (ABOULFAZLI; SHORI; BABA, 2016; AFZAAL et al., 2020; BALTHAZAR et al., 2018). A manutenção da viabilidade das cepas probióticas também foi observada em gelados comestíveis desenvolvidos com leite cabra (DE PAULA *et al.*, 2020) e em sorvetes em que o leite em pó foi substituído por extrato de soja (MATIAS *et al.*, 2016). Da Silva *et al* (2014), inclusive, destacaram que a viabilidade dos probióticos nos sorvetes desenvolvidos com leite de cabra foi semelhante àquela nos sorvetes produzidos com leite de vaca reportadas na literatura.

Adicionalmente, Rodrigues *et al* (2020) demonstraram, por meio do simulador de ecossistema microbiano humano (SHIME), que o sorvete probiótico produzido com as cepas *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium animalis* BB-12 e inulina pode modular a microbiota intestinal, aumentando a quantidade de microrganismos benéficos.

No processo de fabricação dos sorvetes probióticos vários fatores como a competição por nutrientes com microrganismos *starters*, a exposição ao oxigênio durante a etapa de

fermentação e o oxigênio dissolvido na matriz, a composição da matriz, o estresse ácido provocado pelos ácidos orgânicos acumulados durante o processo de fermentação, a adição de estabilizantes e aromatizantes artificiais e a exposição a temperaturas extremas precisam ser controlados para manter o microrganismo probiótico viável em doses capazes de promover benefícios à saúde do consumidor (FIOCCO et al., 2020).

Sorvetes e sobremesas aeradas congeladas são considerados sistemas de alimentos coloidais estruturalmente complexos (GOFF, 2002). Um sorvete típico é composto de cristais de gelo (30%), bolhas de ar (50%), glóbulos de gordura (5%), matriz (15%) de fase não congelada, contendo açúcar, estabilizantes e proteínas do leite (KASPRZYK; MARKOWSKA; POLAK, 2016).

As principais etapas do processo de fabricação de sorvetes são: preparo do mix, pasteurização, homogeneização, resfriamento rápido a uma temperatura de 4°C, maturação de 12 horas ou mais, congelamento com batimento para incorporação de ar envase e armazenamento a -18°C (SOLER; VEIGA, 2001).

O *overrun* é o aumento percentual do volume do sorvete em relação à calda ou à mistura utilizada para a sua fabricação. Ele está relacionado à quantidade de ar incorporado durante o processo de fabricação e influencia nas propriedades físicas de derretimento e dureza do produto final. Vale destacar que não só a quantidade de ar que influencia esses parâmetros, mas também o tamanho e a distribuição das partículas de ar no sorvete (SOFJAN; HARTEL, 2004).

Já os cristais de gelo são responsáveis por promover o efeito refrescante e controlar a sua quantidade, distribuição e tamanho são fatores importantes para o desenvolvimento e manutenção de um produto com uma textura desejável (HARTEL; RANKIN; BRADLEY JR, 2017).

Com relação aos açúcares, eles possuem um impacto nas propriedades coligativas e afetam a cristalização do gelo, agindo como um crioprotetor. Além disso, exercem um papel essencial no aumento dos estímulos olfativo gustativo e retro nasal durante a ingestão do sorvete (SOUKOULIS; TZIA, 2018).

Alguns fatores podem afetar a viabilidade dos probióticos nos gelados comestíveis durante o processamento e armazenamento. Nessas etapas, os microrganismos são submetidos a diversas condições estressantes, como: o processo de congelamento, a concentração de açúcar e os efeitos osmóticos, o pH, acidez e a presença de oxigênio (principalmente no processo incorporação de ar) e de co-culturas (no caso de sorvetes fermentados) (MOHAMMADI et al., 2011). Cruz *et al* (2009) também destacam que é preciso dar atenção

à escolha dos ingredientes que compõem o sorvete, especialmente no que diz respeito às polpas e sucos de frutas que podem influenciar negativamente os aspectos sensoriais ou diminuir o pH do produto.

O *frozen yogurt*, também conhecido como sorvete de iogurte, é um produto lácteo produzido com os microrganismos *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgarius*, caracterizado pelo sabor ácido do iogurte e o efeito refrescante do sorvete (ISIK et al., 2011). O processo de elaboração do *frozen yogurt* é semelhante ao do sorvete, com exceção da etapa de fermentação presente no primeiro e ausente no segundo (SKRYPLONEK et al., 2019).

Frozen yogurts podem ser produzidos pelo método da acidificação direta e pelo método da acidificação indireta. No primeiro método, uma mistura base de sorvete é inoculada com uma cultura láctica *starter*, incubada, resfriada, batida, congelada e armazenada sob temperatura de congelamento. A acidificação indireta envolve a combinação entre mistura-base de sorvete e iogurte (iogurte natural ou leite fermentado), em proporções que variam de 5% a 70% (SOUKOULIS; TZIA, 2008).

Produtos lácteos são mais comuns no mercado de alimentos probióticos. Probióticos podem ser inseridos em alimentos como *frozen* e sorvetes, que podem ser produzidos com leites tanto com lactose como sem lactose. A utilização de leites sem lactose na fabricação de gelados comestíveis pode permitir o seu consumo por indivíduos com certo grau de intolerância à lactose, além de poder contribuir no alívio dos sintomas provocados por esta intolerância. Entretanto, a fermentação, assim como a diminuição ou a ausência da lactose, podem afetar a viabilidade dos probióticos nos gelados comestíveis (sorvetes ou *frozen*), bem como a tolerância dos probióticos às condições adversas do estômago e do intestino delgado.

Com o intuito de verificar a influência desses fatores associados ao veículo alimentício utilizado, é necessário que se observe a sobrevivência dos microrganismos probióticos durante o período de armazenamento, bem como as características do produto, garantindo a viabilidade das culturas sem alteração das características sensoriais do produto. Para se ter indícios sobre o potencial probiótico dos produtos *in vivo*, deve-se avaliar se as bactérias probióticas resistem às diferentes condições simuladas *in vitro* do trato gastrointestinal, quando incorporadas nos diferentes produtos estudados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da matriz de gelado comestível de base láctea sobre a viabilidade no produto e a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 a condições do trato gastrointestinal simuladas *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Comparar quatro tipos de formulações de gelados comestíveis probióticos de base láctea, com diferenças no tipo de leite (com lactose ou lactose + e sem lactose ou lactose -) e quanto à fermentação (não fermentado ou sorvete e fermentado ou *frozen*) quanto às suas características tecnológicas e aceitação sensorial.
- b) Avaliar a viabilidade das culturas probióticas nos diferentes produtos ao longo de seu período de armazenamento.
- c) Comparar a resistência dos probióticos nos produtos mantidos congelado por até 84 dias a $-18 \pm 3^{\circ}\text{C}$ frente às condições gástrica e entérica simuladas *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para o desenvolvimento das formulações foi utilizado o delineamento experimental 2^2 , constituído por dois fatores em dois níveis (presença ou ausência) para produção de quatro formulações, conforme apresentado na **tabela 1**: tipo de leite (com lactose ou lactose + e sem lactose ou lactose -) e fermentação (não fermentado ou sorvete e fermentado ou *frozen*).

Tabela 1 -Delineamento experimental para elaboração dos gelados comestíveis probióticos fermentados (*frozen*) e não fermentados (sorvete).

Formulação	Tipo de leite	Fermentação
SL+	Lactose +	-
FL+	Lactose +	+
SL-	Lactose -	-
FL-	Lactose -	+
+	Presente; -	Ausente

Foram produzidos três lotes de 4 kg de cada formulação de gelado comestível em ordem aleatória.

As 4 formulações foram suplementadas com a cultura ABT-5 (Christian Hansen, Hørsholm, Dinamarca), contendo as cepas probióticas *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e uma cultura *starter* de *Streptococcus thermophilus*. A referida cultura é liofilizada do tipo DVS (*Direct Set Vat* – para a adição direta nos produtos) e após aberta foi armazenada congelada. Decidiu-se, através de testes prévios, inocular 0,07% da cultura.

Para a produção dos sorvetes (com e sem lactose), a cultura foi adicionada após ser previamente ativada por inoculação em porções de 40 ml de leite em pó desnatado reconstituído, de acordo com as instruções do fabricante (20 g do leite em pó desnatado / 200 ml de água filtrada), com incubação a 37°C, por 2 horas, de forma a garantir uma população mínima de 10^7 UFC/g de cada cultura probiótica. Já para a produção dos *frozen*s (com e sem lactose), a calda foi inoculada com a cultura e incubada a 37° C até o estabelecimento do ponto final de fermentação designado em valor de pH de 5,0. A escolha desse valor de pH como ponto final seguiu a orientação de PEREIRA (2012), segundo a qual *frozen*s com pH final de 5,0 e 5,5 apresentam maior aceitação sensorial.

Os valores do pH foram monitorados a cada 1 hora e a curva de fermentação das formulações FL+ e FL- podem ser visualizadas nas figuras 1 e 2.

Figura 1- Curva de Fermentação do *frozen* com lactose (FL+) para n=3

Figura 2- Curva de Fermentação do *frozen* sem lactose (FL-) para n=3

3.2 FABRICAÇÃO DOS GELADOS COMESTÍVEIS

As principais etapas empregadas na fabricação dos gelados comestíveis (sorvete e *frozen yogurt*) encontram-se relacionadas na figura 3.

Para a produção dos gelados comestíveis, foram utilizados os ingredientes e as proporções descritas por PEREIRA (2012). As proporções de ingredientes utilizados podem ser verificadas na tabela 2.

Figura 3 -Principais etapas envolvidas na tecnologia de fabricação dos sorvetes e dos *frozens* probióticos.

É importante destacar que os gelados comestíveis sem lactose foram produzidos com creme de leite, leite integral e leite em pó desnatado sem lactose da mesma marca utilizada para produzir as formulações com lactose.

Tabela 2 - Proporção dos ingredientes utilizados na produção dos gelados comestíveis

Ingredientes	(%)
Leite integral ¹	74,4
Sacarose ²	11,0
Creme de leite (35% de gordura) ³	6,9
Leite em pó desnatado ⁴	3,9
Xarope de glicose ⁵	3,0
Estabilizante ⁶	0,5
Emulsificante ⁷	0,3
Total	100,0
*Aroma de Baunilha ⁸	0,18

¹Elegê (Lactalis do Brasil, Teutônia, Brasil); ²Açúcar União (Coopersucar União, Limeira, Brasil); ³Verde Campo (Verde Campo, Lavras, Brasil); ⁴Molico (Nestlé Ltda, Araçatuba, Brasil); ⁵Glucose Líquida (Marvi, Ourinhos, Brasil); ⁶Liga Neutra (Marvi, Ourinhos, Brasil) ⁷Marvi Gel Plus (Marvi, Ourinhos, Brasil); ⁸Aroma de baunilha (Wally, Carapicuíba, Brasil)

*O cálculo do aroma foi feito sobre a quantidade total do produto

A elaboração dos gelados comestíveis foi realizada conforme descrito por SOLER e VEIGA (2001), com adaptações. Para o preparo da calda, foram pesados os ingredientes de acordo com as proporções apresentadas na tabela 2, iniciando a mistura com os ingredientes líquidos, seguido da adição dos ingredientes sólidos, exceto o emulsificante/estabilizante. O estabilizante foi disperso em sacarose, na proporção de 5 vezes o seu peso e, só então, adicionado ao mix. Os ingredientes foram misturados até completa uniformização da massa em Thermomix TM31-4C (Vorwerk, Thousand Oaks, Estados Unidos). A massa obtida foi pasteurizada a 80°C por 25 segundos. A seguir, a temperatura da massa foi reduzida a 37° C e adicionada a cultura ABT-5, o emulsificante e o aroma de baunilha, sendo, então, misturada por mais 15 minutos. A mistura foi transferida para cabine refrigerada a 4 °C (Metalfrio, São Paulo, Brasil) para maturação entre 20 e 22 horas. Após o processo de maturação, a calda foi transferida para sorveteira GEL 9 (TELME - Codogno, Italia) para congelamento e aeração por aproximadamente 24 minutos. Os produtos foram acondicionados em embalagens plásticas individuais de polipropileno, com tampa, específicas para alimentos (75 mm de diâmetro, 33 mm de altura, 70 mL de volume total, Tries Aditivos Plásticos, São Paulo, Brasil) e armazenados por até 84 dias a -18°C ± 3°C.

3.3 PERÍODOS DE ANÁLISES DURANTE O ARMAZENAMENTO

As amostras foram armazenadas a $-18^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ por 84 dias e as análises foram conduzidas conforme cronograma da tabela 3.

Tabela 3- Cronograma das análises realizadas

Análises	Dias de amostragem durante o armazenamento	Lotes de cada formulação
Composição centesimal	7	3°
Fração de derretimento	21	1°, 2° e 3°
Viabilidade dos probióticos	1, 7, 14, 21, 42 e 84	1°, 2° e 3°
Análise Sensorial	7 e 42	3°
Padrões microbiológicos sanitários	1	3°
Acidez livre titulável e pH	1, 7, 21, 42 e 84	1°, 2° e 3°
Overrun	0	1°, 2° e 3°
Avaliação da resistência das culturas probióticas as condições gástricas e entéricas simuladas <i>in vitro</i>	7, 21, 42 e 84	2°

3.4 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Foram realizadas análises do teor de umidade, proteínas, gorduras e cinzas das quatro formulações produzidas.

O teor de umidade foi determinado a partir de amostras de 5 g por secagem a 70°C , em estufa a vácuo. A fração cinza foi determinada gravimetricamente pela incineração de 1 g de amostra a 550°C e a determinação de gordura foi realizada através do método Roesse-Gottlieb, que utilizando os frascos de Mojonnier, efetua a digestão alcalina com hidróxido de amônio e a extração etérea, e determina o teor de lipídios gravimetricamente. As proteínas foram determinadas através da análise de conteúdo de nitrogênio total pelo método de micro-Kjeldahl, utilizando o fator de conversão 6,38 (AOAC INTERNATIONAL, 2019).

O teor de carboidrato foi calculado por diferença entre 100 e a soma do conteúdo dos demais nutrientes (proteínas, gorduras, fibra alimentar, umidade e cinzas).

Essas análises foram realizadas por laboratório terceirizado reconhecido pelos órgãos competentes.

3.5 CÁLCULO DO VALOR ENERGÉTICO TOTAL

Para determinar o valor energético total das quatro formulações, os teores de macronutrientes foram convertidos em quilocalorias utilizando-se os fatores de Atwater: (4 kcal/g de carboidrato), (4 kcal/g de proteína) e (9 kcal/g de gordura) (ANVISA, 2003a).

3.6 DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ E DO pH

A determinação da acidez em ácido láctico foi realizada através da titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 M utilizando como indicador a fenolftaleína (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Os valores de pH foram obtidos por meio do medidor de pH Orion Modelo Three Stars (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA) com a utilização de eletrodo tipo penetração (Analyser, São Paulo, Brasil).

3.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LACTOSE

O teor de lactose das formulações elaboradas com ingredientes sem lactose foi determinado através do método enzimático, utilizando o kit Lactose/D-glicose (R-Biopharm).

Neste método a lactose é hidrolisada para D-glicose e D-galactose em pH 6,6 na presença de lactase (β -galactosidase). Em seguida, a D-galactose é oxidada a ácido D-galacturônico em pH 8,6 pelo nucleotídeo nicotinamida-adenina (NAD^+), que é reduzido a NADH. A concentração de lactose é determinada pela concentração estequiométrica com o NADH formado por meio da leitura por espectrofotometria a 340 nm (AOAC INTERNATIONAL, 2019).

Para as formulações produzidas com ingredientes com lactose, o teor de lactose foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de índice de refração (IR). A solução de Biggs-Szijarto foi adicionada para precipitar as frações dos componentes de gordura e proteína. As análises foram realizadas de acordo com o método ISO 22662:2007

Essas análises foram realizadas por laboratório terceirizado reconhecido pelos órgãos competentes.

3.8 *OVERRUN*

A proporção de ar incorporado à calda durante o batimento e congelamento simultâneos (*overrun*) foi obtida através do seguinte cálculo (GOFF; HARTEL, 2013):

$$\text{Overrun}(\%) = \frac{\rho_{calda} - \rho_{sorvete}}{\rho_{sorvete}} 100,$$

onde ρ = peso em 250 mL

3.9 FRAÇÃO DE DERRETIMENTO

A fração de derretimento foi avaliada, adaptando-se o método descrito por COSTA (2014), com a utilização de amostras com $55,0 \pm 0,50$ g de amostras de gelados comestíveis de cada lote produzido para as quatro formulações.

Durante as análises, as amostras armazenadas a $-18 \pm 3^\circ\text{C}$ foram retiradas do congelador e imediatamente dispostas sobre malha metálica de aproximadamente 5 mm de abertura, acomodada sobre o funil e uma proveta volumétrica graduada. O tempo de coleta dos primeiros 10,0 mL do produto derretido foi registrado e, a partir de então, medições do volume foram realizadas a cada 5 minutos. O coeficiente de derretimento foi calculado, considerando-se os volumes do produto liquefeito durante o período de ensaio, os quais foram plotados em gráficos bidimensionais, obtendo-se, assim, a fração de derretimento em mililitros por minutos (mL/min).

3.10 DETERMINAÇÃO DAS CONTAGENS POPULACIONAIS DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS E *STARTER*

Para a contagem de microrganismos probióticos e *starter*, a amostra de gelado comestível, previamente mantida em temperatura ambiente, de modo a permitir a retirada de uma alíquota, foi diluída na proporção 1:10, utilizando água peptonada 0,1% (p/v) como diluente. Diluições decimais subsequentes foram preparadas, utilizando o mesmo diluente e 1 mL de cada diluição das amostras foi semeado em profundidade (*pour plate*) em meio de cultivo específico para cada microrganismo.

Para a enumeração de *Lactobacillus acidophilus*, foi utilizado o ágar de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) formulado com a substituição de glicose por maltose (Difco, Le Pont de Claix, França), de acordo com o International Dairy Federation (IDF, 1995), após 48 horas de incubação (em aerobiose) a 37°C .

B. animalis Bb-12 foi enumerado utilizando ágar MRS (Oxoid Ltd. Basingstoke, Reino Unido) modificado pela adição de propionato de sódio e cloreto de lítio - ágar MRS-LP Vinderola e Reinheimer (1999), após 72 horas de incubação em anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid Ltd. Basingstoke, Reino Unido) a 37°C.

St. thermophilus foi monitorado utilizando-se ágar M17 com solução de lactose estéril (10% p/v) (Oxoid), em aerobiose a 37°C por 48 horas (RICHTER; VEDAMUTHU, 2001).

3.11 AVALIAÇÃO SENSORIAL

A avaliação sensorial foi realizada após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, conforme parecer consubstanciado número 3.3313.418 (Anexo A).

A avaliação das quatro formulações de gelados comestíveis foi realizada no 7º e 42º dia do armazenamento do terceiro lote. Esta avaliação também seria realizada no 84º dia. Entretanto, devido à pandemia de COVID-19, não foi possível realizar a análise sensorial nesse último período inicialmente previsto.

A análise foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial, localizado no Bloco 16 da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, em duas diferentes sessões (uma para cada período de armazenamento), com consumidores voluntários, utilizando escala hedônica estruturada de 9 pontos com variação de gostei muitíssimo (9 pontos) a desgostei muitíssimo (1 ponto) (HOUGH, 2010). O modelo de ficha utilizada no teste encontra-se em anexo (ANEXO B).

Foram oferecidas monadicamente aos consumidores, 2 amostras de aproximadamente 20 g, codificadas com 3 dígitos aleatórios, devidamente acondicionadas em embalagem própria para alimentos e mantidas em condições de refrigeração por um período de aproximadamente 15 minutos após a sua retirada do congelador. Participaram de cada sessão do estudo, 200 consumidores voluntários (provadores não treinados) de forma que cada formulação foi julgada 50 vezes.

Para a triagem dos consumidores voluntários, os critérios de inclusão foram: ter idade compreendida entre 18 e 60 anos, aceitar participar da pesquisa e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Já os critérios de exclusão adotados foram: possuir histórico de manifestação de alergia, intolerância ou qualquer outro tipo de restrição a algum ingrediente da formulação ou ter doença crônica (como diabetes, hipotireoidismo, hipertireoidismo, hipertensão ou outras); estar fazendo tratamento médico; estar gripado,

resfriado ou indisposto e ter entrado em contato, há menos de 1 hora, com materiais, alimentos ou cosméticos de cheiro forte.

3.12 DETERMINAÇÃO DOS PADRÕES MICROBIOLÓGICOS SANITÁRIOS PARA GELADOS COMESTÍVEIS

Para avaliar as condições sanitárias dos alimentos desenvolvidos, foram investigados os seguintes microrganismos: coliformes a 45°C, *Estafilococos* coagulase-positivos e *Salmonella* spp., conforme Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, que estabelece padrões microbiológicos sanitários para gelados comestíveis à base de leite (ANVISA, 2001). Esta resolução já foi revogada pela RDC nº 331, de 23 de dezembro de 2019, mas só entrou em vigor no dia 26 de dezembro de 2020, quase 1 ano após a fabricação dos gelados comestíveis.

Para análise de coliformes a 45°C e de *Estafilococos* coagulase-positivos, porções de 25 g dos gelados comestíveis (retiradas em condições de assepsia) foram homogeneizadas com 225 ml de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}), utilizando-se um “Bag Mixer” (Interscience). Diluições decimais subsequentes foram preparadas utilizando o mesmo diluente.

Alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para três tubos contendo o caldo lauril sulfato triptose (Oxoid) e incubadas a 35°C por 48h, para investigação de coliformes a 45°C. Após o período de incubação, uma alíquota do conteúdo de cada tubo que apresentou resultado positivo, foi transferida com o auxílio de uma alça, para um tubo contendo caldo EC (Oxoid), com incubação a 45°C em banho de água com agitação por 24 a 48 horas. Para calcular o número mais provável de coliformes fecais por grama de gelado comestível, foi utilizada a tabela NMP série 3 tubos (DOWNES; ITO, 2001).

Na contagem de *Estafilococos* coagulase-positiva, alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas na superfície de placas contendo ágar Baird-Parker (Oxoid) adicionado de telúrio de potássio 1% (10 mL/940 mL de meio) e gema de ovo (50 mL/940 mL de meio) e foram incubadas 35-37°C durante 48 horas (DOWNES; ITO, 2001).

Para a pesquisa de colônias suspeitas de *Salmonella* spp., porções de 25 g das amostras dos gelados comestíveis, retiradas em condições de assepsia, foram homogeneizadas com 225 ml de água peptonada tamponada 2% (pH $7,2 \pm 0,2$ a 25°C) e incubadas a 35-37°C durante 24 horas, para a etapa de pré-enriquecimento. Alíquotas de 1 ml e de 0,1 ml das diluições pré-enriquecidas foram, transferidas para tubos contendo 10 ml de caldo Rappaport-Vassiliadis -

RV (Oxoid) e incubadas a 35°C (alíquotas de 1 ml) e a 42°C (alíquotas de 0,1 ml) por 24 horas, para a etapa de enriquecimento. Alçadas de cada cultura do enriquecimento foram semeadas em placas contendo ágar sulfito de bismuto - SB (Oxoid), ágar Hektoen-Enteric - HE (Oxoid) e ágar Rambach® - RAM (Merck) a 35- 37°C por 24 horas. As colônias típicas de *Salmonella* spp. foram submetidas a testes bioquímicos e sorológicos para identificação quando necessário (DOWNES; ITO, 2001).

3.13 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DAS CULTURAS PROBIÓTICAS DE *Lactobacillus acidophilus* LA-5 E *Bifidobacterium* BB-12 ÀS CONDIÇÕES GÁSTRICAS E ENTÉRICAS SIMULADAS *IN VITRO*

Porções dos gelados comestíveis contendo a cultura probiótica foram submetidas à análise de resistência às condições gástrica e entérica simuladas de acordo com o método previamente descrito (BEDANI; ROSSI; SAAD, 2013).

Para os períodos de amostragem descritos na tabela 3, 10 ml de cada uma das amostras de gelados comestíveis foram diluídas em proporção 1:10 em NaCl 0,85% (p /v) e transferidas para frascos estéreis (3 etapas do ensaio *in vitro* em triplicata de amostras, totalizando 9 frascos para cada amostra em cada período de armazenamento).

O pH foi ajustado para o intervalo de 2,3-2,6 com HCl 1N (Merck). Foram adicionadas as enzimas pepsina (pepsina obtida de mucosa gástrica suína, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e lipase (Amano lipase obtida de *Penicillium camemberti*, Sigma-Aldrich) em concentrações 3 g/L e de 0,9 mg/L, respectivamente. Os frascos foram incubados a 37°C, sob agitação de 150 rpm (Banho Metabólico Dubnoff 304 D, Ethik, Vargem Grande Paulista, Brasil durante 2 horas, representando a fase gástrica. Após este período, o pH das amostras foi ajustado para o intervalo entre 5,4 e 5,7, utilizando solução alcalina [150 mL de NaOH 1N (Synth, Diadema, Brasil) e 14 g de PO₄H₂Na₂H₂O (Synth) e água destilada até 1 L. Bile (bile bovina, Sigma-Aldrich) e pancreatina (pancreatina obtida de pâncreas suíno, Sigma-Aldrich) foram adicionados em concentrações de 10 g/L e 1 g/L, respectivamente. As amostras foram incubadas, novamente, a 37°C, mantendo-se a agitação de 150 rpm por mais 2 horas, conduzindo-se a fase entérica 1. Finalmente, o pH foi ajustado para o intervalo entre 6,8 e 7,2, utilizando a mesma solução alcalina da etapa anterior. Foram adicionadas, novamente, bile e pancreatina, a fim de manter as concentrações de 10 g/L e 1 g/L, respectivamente. As amostras foram incubadas, novamente, a 37°C por 2 horas sob agitação, representando a fase entérica 2 e totalizando 6 horas de ensaio.

Para a contagem de *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium* Bb-12 sobreviventes às fases gástrica e entérica simuladas *in vitro*, alíquotas foram coletadas nos períodos de 0h, 2h, 4h e 6h e submetidas a diluições decimais sucessivas em água peptonada 0,1% (p/v). Uma alíquota de 1 mL de cada diluição das amostras foi semeada em profundidade (*pour plate*) em meio de cultivo específico para cada microrganismo conforme descrito no item 3.9.

Um esquema representativo da simulação é apresentado na figura 4.

Figura 4 -Esquema representativo da simulação *in vitro* das condições gástricas e entéricas

Solução Alcalina = 150mL de 1N NaOH + 14g de $PO_4H_2Na.2H_2O$ + q.s.p. H_2O para 1L

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com exceção dos resultados da composição centesimal, do teor de lactose e da contagem dos microrganismos indicadores, os demais resultados foram analisados através da estatística descritiva e expressos como média $\pm$ desvio padrão quando os dados possuíam distribuição normal ou como mediana e intervalo interquartil quando os dados possuíam distribuição não-normal.

Os resultados obtidos foram avaliados através do programa IBM SPSS Statistics versão 27 para Windows e um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Para analisar o resultado do *overrun* e da fração de derretimento, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguidos do teste de médias de Tukey, após a confirmação da homogeneidade de variâncias. A homogeneidade de variâncias entre as formulações foi

avaliada através do teste de Levene. No caso de heterogeneidade das variâncias foi utilizada ANOVA de Welch com comparação múltipla de Games-Howell.

A comparação dos parâmetros pH, de acidez titulável e da resistência dos microrganismos probióticos frente a condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, foi realizada através da ANOVA de 2 vias de medidas repetidas com posterior aplicação de Sidak.

Os resultados da viabilidade dos microrganismos probióticos e da cultura *starter* foram comparados através do teste não paramétrico, pois os dados não possuíam distribuição normal. As diferenças entre as formulações foram avaliadas em cada intervalo de tempo, através de teste de Kruskal-Wallis ANOVA e as diferenças entre os intervalos foram avaliadas para cada tratamento através de teste de Friedman ANOVA.

As comparações das características sensoriais foram realizadas através da ANOVA de duas vias de medidas repetidas. Entretanto, como não foi encontrada diferença entre os períodos de armazenamento para cada formulação e tampouco entre as formulações para os diferentes períodos de armazenamento, não foi necessário a aplicação de um teste *post hoc*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL, VALOR ENRGÉTICO E TEOR DE LACTOSE DOS GELADOS COMESTÍVEIS

A composição centesimal, o valor energético e o teor de lactose obtidos para as formulações estudadas podem ser visualizados na tabela 4.

Tabela 4- Composição centesimal (%), valor energético (Kcal/100g) e teor de lactose (%) das formulações SL+ (sorvete com lactose), FL+ (*frozen* com lactose), SL- (sorvete sem lactose) e FL- (*frozen* sem lactose)

Composição	Formulações			
	SL+	FL+	SL-	FL-
Umidade	68,56±0,08	70,23±0,04	70,45±0,03	71,12±0,03
Cinzas	0,96±0,01	0,96±0,00	0,98±0,00	0,89±0,01
Lipídeos	3,79±0,23	4,09±0,33	4,20±0,12	4,31±0,13
Proteína	3,66±0,09	3,60±0,08	3,23±0,02	3,21±0,11
Carboidratos	23,03±0,39	21,12±0,41	21,14±0,18	20,47±0,33
Valor Energético	140,87±2,03	135,69±0,33	135,28±0,22	133,51± 0,17
Teor de lactose	2,73±0,01	3,21±0,00	0,27±0,01	0,39±0,03

De acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (USP; FORC, 2020), os sorvetes industrializados no Brasil (média de diferentes sabores) possuem percentual de cinzas (0,87%), carboidratos (26,6%) e proteínas (3,50%) semelhantes, teor inferior de umidade (58,9%) e porcentagem de lipídeos (10,1%) e valor energético total (209 Kcal/100g) superiores aos das 4 formulações desenvolvidas. Sendo assim, os gelados comestíveis desenvolvidos apresentaram-se vantajosos com relação ao seu teor lipídico e valor energético reduzidos. O menor teor de lipídeos nas formulações desenvolvidas pode ser explicado pela utilização somente do creme de leite fresco e do leite integral como fontes de gordura e pela utilização de leite em pó desnatado.

Chiquetti *et al* (2016) encontraram teores semelhantes de umidade (78,64%), proteína (3,71%) e cinzas (0,83%), porcentagem inferiores de carboidratos (12,62%) e superiores de lipídeo (8,20%) no sorvete probiótico produzido com *L.acidophilus* La-5 e hidrólise da lactose. Ayar *et al* (2018) observaram que a adição de probióticos aos sorvetes não modifica sua composição centesimal. Além disso, o Regulamento Técnico para Gelados Comestíveis e Preparados para Gelados Comestíveis ANVISA (2005) não estabelece limite para nenhum destes compostos.

De acordo com a Resolução nº 135, de 8 de fevereiro de 2017 da ANVISA (2017), alimentos que contêm quantidade de lactose maior que 100 mg/100g e igual ou menor que

1g/100g podem ser considerados com baixo teor de lactose. Sendo assim, apesar das formulações SL- e FL- terem sido produzidas com ingredientes isentos de lactose, elas não podem ser consideradas alimentos isentos de lactose e sim apenas com baixo de teor de lactose. Isso pode ter acontecido devido à somatória das quantidades de lactose residual presente em todos os ingredientes utilizados (leite integral, creme de leite e leite em pó).

De acordo com Hartel, Rankin e Bradley Jr (2017), de forma geral, a porcentagem de lactose nos sorvetes é próxima a 8%. Desta forma, os gelados comestíveis desenvolvidos com ingredientes lácteos contendo lactose obtiveram um menor teor de lactose.

4.2 VALORES DE ACIDEZ E pH

Os valores de acidez em ácido láctico e pH dos gelados comestíveis (SL+, FL+, SL- e FL-) durante o armazenamento a $-18^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ por 84 dias são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 -Valores de pH e acidez obtidos (Média $\pm$ Dp) para as formulações SL+ (soverte com lactose), FL+ (*frozen* com lactose), SL- (sorvete sem lactose) e FL- (*frozen* sem lactose), durante os 84 dias de armazenamento a $-18^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Período de Armazenamento (dias)	SL+	FL+	SL-	FL-
pH				
1	6,28 $\pm$ 0,15 ^{Ba}	5,06 $\pm$ 0,16 ^{Ca}	6,70 $\pm$ 0,18 ^{Aa}	5,08 $\pm$ 0,09 ^{Ca}
7	6,52 $\pm$ 0,13 ^{Aa}	5,11 $\pm$ 0,17 ^{Ba}	6,50 $\pm$ 0,91 ^{Aa}	5,09 $\pm$ 0,14 ^{Ba}
21	6,45 $\pm$ 0,25 ^{Aa}	5,15 $\pm$ 0,25 ^{Ba}	6,51 $\pm$ 0,22 ^{Aa}	5,08 $\pm$ 0,21 ^{Ba}
42	6,43 $\pm$ 0,31 ^{Ba}	5,00 $\pm$ 0,33 ^{Ca}	6,89 $\pm$ 0,39 ^{Aa}	5,26 $\pm$ 0,25 ^{Ca}
84	6,30 $\pm$ 0,49 ^{Aa}	5,16 $\pm$ 0,29 ^{Ba}	6,87 $\pm$ 0,36 ^{Aa}	5,19 $\pm$ 0,39 ^{Ba}
Acidez (% ácido láctico)				
1	0,25 $\pm$ 0,03 ^{Ca}	0,69 $\pm$ 0,05 ^{Ba}	0,21 $\pm$ 0,14 ^{Da}	0,72 $\pm$ 0,46 ^{Aa}
7	0,26 $\pm$ 0,03 ^{Ca}	0,68 $\pm$ 0,05 ^{Ba}	0,21 $\pm$ 0,19 ^{Da}	0,71 $\pm$ 0,05 ^{Aa}
21	0,26 $\pm$ 0,03 ^{Ca}	0,70 $\pm$ 0,06 ^{Ba}	0,22 $\pm$ 0,01 ^{Da}	0,73 $\pm$ 0,05 ^{Aa}
42	0,26 $\pm$ 0,04 ^{Ca}	0,70 $\pm$ 0,06 ^{Ba}	0,22 $\pm$ 0,01 ^{Da}	0,72 $\pm$ 0,05 ^{Aa}
84	0,26 $\pm$ 0,04 ^{Ca}	0,70 $\pm$ 0,05 ^{Ba}	0,21 $\pm$ 0,01 ^{Da}	0,73 $\pm$ 0,05 ^{Aa}

^{A,D} Letras maiúsculas distintas em uma mesma linha indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$)

^a Letras minúsculas distintas em uma mesma coluna indicam diferenças significativas entre os dias de armazenamento ($p < 0,05$)

Conforme esperado, as formulações não fermentadas obtiveram valores de pH superiores e de acidez inferiores àqueles das formulações não fermentadas ($p < 0,05$) e não houve diferença significativa ao longo da vida de prateleira em nenhuma das 4 formulações ($p < 0,05$). De forma geral, não foi observada a influência da lactose no pH das formulações ($p > 0,05$). Já a lactose influenciou os valores de acidez titulável ($p < 0,05$).

Ao compararmos as formulações não fermentadas (SL+ e SL-), os valores de acidez são inferiores ($p < 0,05$) naquelas sem lactose. De maneira semelhante Chiquetti *et al* (2016) observou valores de acidez inferiores ($p < 0,05$) no sorvete contendo *Lactobacillus acidophilus* La-5 com a lactose hidrolisada que os valores encontrados nos sorvetes onde não foi realizada a hidrólise da lactose.

Já nas formulações fermentadas (FL+ e FL-) os valores de acidez são superiores ($p < 0,05$) na formulação sem lactose. Uma possível explicação para os maiores teores de acidez, seria o maior tempo de fermentação das formulações sem lactose, que levaram em média meia hora a mais para atingir o pH 5,0 que as formulações com lactose. Neste tempo, as bactérias lácticas podem ter produzido uma maior quantidade de ácido láctico.

Devido à produção de ácido láctico por parte das bactérias lácticas, quanto maior a acidez titulável encontrada em um produto lácteo fermentado menor será o valor do pH (PEREIRA *et al.*, 2012).

Nas formulações de sorvete suplementadas com o probiótico *Lactobacillus casei* ATCC 39392 produzidas por Gheisari *et al.* (2016), os valores de pH encontrados foram semelhantes aos dos gelados comestíveis produzidos neste trabalho (variando entre 6,43 e 6,68). Entretanto, ao contrário do que foi aqui observado, os autores observaram a influência do período ($p < 0,05$) durante os 90 dias de armazenamento.

Com relação aos gelados fermentados, Terpou *et al.* (2019) obtiveram valores de pH inferiores (em torno de 4,5). Entretanto, essa diferença encontrada pode ser explicada pelo método utilizado para a produção do *frozen* iogurte. Os autores utilizaram acidificação indireta para sua confecção, ou seja, o produto foi elaborado através da combinação entre a mistura base de sorvete e iogurte natural na proporção de 50%. Já no presente trabalho, utilizou-se o método de acidificação direta, ou seja, inoculação da cultura ABT-5 (contendo *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium animalis* Bb-12 e uma cultura starter de *Streptococcus thermophilus*) diretamente na calda, com incubação a 37°C até ser atingido pH 5,0, método este mais utilizado pelas indústrias.

Soukoulis e Tzia (2008) afirmaram que o iogurte *frozen* produzido pelo método de acidificação direta possui uma acidez maior que o produzido pelo método de acidificação indireta. No entanto, Isik *et al* (2011) encontraram valores de acidez semelhantes ao deste trabalho (variando entre 0,69% e 0,72%) para os 5 iogurte *frozen* produzidos.

Não existe, até o presente momento, na legislação brasileira uma regulamentação para o valor mínimo de acidez em iogurte *frozen*. Entretanto, de acordo com Pereira (2012), as indústrias norte-americanas utilizam o valor mínimo de 0,30% de acidez titulável. Desta

forma, os dois *frozen* desenvolvidos neste trabalho (FL- e FL+) são compatíveis com os produzidos nas indústrias americanas já que obtiveram valores de acidez entre 0,68% e 0,73% durante todo o período estudado.

4.3 OVERRUN E FRAÇÃO DE DERRETIMENTO

Os valores de incorporação do ar (*overrun*) obtidos durante a produção das formulações dos gelados comestíveis, assim como os valores da fração de derretimento, cuja análise foi realizada no 21º dia de armazenamento, podem ser verificados na tabela 6.

Foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os valores de *overrun* das formulações fermentadas e não fermentadas, sendo observados valores inferiores para as formulações fermentadas. A fermentação também influenciou no tempo de derretimento dos gelados comestíveis, o qual foi menor para os *frozens* FL+ e FL-, em comparação àquele dos sorvetes SL+ e SL- ($p < 0,05$).

Apesar de Dekker, Koender e Bruins (2019) terem destacado que a hidrólise da lactose aumenta a quantidade de monossacarídeos, diminuindo o ponto de congelamento e o tempo de derretimento dos gelados comestíveis, não foi observada influência da lactose ($p > 0,05$), tanto no *overrun* quanto na taxa de derretimento.

Hashemi; Gheisari e Shekarforoush (2015) não encontraram influência da adição de probióticos na taxa de derretimento dos sorvetes desenvolvidos. No entanto, vários fatores, como o *overrun*, o conteúdo de gordura e o tipo de leite, influenciam a fração de derretimento (DA SILVA et al., 2014). O aumento do *overrun* diminui significativamente a taxa de derretimento do sorvete (WU; FREIRE; HARTEL, 2019). Desta forma os resultados de taxa de derretimento obtidos são consistentes com os resultados do *overrun* encontrados.

Segundo Sofjan e Hartel (2004), uma potencial causa para uma menor taxa de derretimento nas formulações com maior *overrun*, é a diferença da taxa de transferência de calor, em virtude da presença do ar, uma vez que o ar é um bom isolante.

Tabela 6 -Valores de *overrun* e da fração de derretimento obtidos (média $\pm$ DP) para SL+ (sorvete com lactose), FL+ (*frozen* com lactose), SL- (sorvete sem lactose) e FL- (*frozen* sem lactose)

SL+	FL+	SL-	FL-
Overrun (%)			
40,08 $\pm$ 2,61 ^A	27,42 $\pm$ 2,42 ^B	41,25 $\pm$ 2,20 ^A	25,27 $\pm$ 1,21 ^B
Fração de Derretimento (mL/min)			
0,71 $\pm$ 0,05 ^B	1,19 $\pm$ 0,11 ^A	0,67 $\pm$ 0,08 ^B	1,30 $\pm$ 0,22 ^A

^{A,B} Letras maiúsculas distintas em uma mesma linha indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$)

Uma possível explicação para a diferença de *overrun* observada entre os produtos fermentados e os não fermentados é a produção de exopolissacarídeos por certas cepas de bactérias lácticas. Uma grande variedade de bactérias lácticas é capaz de produzir polissacarídeos extracelulares com diversas composições químicas e propriedades, que são capazes de alterar as propriedades reológicas da matriz em que estão inseridas (CAGGIANIELLO; KLEEREBEZEM; SPANO, 2016). Che *et al* (2019), inclusive, destacaram o impacto significativo e o potencial de aplicação de exopolissacarídeos para estabilização de produtos lácteos fermentados.

Diferentes cepas de *Streptococcus thermophilus* podem produzir diferentes quantidades de exopolissacarídeos. Sua síntese se inicia após um tempo de fermentação, dependendo da disponibilidade de nutrientes e das condições de fermentação. Khanal e Lucey (2017) avaliaram a produção de exopolissacarídeos de 2 cepas de *Streptococcus thermophilus* (St-143 e ST-10255y). Os autores concluíram que a produção de exopolissacarídeos se iniciava quando o pH atingia um valor de aproximadamente 5,3, valor este que foi atingido para as formulações FL+ e FL-, e que a quantidade aumentava até o final da fermentação.

Os exopolissacarídeos aumentam a viscosidade da calda, tornando-a gelatinosa devido à formação de uma rede estabilizada da proteína caseína e a distribuição restrita de proteínas na interface ar—água, (devido a sua participação na rede de proteína). Esse fato pode explicar uma menor aeração das formulações fermentadas (SOUKOULIS; TZIA, 2008).

Na legislação brasileira, o *overrun* é denominado como densidade aparente e deve apresentar o valor máximo de 475 g/ L ou 52,5% (ANVISA, 2005). Neste trabalho, as percentagens de *overrun* das 4 formulações estão de acordo com o estipulado na legislação brasileira

Além disso, Ferraz *et al.* (2012) relataram que os valores de *overrun* utilizados na elaboração de gelados comestíveis influenciaram na sobrevivência da cepa *L. acidophilus* DOWARU™ durante os 60 dias de armazenamento a -18°C. Apesar dessa observação, os autores concluíram que a contagem do microrganismo probiótico não apresentou diferença significativa durante a vida de prateleira nas amostras produzidas com *overrun* de 45%.

Overrun semelhantes foram encontradas por Da Silva *et al* (2014) nos sorvetes probióticos de leite de cabra (48%), utilizando a cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1. Já nos sorvetes probióticos de leite de cabra com cajá contendo as culturas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* ou *Lactobacillus paracasei* De Paula *et al* (2020) observaram valores de *overrun* menores e próximos aos valores encontrados nas formulações fermentadas aqui descritas, 29% e 28% respectivamente. Quando a formulação foi modificada

substituindo-se o creme de leite caprino por inulina estes valores tornaram-se ainda menores (em torno de 17%).

Conforme descrito por Muse e Hartel (2004), inicialmente o gelo derrete na parte externa do sorvete e ocorre um resfriamento local e a água do gelo derretido se funde na fase sérica descongelada e esta solução flui para baixo devido à gravidade.

O fluxo desta solução diluída é inicialmente sobre o exterior do sorvete e somente quando o calor consegue penetrar no sorvete que acontece o derretimento dos cristais de gelo do interior do sorvete (MUSE; HARTEL, 2004).

Soler e Veiga (2001) destacaram que um derretimento ideal deve formar um líquido homogêneo, com boa fluidez, com a mesma aparência da calda e com pouca espuma. Todas as formulações desenvolvidas apresentaram estas características, conforme pode ser visualizado na figura 5.

Figura 5 - Imagem de uma amostra de gelado comestível após o teste de derretimento

4.4 CONTAGENS POPULACIONAL DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS E STARTER

Os resultados da viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e da cultura starter *Streptococcus thermophilus* para as 4 formulações de gelado comestível durante o período de armazenamento podem ser visualizados na tabela 7.

Tabela 7- Viabilidade (Mediana (1° quartil - 3° quartil)) de *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e da cultura *starter* de *Streptococcus thermophilus* (log UFC/g) para SL+ (sorvete com lactose), FL+ (*frozen* com lactose), SL- (sorvete sem lactose) e FL- (*frozen* sem lactose) ao longo do período de armazenamento

Cepa	Dias	Formulação			
		SL+	FL+	SL-	FL-
La-5	1	7,16 (6,46-7,38) ^{BCa}	7,75 (7,47-7,85) ^{Aa}	6,89 (6,32-7,15) ^{Ca}	7,44 (7,23-7,64) ^{ABa}
	7	7,10 (6,38-7,16) ^{Bab}	7,73 (7,40-7,85) ^{Aa}	6,37 (6,30-6,88) ^{Bab}	7,38 (7,04-7,80) ^{Aa}
	14	7,10 (6,33-7,27) ^{BCab}	7,71 (7,26-7,87) ^{Aa}	6,43 (6,30-6,89) ^{Cab}	7,11 (7,06-7,55) ^{ABa}
	21	7,06 (6,37-7,27) ^{BCab}	7,71 (7,41-7,86) ^{Aa}	6,12 (6,06-6,68) ^{Cb}	7,13 (6,99-7,51) ^{Ba}
	42	6,45 (6,38-7,19) ^{Cb}	7,73 (7,49-7,84) ^{Aa}	6,54 (6,18-6,85) ^{Cab}	7,26 (6,88-7,50) ^{Ba}
	84	6,83 (6,52-7,03) ^{BCab}	7,73 (7,28-7,81) ^{Aa}	6,49 (6,19-6,68) ^{Cb}	7,02 (6,92-7,51) ^{ABa}
Bb-12	1	7,40 (7,28-7,99) ^{Aa}	6,94 (6,90-7,10) ^{Bbc}	7,64 (7,05-7,88) ^{ABa}	6,44 (6,36-6,55) ^{Cab}
	7	7,38 (7,16-7,82) ^{Aab}	7,22 (7,08-7,27) ^{Aab}	7,38 (6,51-7,78) ^{Ab}	6,34 (6,29-6,51) ^{Bab}
	14	7,22 (7,15-7,78) ^{Ab}	7,14 (6,89-7,37) ^{Aabc}	7,14 (6,80-7,51) ^{Ab}	6,49 (6,12-7,01) ^{Bab}
	21	7,31 (7,19-7,78) ^{Ab}	6,96 (6,57-7,12) ^{Bc}	6,86 (6,78-7,30) ^{ABb}	6,24 (6,05-6,61) ^{Cb}
	42	7,24 (7,15-7,67) ^{Ab}	7,03 (6,53-7,87) ^{ABabc}	7,42 (6,95-7,55) ^{Aab}	6,59 (6,34-7,00) ^{Ba}
	84	7,37 (7,22-7,80) ^{Aab}	7,09 (6,99-7,98) ^{Aa}	7,42 (6,94-7,65) ^{Aab}	6,42 (6,32-6,95) ^{Bab}
Cultura Starter	1	7,92 (7,80-8,14) ^{Ba}	8,72 (8,29-9,45) ^{ABa}	7,11 (7,02-7,19) ^{Ca}	9,09 (9,05-9,25) ^{Aa}
	7	7,75 (7,55-7,96) ^{Bab}	8,91 (8,60-9,14) ^{Aa}	6,98 (6,75-7,09) ^{Ba}	9,10 (9,03-9,18) ^{Aa}
	14	7,38 (7,15-7,68) ^{Bb}	8,83 (8,69-9,04) ^{Aa}	6,97 (6,61-7,03) ^{Ba}	9,08 (8,98-9,15) ^{Aab}
	21	7,85 (7,34-8,14) ^{Bab}	8,85 (8,74-9,95) ^{Aa}	7,02 (6,60-7,08) ^{Ba}	9,05 (8,94-9,10) ^{Aab}
	42	7,91 (7,13-8,52) ^{Bab}	8,91 (8,84-8,96) ^{Aa}	6,88 (6,66-7,03) ^{Ba}	9,08 (9,00-9,11) ^{Aab}
	84	7,31 (7,04-7,91) ^{Bab}	8,82 (8,70-8,99) ^{Aa}	6,81 (6,74-7,03) ^{Ba}	8,97 (8,95-8,99) ^{Ab}

^{A,D} Letras maiúsculas distintas em uma mesma linha indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$)

^a Letras minúsculas distintas em uma mesma coluna indicam diferenças significativas entre os dias de armazenamento ($p < 0,05$)

Até o final do armazenamento, a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La-5 permaneceu superior a 6,45, 7,71, 6,12 e 7,02 log UFC/g e a de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 permaneceu superior a 7,22, 6,94, 6,86 e 6,24 log UFC/g, respectivamente, nas formulações SL+, FL+, SL- e FL-. Considerando uma porção diária de 60 g de sorvete, isto equivaleria a um valor superior a 8 log UFC/ dia. Embora não exista um consenso sobre a quantidade mínima necessária de células probióticas viáveis, os níveis aceitos normalmente ficam entre 10^6 a 10^9 UFC/g.

As variações entre as populações da cultura *Lactobacillus acidophilus* La-5 nos produtos fermentados (FL+ e FL-) não foram significativas ($p > 0,05$) ao longo do período de armazenamento. Nos produtos não fermentados, houve uma redução estatisticamente significativa para SL- no 84º dia de armazenamento ($p < 0,05$). Entretanto, essa redução foi inferior a 0,50 ciclo log.

Para *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, só foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) ao final do período de armazenamento para a formulação FL+, mas esta diferença correspondeu a um aumento de 0,15 ciclo log.

Com relação à cultura starter de *St. thermophilus*, não houve variação na viabilidade do microrganismo ($p > 0,05$) durante todo o período de armazenamento.

Comparando-se as diferentes formulações, tanto o probiótico *Lactobacillus acidophilus* La-5 como a cultura starter obtiveram uma melhor viabilidade nas formulações fermentadas (FL+ e FL-) em todos os períodos analisados. Já para *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, observou-se as maiores populações nas formulações com lactose (SL+ FL+). Essa diferença já era esperada já que, de acordo com Aboufazli, Shori, Baba (2016), lactose e sacarose são os primeiros açúcares consumidos pelos probióticos durante a fermentação.

No entanto, a influência da lactose não foi observada na sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* La-5, corroborando com o trabalho de Chiquetti (2016), que observou que a hidrólise da lactose não influenciou na sobrevivência deste microrganismo incorporado ao sorvete.

A melhor viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La-5 nas formulações fermentadas pode ser atribuída aos menores valores de pH. Ayar *et al* (2018) também observaram uma melhor viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4357D-5 nos sorvetes com menores valores de pH.

Segundo Gopal (2011), a multiplicação de *Lactobacillus acidophilus* é beneficiada pelos metabólitos produzidos por *St. thermophilus*, como o ácido fórmico e, possivelmente, dióxido de carbono e piruvato. Esses compostos reduzem o pH dos gelados comestíveis, o que estimula a multiplicação de *L. acidophilus* La-5.

O estudo da influência da lactose e/ou da fermentação na viabilidade dos probióticos é importante, já que a identificação dos fatores que afetam negativamente a sobrevivência dos probióticos nas matrizes alimentares auxilia no desenvolvimento de estratégias para a melhoria de cepas e otimização de processos de produção (NG; YEUNG; TONG, 2011).

A manutenção da viabilidade dos microrganismos *B. animalis* Bb-12 e *L. acidophilus* La-5 nos gelados comestíveis pode ser explicada pela composição do produto. De acordo com Da Silva et al (2014), matrizes alimentares que contém caseínas, sacarose e lactose podem ter um efeito crioprotetor e preservar células do probióticos viáveis durante o armazenamento. Ademais, Tripathi e Giri (2014) afirmaram que microrganismos probióticos podem sobreviver durante muito tempo em produtos congelados.

Matias et al. (2016) também demonstraram que sorvetes simbióticos de maçã são uma boa matriz para as cepas probióticas *B. animalis* Bb-12 e *L. acidophilus* La-5. No trabalho desenvolvido por esses autores, a viabilidade dos dois microrganismos manteve-se em torno de 8,5 log UFC/ g e de 7,5 log UFC/ g, respectivamente, durante 84 dias de armazenamento.

Similarmente ao observado neste trabalho, Vasconcelos *et al* (2014) não encontraram influência do tempo de armazenamento na sobrevivência das cepas *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, quando incorporados a uma sobremesa congelada de açaí. Os microrganismos permaneceram em uma quantidade superior a 6,11 log UFC/g durante os 84 dias avaliados.

Já nos sorvetes (sendo 1 probiótico e 3 simbióticos) desenvolvidos por Hashemi; Gheisari e Shekarforoush (2015), a viabilidade de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 manteve-se constante por 60 dias de armazenamento. Entretanto, houve uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,01$) da população do probiótico, nos últimos 30 dias de armazenamento nas 4 formulações. Eles atribuíram esta redução ao processo de congelamento que pode danificar as células devido a formação de cristais de gelo.

Akalin et al. (2018) observaram, ao final de 180 dias de armazenamento, uma diminuição das células viáveis dos probióticos *B. animalis* Bb-12 e *L. acidophilus* La-5 incorporadas a sorvetes fermentados probióticos adicionados de fibra dietética. Das 6 formulações desenvolvidas, 4 delas obtiveram uma população de Bb-12 abaixo de 6,0 log UFC/g após 150 dias de armazenamento. Rezaei et al. (2014) também encontraram uma influência do tempo de armazenamento na viabilidade dos microrganismos *B. animalis* Bb-12 e *L. acidophilus* La-5 incorporados ao *frozen* iogurte nas 3 formulações desenvolvidas (tanto na formulação controle como nas suplementadas com inulina). Esses autores observaram uma redução maior na população de *B. animalis* Bb-12 que na população de *L. acidophilus* La-5.

Os diversos valores de sobrevivência dos microrganismos probióticos observadas em produtos desenvolvidos, mesmo quando a mesma cepa probiótica é utilizada, pode ser atribuído a diferença da tecnologia utilizada no processo de produção, aos diferentes valores de pH e a composição dos alimentos (GHEISARI et al., 2016).

4.5 RESISTÊNCIA DAS CULTURAS PROBIÓTICAS DE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS LA-5 E BIFIDOBACTERIUM BB-12 ÀS CONDIÇÕES GÁSTRICAS E ENTÉRICAS SIMULADAS IN VITRO

A evolução da população das culturas probióticas *B.animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e *L.acidophilus* La-5 e frente às condições gástrica e entéricas simuladas *in vitro*, nas 4 formulações desenvolvidas, estão ilustradas nas figuras 6 e 7, respectivamente.

Figura 6 - Sobrevivência de *B.animalis* subsp. *lactis* Bb-12 em SL+ (sorvete com lactose), FL+ (frozen com lactose), SL- (sorvete sem lactose) e FL- (frozen sem lactose) durante o armazenamento a -18°C por 7,21,42 e 84 dias, antes (viabilidade) e durante o ensaio *in vitro* com simulação das condições gástricas e entéricas.

^{A,B} Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$) para cada período de armazenamento

^{a,b} Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os períodos de ensaio para cada formulação ($p < 0,05$)

De forma geral, *B.animalis* subsp. *lactis* Bb-12 apresentou redução da população ($p < 0,05$) ao final das 6 horas de ensaio em todas as formulações e em todos os períodos avaliados (7,21,42 e 84 dias). A maior população sobrevivente após 6 horas de ensaio (após a fase entérica II) foi encontrada para a formulação FL+ (5,83 UFC/g) e a menor para a formulação FL- (3,16 UFC/g), ambas ao final de 84 dias de armazenamento. Isto representa uma redução entre 1,23 e 3,30 log UFC durante a simulação.

Com relação à cepa *L. acidophilus* LA-5 na fase gástrica (2h de ensaio), as formulações não fermentadas tiveram redução significativa ($p < 0,05$) em todos os períodos analisados, sendo a maior redução observada de 1,84 e 2,73 log UFC, respectivamente, para as formulações SL+ e SL- ao final de período de armazenamento (84 dias).

Já nas formulações fermentadas (FL+ e FL-), de forma geral, não houve redução significativa ($p < 0,05$). Isso pode ser explicado pela diferença de pH das formulações, ou seja, o microrganismo pode ter se adaptado previamente ao ambiente mais ácido e tolerado melhor a acidez estomacal.

No entanto, não foi detectada sobrevivência ao final da fase entérica (I ou II) em nenhuma das 4 formulações. Essas fases correspondem à simulação do intestino delgado e intestino grosso. Esse fato não significa, necessariamente, que os microrganismos não estavam presentes. Possivelmente, eles estavam no estado viável, mas não cultivável e, consequentemente, não foram capazes de se multiplicar e dar origem a colônias visíveis no ágar seletivo empregado na sua contagem.

De fato, a esse respeito, segundo Padilha *et al* (2016), a maior parte dos estudos realizados para avaliar a sobrevivência dos probióticos no trato gastrointestinal realiza a contagem desses microrganismos através do método convencional por semeadura em ágar seletivo e que, talvez, essa ferramenta não seja confiável já que falha em identificar células viáveis mas não cultiváveis. No estudo realizado pelos pesquisadores, os valores encontrados de sobrevivência das cepas probióticas foram maiores quando a contagem foi realizada através do método PCRq (método quantitativo da reação em cadeia da polimerase), tanto na fase gástrica quanto na fase entérica, para os 2 microrganismos avaliados (*L.acidophilus* La-5 e *B.animalis* subsp. *lactis* Bb-12). Os autores utilizaram um tratamento prévio com um agente intercalante de DNA (PMA – *propidium monoazide*) para excluir a amplificação do DNA de células mortas no PCR quantitativo (PCRq).

Figura 7- Sobrevivência de *L.acidophilus* La-5 em SL+ (sorvete com lactose), FL+ (*frozen* com lactose), SL- (sorvete sem lactose) e FL- (*frozen* sem lactose) durante o armazenamento a -18°C por 7,21,42 e 84 dias, antes (viabilidade) e durante o ensaio *in vitro* com simulação das condições gástricas e entéricas.

^{A,D} Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$) para cada período de armazenamento

^{a,b} Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os períodos de ensaio (0h, 2h, 4h e 6h) para cada formulação ($p < 0,05$)

Matias e colaboradores (2016) destacaram que, para ser efetiva, a técnica de PCRq precisa ser combinada com PMA (propidium monoazide) para reduzir a interferência das células mortas no resultado.

Célula viáveis mais não cultiváveis são uma resposta a condições estressantes encontradas pelos microrganismos. Nessa condição, os microrganismos ficam dormentes mas metabolicamente ativos e são capazes de se multiplicarem novamente, caso retorne a um ambiente com condições mais favoráveis (DAVIS, 2014).

No entanto, Dos Santos *et al* (2018) encontraram valores equivalentes ao avaliarem a sobrevivência de *B.animalis* subsp. *lactis* Bb-12, incorporada a margarina, à simulação *in*

vitro do trato gastrointestinal, utilizando como método de contagem em placa e o PCRq combinado com PMA. Os autores atribuíram essa equivalência na contagem ao elevado teor de gordura no tipo de alimento estudado (margarina), sugerindo que a matriz alimentar protegeu a bifidobactéria das condições ácidas encontradas no estômago e também da bile e do suco pancreático. Nos gelados comestíveis, o teor de lipídeos é muito menor, oferecendo uma menor proteção às células, tornando-as injuriadas durante a simulação, o que impossibilitaria a contagem dessas células através de ágar seletivo.

De acordo com Ruiz, Margolles e Sánchez (2013) sais biliares são liberados no duodeno que é a porção superior do intestino delgado, durante a digestão para solubilizar a gordura. Fiocco *et al* (2020). destacaram que, em virtude das suas propriedades antimicrobianas e semelhança a detergentes, esses sais biliares perturbam a estrutura lipídica das membranas microbianas. Esse fato pode explicar o comportamento de *L. acidophilus* LA-5 durante o teste *in vitro* no presente trabalho.

Na literatura são apresentados resultados controversos com relação a sobrevivência do *L. acidophilus*. Bianchi *et al* (2018) avaliaram a sobrevivência de *L. paracasei* L-431, *L. acidophilus* LA-5 e *B. longum* BB-46, combinadas ou não com subproduto de acerola, às condições do trato gastrointestinal simuladas *in vitro*. Os autores observaram que *L. acidophilus* LA-5 teve menor sobrevivência em todas as fases estudadas (gástrica, entérica I e entérica II). Já Xavier Santos *et al* (2019) compararam a sobrevivência de *L. acidophilus* LA-5 microencapsulado ou não com inulina por *spray drying*, incorporadas em uma musse simbiótica de goiaba *diet*. Os autores observaram, ao final de 6h de ensaio, reduções menores nas populações encapsuladas (1,26 log UFC) enquanto nas populações livres esta redução foi de 2,98 log UFC.

Bedani, Rossi e Saad (2013) avaliaram a sobrevivência da cepa *B.animalis* subsp. *lactis* Bb-12 incorporada em caldo MRS às condições do trato gastrointestinal simuladas *in vitro* e observaram uma redução de 4,23 log UFC/g após as 6 horas de ensaio. Comparando com os valores encontrados neste trabalho, todos os gelados comestíveis forneceram proteção para este probiótico, em todos os períodos avaliados, já que maior redução observada ao final de 6 horas de ensaio foi 3,30 log UFC/g.

Os resultados deste trabalho estão de acordo com Casarotti, Todorov e Penna (2015), que também observaram uma melhor sobrevivência de *B.animalis* subsp. *lactis* Bb-12 às condições entéricas do que *L.acidophilus* La-5. Jungersen *et al* (2014) também afirmaram que *B.animalis* subsp. *lactis* Bb-12 possui excelente tolerância ao ácido gástrico e à bile.

As figuras 8 e 9 ilustram respectivamente a influência da lactose e da fermentação na resistência de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 frente às condições gástrica e entéricas simuladas *in vitro* no 84º dia de armazenamento. Não foi encontrada influência da lactose na sobrevivência de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 durante a fase gástrica ($p > 0,05$). Porém, durante a fase entérica (I e II), foi observada uma maior resistência da cepa quando incorporada nas formulações SL+ e FL+ ($p < 0,05$).

A influência da fermentação foi observada nas fases gástrica e entérica I. Porém, a cepa probiótica *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 apresentou sobrevivência semelhante ($p > 0,05$) ao final das 6 horas de ensaio, quando incorporadas nas formulações fermentadas ou não fermentadas.

Figura 8 - Sobrevivência de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 no 84º dia de armazenamento a -18°C comparando as formulações com lactose (SL+ e FL+) e sem lactose (SL- e FL-)

Figura 9 - Sobrevivência de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 no 84º dia de armazenamento a -18°C comparando as formulações fermentadas (FL+ e FL-) e não fermentadas (SL+ e SL-)

Apesar da sobrevivência das culturas probióticas precisarem ser avaliadas *in vivo*, Campos *et al* (2019) compararam os resultados de estudos *in vitro* e *in vivo*. Os autores constataram que a simulação *in vitro* do trato gastrointestinal foi eficiente para concluir que o suco fermentado de abacaxi e juçara é um excelente veículo para cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG.

É importante destacar que técnicas independentes de cultivo podem acelerar o processo de contagem e fornecer informações sobre as populações de células que estão subestimadas quando da utilização da metodologia convencional da semeadura em ágar. No entanto, para indústrias, autoridades regulatórias e uso diário nas rotinas da maior parte dos laboratórios, as técnicas dependentes de cultivo ainda são úteis e continuarão sendo por algum tempo (VINDEROLA; REINHEIMER; SALMINEN, 2019).

4.6 PADRÕES MICROBIOLÓGICOS SANITÁRIOS PARA GELADOS COMESTÍVEIS

Na tabela 8, são apresentados os valores das contagens populacionais dos microrganismos indicadores da qualidade sanitária para a categoria de gelados comestíveis determinadas para as 4 formulações desenvolvidas.

A Resolução vigente no momento da produção dos gelados comestíveis estabelecia, para coliformes a 45°C, um limite máximo de 5×10 NMP/g de produto e, para estafilococos coagulase-positiva, um limite máximo de 5×10^2 UFC/g de produto, enquanto que a *Salmonella* spp. deveria estar ausente em 25 g.

Tabela 8- Determinação das contagens populacionais dos microrganismos indicadores da qualidade sanitária e presença/ausência de *Salmonella* spp., obtidas para SL+ (sorvete com lactose), FL+ (frozen com lactose), SL- (sorvete sem lactose) e FL- (frozen com lactose)

Determinações	Valores			
	SL+	FL+	SL-	FL-
Coliformes a 45°C (NMP/g)	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0
Contagem de Estaf.coag.positiva (UFC/g)	< 100	< 100	< 100	< 100
<i>Salmonella</i> spp. (25g)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Em 26 de dezembro de 2020, entrou em vigor a Resolução RDC nº331, de 23 de dezembro de 2019, a nova legislação que estabelece os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. A diferença entre as duas resoluções para a categoria Gelados Comestíveis está na determinação de *Enterobacteriaceae*/g, em vez da análise somente dos coliformes a 45°C (ANVISA, 2019).

As formulações desenvolvidas foram produzidos de acordo com Resolução RDC nº 267, de 25 de setembro de 2003 (ANVISA, 2003b) que estabelece Boas Práticas de Fabricação para estabelecimentos industrializadores de gelados comestíveis. Os resultados obtidos das análises inferem que elas estão de acordo com o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2001).

4.7 AVALIAÇÃO SENSORIAL

A incorporação de microrganismos probióticos a uma matriz alimentar não deve prejudicar as características sensoriais do produto. Para a avaliação sensorial dos gelados comestíveis probióticos foi realizado afetivo de aceitação com consumidores voluntários para as 4 formulações desenvolvidas. Utilizou-se escala hedônica estruturada de 9 pontos com variação de gostei muitíssimo (9 pontos) a desgostei muitíssimo (1 ponto). Dentre os 400 participantes da avaliação (200 em cada período avaliado), a média de idade foi de 25 anos, tendo variado de 18 a 65 anos.

Os resultados da análise sensorial das formulações após 7 e 42 dias de armazenamentos estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9- Avaliação sensorial obtida (Média $\pm$ Dp) para as 4 formulações SL+ (sorvete com lactose), FL+ (frozen com lactose), SL- (sorvete sem lactose) e FL- (frozen sem lactose) após 7 e 42 dias de armazenamento a $-18^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Período de Armazenamento (dias)	Formulação			
	SL+	FL+	SL-	FL-
7	7,52 $\pm$ 1,33 ^{Aa}	7,08 $\pm$ 1,81 ^{Aa}	7,70 $\pm$ 1,47 ^{Aa}	7,08 $\pm$ 1,81 ^{Aa}
42	7,56 $\pm$ 1,31 ^{Aa}	7,42 $\pm$ 1,61 ^{Aa}	7,70 $\pm$ 1,36 ^{Aa}	7,42 $\pm$ 1,61 ^{Aa}

^A Letras maiúsculas distintas em uma mesma linha indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$)

^a Letras minúsculas distintas em uma mesma coluna indicam diferenças significativas entre os dias de armazenamento ($p < 0,05$)

Todos os gelados comestíveis obtiveram uma boa avaliação, com médias superiores 7 na avaliação sensorial. Não foi encontrada diferença significativa entre as 4 formulações desenvolvidas nos dois períodos avaliados ($p > 0,05$). Também não foi observada nenhuma influência no período de armazenamento do produto ($p > 0,05$).

Este trabalho corrobora com os achados de Ferraz et al (2012) que concluíram que é possível produzir sorvetes probióticos com menores valores de *overrun*, sem influenciar a aceitabilidade dos consumidores. De fato, as formulações fermentadas (FL+ e FL-) mesmo apresentando baixos valores de *overrun* obtiveram boa avaliação sensorial.

De acordo com Soukoulis, Lyroni e Tzia (2010), alguns parâmetros, como o teor de gordura e a concentração de iogurte, influenciam a qualidade sensorial dos gelados comestíveis probióticos. No presente estudo, as formulações desenvolvidas apresentaram uma boa avaliação sensorial, mesmo apresentando um teor de lipídeos inferior aos sorvetes produzidos nas indústrias brasileiras. Ademais, alguns avaliadores perceberam um sabor semelhante ao Yakult e ao de sorvete grego ao avaliarem as formulações fermentadas (FL+ e FL-) e correlacionaram a um aspecto positivo.

Vasconcelos *et al* (2014) afirmaram que os metabólitos produzidos pelos microrganismos probióticos podem interferir na aceitabilidade dos alimentos probióticos fermentados. No entanto, Davidson *et al* (2000), observaram que a suplementação com bactérias probióticas tem pouco efeito no sabor do *frozen* iogurte.

Da mesma maneira, Mohammadi *et al* (2011) concluíram que a incorporação de bactérias probióticas nos sorvetes têm pouco efeito no seu sabor e textura. Na realidade, em um estado congelado, não são produzidos pelos probióticos, metabólitos em quantidade suficiente para alterar os efeitos sensoriais dos produtos (VASCONCELOS et al., 2014).

De Paula *et al* (2020) encontraram valores de aceitabilidade semelhantes aos encontrados neste trabalho para as 4 formulações de sorvete probiótico de leite de cabra com cajá desenvolvidas com as cepas *Lactobacillus rhamnosus* ou *Lactobacillus paracasei*. Mesmo com a substituição da gordura por inulina em 2 formulações, todos os sorvetes obtiveram pontuação superior a 7.

De maneira semelhante Valência *et al* (2016) compararam sensorialmente 3 formulações de uma sobremesa cremosa de chocolate desenvolvida pelos autores. Uma formulação era controle, outra probiótica e a terceira simbiótica (contendo frutooligosacarídeo além da cepa probiótica). As 3 formulações obtiveram boa avaliação, com médias também superiores a 7 em todos os atributos analisados (sabor, consistência e impressões gerais).

Alguns consumidores relataram, no campo da ficha destinado aos comentários, que comprariam o produto, caso o mesmo estivesse disponível no mercado. No trabalho elaborado por Cruxen *et al* (2017), 80% dos participantes afirmaram que possivelmente ou

definitivamente comprariam o sorvete de butiá suplementado com a cepa probiótica *Bifidobacterium lactis* (BI04) desenvolvido pelos pesquisadores.

Esmerino *et al* (2017) observaram que a escolha e o consumo do produto são multidimensionais e estão relacionados com características intrínsecas, como atributos sensoriais, como também com características extrínsecas, como aspectos psicológicos, percepções de benefícios a saúde e comerciais. Em outras palavras, apesar de vários estudos terem demonstrado a boa aceitação de diversos alimentos probióticos, esta aceitação pode tornar-se ainda maior, caso os consumidores tenham consciência dos benefícios à saúde conferidos por estes produtos.

5 PRINCIPAIS RESULTADOS ENCONTRADOS

- As 4 formulações de gelados comestíveis desenvolvidas apresentaram uma população superior a 6,34 log UFC/g para *Lactobacillus acidophilus* La-5 e a 6,24 log UFC/g para *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, ao longo de 84 dias de armazenamento a uma temperatura de $-18^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.
- As viabilidades de *Lactobacillus acidophilus* La-5 e de *St. thermophilus* foram superiores nas formulações fermentadas (FL+ e FL-), enquanto que para *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, a viabilidade foi superior nas formulações com lactose SL+ e FL+.
- Não houve recuperação da cepa probiótica *L.acidophilus* La-5 em nenhuma das formulações desenvolvidas após a submissão dos produtos às condições gástrica e entéricas simuladas *in vitro*. Já *B.animalis* subsp. *lactis* Bb-12 revelou uma melhor resistência quando incorporado à formulação FL+ após 84 dias de armazenamento.
- Pode-se verificar uma possível influência do fator lactose na resistência da cepa *B.animalis* subsp. *lactis* Bb-12 às condições do trato gastrointestinal simuladas *in vitro*, já que nas formulações SL+ e FL+ a população encontrada ao final de 6 horas de ensaio foi significativamente superior às demais ($p < 0,05$).
- Foram observados valores inferiores de pH e superiores de acidez nas formulações fermentadas ($p < 0,05$), além de valores inferiores de *overrun* e fração de derretimento ($p < 0,05$).
- Na avaliação sensorial, todas as formulações obtiveram pontuação média superior a 7 e não foi observada influência da lactose ou da fermentação na aceitabilidade dos produtos ($p > 0,05$).

6 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que todos os gelados comestíveis desenvolvidos apresentaram populações de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 e *L. acidophilus* LA-5 superiores a 8 log UFC por porção de 60 g durante os 84 dias de armazenamento sob congelamento a -18°C. Durante o período de armazenamento estudado, a presença ou ausência da lactose e/ou da etapa de fermentação não afetaram significativamente ($p > 0,05$) as características sensoriais dos produtos (aceitabilidade sempre superior a 7 para as 4 formulações). No entanto, a fermentação influenciou nas suas características tecnológicas (valores inferiores de pH, *overrun* e superiores de acidez e fração de derretimento nas formulações fermentadas ($p < 0,05$)). A fermentação também influenciou significativamente na viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La-5 e da cultura *starter*. Em contrapartida, a viabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 foi influenciada pela presença da lactose ($p < 0,05$). O fator lactose também interferiu, de forma significativa, na tolerância de *B. animalis* Bb-12 às condições adversas do estômago e do intestino delgado simuladas *in vitro*. Entretanto, futuros estudos serão necessários, para melhorar a resistência dos probióticos incorporados nos produtos ao trato gastrointestinal, sem alterar a excelente aceitação sensorial que as formulações obtiveram. Serão necessários, ainda, a realização de estudos clínicos *in vivo* que demonstrem benefícios à saúde da população-alvo através da ingestão dos gelados comestíveis desenvolvidos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ABOULFAZLI, F.; SHORI, A. B.; BABA, A. S. Effects of the replacement of cow milk with vegetable milk on probiotics and nutritional profile of fermented ice cream. **LWT - Food Science and Technology**, 2016.

AFZAAL, M. et al. Survival and stability of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated gastrointestinal conditions and in ice cream. **Food Science and Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 1649–1656, 2020.

AKALIN, A. et al. Enrichment of probiotic ice cream with different dietary fibers: Structural characteristics and culture viability. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 1, p. 37–46, 2018.

ALESSANDRI, G. et al. Bifidobacterial dialogue with its human host and consequent modulation of the immune system. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 2348, Oct. 2019.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**.

Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/%281%29RDC_12_2001_COMP.pdf/b3cb6241-6d1b-49fc-8a88-b0781a147980>. Acesso em: 9 jan. 2018.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. **Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/resolucao-rdc-no-360-de-23-de-dezembro-de-2003.pdf/view>>. Acesso em: 5 out. 2020a.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 267, de 25 de setembro de 2003. **Regulamento técnico de boas práticas de fabricação para estabelecimentos industrializadores de gelados comestíveis**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/rdc0267_25_09_2003.html>. Acesso em: 13 dez. 2019b.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 266, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento técnico para gelados comestíveis e preparos para gelados comestíveis**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/res0266_22_09_2005.html>. Acesso em: 27 ago. 2020.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 54 de 07 de outubro de 2014. **Dispõe sobre a lista de enzimas, aditivos alimentares e veículos autorizados em preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos em geral**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/resolucao-rdc-no-53-de-7-de-outubro-de-2014.pdf/view>>. Acesso em: 10 jan. 2021.

---

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023 2002)

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 135 de 8 de fevereiro de 2017. **Altera a portaria SVS/MS nº 29, de 13 de janeiro de 1998, que aprova o regulamento técnico referente a alimentos para fins especiais, para dispor sobre alimentos para dietas com restrição de lactose** Disponível em:

<https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/20794561/do1-2017-02-09-resolucao-rdc-n-135-de-8-de-fevereiro-de-2017-20794490>. Acesso em: 24 jan. 2021.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 241 de 26 de julho de 2018. **Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos.** Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC_241_2018_.pdf/941cda52-0657-46dd-af4b-47b4ee4335b7>. Acesso em: 1 dez. 2018.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 331, de 23 de dezembro de 2019. **Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação** Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-331-de-23-de-dezembro-de-2019-235332272>>. Acesso em: 13 jan. 2020.

AOAC INTERNATIONAL. **Official Methods of Analysys**. 21. ed. [s.l: s.n.].

ABIS, Associação Brasileira de Indústria de Sorvetes. **Produção e consumo de sorvetes no Brasil**. Disponível em: <<http://www.abis.com.br/wp-content/uploads/2020/06/Produção-e-Consumo-de-2003-a-2019-com-Regional.pdf>>. Acesso em: 1 ago. 2021.

AYAR, A. et al. Probiotic properties of ice creams produced with dietary fibres from by-products of the food industry. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, n. 1, p. 174–182, 2018.

BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 1, p. 54–66, 2011.

BALTHAZAR, C. F. et al. The addition of inulin and Lactobacillus casei 01 in sheep milk ice cream. **Food Chemistry**, v. 246, p. 464–472, 2018.

BEDANI, R.; ROSSI, E. A.; SAAD, S. M. I. 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 Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 382–389, 2013.

BIANCHI, F. et al. Impact of combining acerola by-product with a probiotic strain on a gut microbiome model. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 70, n. 2, p. 182–194, 2019.

BOHN, T. et al. Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 13, p. 2239–2261, 2017.

BRODKORB, A. et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, 2019.

BRODMANN, T. et al. Safety of novel microbes for human consumption: Practical examples of assessment in the European Union. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1725, p. 1–15, September 2017.

CAGGIANIELLO, G.; KLEEREBEZEM, M.; SPANO, G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria : from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 100, n. 9, p. 3877–3886, 2016.

CAMPOS, R. C. DE A. B. et al. In vitro and in vivo resistance of *Lactobacillus rhamnosus* GG carried by a mixed pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) and jussara (*Euterpe edulis* Martius) juice to the gastrointestinal tract. **Food Research International**, v. 116, p. 1247–1257, 2019.

CASAROTTI, S. N.; TODOROV, S. D.; PENNA, A. L. B. Effect of different matrices on probiotic resistance to in vitro simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Dairy Technology**, v. 68, n. 4, p. 595–601, 2015.

CHE, H. et al. Exopolysaccharide from *Streptococcus thermophilus* as stabilizer in fermented dairy: Binding kinetics and interactions with casein of milk. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 140, p. 1018–1025, 2019.

CHIQUETTI, R. L. et al. Viability of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* La-5 in ice cream : effect of lactose hydrolysis and overrun. **International Food Research Journal**, v. 23, n. December, p. 2631–2637, 2016.

COLLADO, M. C.; VINDEROLA, G.; SALMINEN, S. Postbiotics: Facts and open questions. A position paper on the need for a consensus definition. **Beneficial Microbes**, v. 10, n. 7, p. 711–719, 2019.

COLOMBO, M. et al. The potential use of probiotic and beneficial bacteria in the Brazilian dairy industry. **Journal of Dairy Research**, v. 85, n. 4, p. 487–496, 2018.

CRUXEN, C. E. dos S. et al. Probiotic butia (*Butia odorata*) ice cream_ Development, characterization, stability of bioactive compounds, and viability of *Bifidobacterium lactis* during storage.pdf. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 379–385, 2017.

CRUZ, A. G. et al. Ice-cream as a probiotic food carrier. **Food Research International**, v. 42, n. 9, p. 1233–1239, 2009.

DA SILVA, P. D. L. et al. Potentially probiotic ice cream from goat's milk: Characterization and cell viability during processing, storage and simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 452–457, 2014.

DAVIDSON, R. H. et al. Probiotic Culture Survival and Implications in Fermented Frozen Yogurt Characteristics. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 4, p. 666–673, 2000.

DAVIS, C. Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria **Journal of Microbiological Methods**, v. 103, p. 9–17, 2014.

DE ALMEIDA, J. DOS S. O. et al. Probiotic Mascarpone-type cheese: Characterisation and cell viability during storage and simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, p. 195–203, mar. 2018.

DE PAULA, C. M. et al. Fat substitution by inulin in goat milk ice cream produced with caja (Spondias mombin) pulp and probiotic cultures: Influence on composition, texture, and acceptability among consumers of two Brazilian regions. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 32, n. 2, p. 140–149, 2020.

DEKKER, P. J. T.; KOENDERS, D.; BRUINS, M. J. Lactose-free dairy products: Market developments, production, nutrition and health benefits. **Nutrients**, v. 11, n. 3, p. 1–14, 2019.

DENG, Y. et al. Lactose intolerance in adults: Biological mechanism and dietary management. **Nutrients**, v. 7, n. 9, p. 8020–8035, 2015.

DONALDSON, G. P.; LEE, S. M.; MAZMANIAN, S. K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 20–32, 2015.

DORĐEVIĆ, V. et al. Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. **Food Engineering Reviews**, v. 7, n. 4, p. 452–490, 2014.

DOS SANTOS, C. S. et al. Milk fat protects Bifidobacterium animalis subsp. lactis Bb-12 from in vitro gastrointestinal stress in potentially synbiotic table spreads. **Food & Function**, p. 4274–4281, 2018.

DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. [s.l.: s.n.].

DUAR, R. M. et al. Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus Lactobacillus. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, n. 1, p. S27–S48, 2017.

DUPONT, D. et al. Can dynamic in vitro digestion systems mimic the physiological reality? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 10, p. 1546–1562, 2019.

EGGER, L. et al. The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action. **Food Research International**, v. 88, p. 217–225, 2016.

ESMERINO, E. A. et al. Consumers' perceptions toward 3 different fermented dairy products: Insights from focus groups, word association, and projective mapping. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 11, p. 8849–8860, 2017.

EUROMONITOR. **Consumidores Conscientes impulsionam vendas de produtos veganos**. Disponível em: <<https://blog.euromonitor.com/consumidores-conscientes-impulsionam-vendas-de-produtos-veganos/>>. Acesso em: 7 fev. 2021.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid:** report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid, American Córdoba Park Hotel, Argentina, 1-4 October 2001. Rome: FAO/WHO, 2001. 34p.

FERRAZ, J. L. et al. Sensory acceptance and survival of probiotic bacteria in ice cream produced with different overrun levels. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, p. S24–S28, jan. 2012.

FIOCCO, D. et al. How probiotics face food stress: They get by with a little help. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 9, p. 1552–1580, 2020.

FLACH, J. et al. The underexposed role of food matrices in probiotic products: Reviewing the relationship between carrier matrices and product parameters. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 15, p. 2570–2584, 2018.

FRAKOLAKI, G. et al. A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, DOI: 10.1080/10408398.2020.1761773

GHEISARI, H. R. et al. Properties of ice-cream fortified with zinc and *Lactobacillus casei*. **Acta Sci. Pol. Technol. Aliment**, v. 15, n. 4, p. 367–377, 2016.

GHOSH, T. et al. Mechanistic insights into probiotic properties of lactic acid bacteria associated with ethnic fermented dairy products. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 502, 2019.

GIBSON, G. R. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491–502, 2017.

GOFF, H. D. Formation and stabilisation of structure in ice-cream and related products. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 7, n. 5–6, p. 432–437, 2002.

GOPAL, P. K. *Lactobacillus spp. : Lactobacillus acidophilus*. In: FUQUAY, J. W. (Ed.). . **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2. ed. [s.l.] Academic Press, 2011. p. 91–95.

GUERRA, A. et al. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 591–600, 2012.

GUIMARÃES, J. T. et al. Impact of probiotics and prebiotics on food texture. **Current Opinion in Food Science**, v. 33, p. 38–44, 2020.

HARJU, M.; KALLIOINEN, H.; TOSSAVAINEN, O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 2, p. 104–109, fev. 2012.

HARTEL, R. W.; RANKIN, S. A.; BRADLEY JR, R. L. A 100-Year Review: Milestones in the development of frozen desserts. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10014–10025, 2017.

HASHEMI, M.; GHEISARI, H. R.; SHEKARFOROUSH, S. Preparation and evaluation of low-calorie functional ice cream containing inulin, lactulose and *Bifidobacterium lactis*. **International Journal of Dairy Technology**, v. 68, n. 2, p. 183–189, 2015.

HEYMAN, M. B. Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. **Pediatrics**, v. 118, n. 3, p. 1279–1286, 2006.

HIDALGO-CANTABRANA, C. et al. Bifidobacteria and Their Health-Promoting Effects. **Microbiology Spectrum**, v. 36, n. 9, p. 1–19, 2017.

HILL, C. et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.

HOUGH, G. **Sensory shelf life estimation of food products**. [s.l.] CRC Press, 2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4^a ed ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ISIK, U. et al. Frozen yogurt with added inulin and isomalt. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 4, p. 1647–1656, 2011.

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

KASPRZYK, I.; MARKOWSKA, J.; POLAK, E. Effect of Microbial Transglutaminase on Ice Cream Heat Resistance Properties – a Short Report. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 66, n. 3, p. 227–231, 2016.

KHALESİ, S. et al. A review of probiotic supplementation in healthy adults: helpful or hype? **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 1, p. 24–37, 2019.

KHANAL, S. N.; LUCEY, J. A. Evaluation of the yield, molar mass of exopolysaccharides, and rheological properties of gels formed during fermentation of milk by *Streptococcus thermophilus* strains St-143 and ST-10255y. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 9, p. 6906–6917, 2017.

LEIS, R. et al. Effects of Prebiotic and Probiotic Supplementation on Lactase Deficiency and Lactose Intolerance : A Systematic Review of Controlled Trials. **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 1487, 2020.

LUCAS-GONZÁLEZ, R. et al. In vitro digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. **Food Research International**, v. 107, p. 423–436, 2018.

MARCO, M. L. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2019.

MARINHO, J. F. U. et al. Probiotic and Synbiotic Sorbets Produced with Jussara (*Euterpe edulis*) Pulp: Evaluation Throughout the Storage Period and Effect of the Matrix on Probiotics Exposed to Simulated Gastrointestinal Fluids. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 1, p. 264–272, 2017.

MARKETSANDMARKETS. **Probiotic Market by Application, Form, End User, and Region - Global Forecast to 2023**. Disponível em:

<<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/probiotic-market-advanced-technologies-and-global-market-69.html>>. Acesso em: 2 fev. 2020.

MARKOWIAK, P.; ŚLIZEWSKA, K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 1021, 2017.

MARSHALL, R. T.; GOFF, H. D.; HARTEL, R. W. Analyzing frozen deserts. In: GOFF, H. D.; HARTEL, R. W. (Eds.). **Ice Cream**. 7. ed. New York: Springer, 2013. p. 403–436.

MARTINEZ, R. C. R.; BEDANI, R.; SAAD, S. M. I. Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: An update for current perspectives and future challenges. **British Journal of Nutrition**, v. 114, n. 12, p. 1993–2015, 2015.

MATIAS, N. S. et al. In vitro gastrointestinal resistance of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 in soy and/or milk-based synbiotic apple ice creams. **International Journal of Food Microbiology**, v. 234, p. 83–93, 2016.

MATTAR, R.; MAZO, D. F. DE C.; CARRILHO, F. J. Lactose intolerance: diagnosis, genetic and clinical factors. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. 5, p. 113–121, 2012.

MCFARLAND, L. V. From yaks to yogurt: The history, development, and current use of probiotics. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. Suppl 2, p. S85–S90, 2015.

MIN, M. et al. Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 16, p. 2626–2641, 2019.

MINEKUS, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. **Food Funct**, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.

MISSELWITZ, B. et al. Update on lactose malabsorption and intolerance: Pathogenesis, diagnosis and clinical management. **Gut**, v. 68, n. 11, p. 2080–2091, 2019.

MLICHOVÁ, Z.; ROSENBERG, M. Current trends of β -galactosidase application in food technology. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 45, n. 2, p. 47–54, 2006.

MOHAMMADI, R. et al. Probiotic ice cream: Viability of probiotic bacteria and sensory properties. **Annals of Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 411–424, 2011.

- MULET-CABERO, A. I. et al. A standardised semi-dynamic: in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. **Food and Function**, v. 11, n. 2, p. 1702–1720, 2020.
- MUSE, M. R.; HARTEL, R. W. Ice Cream Structural Elements that Affect Melting Rate and Hardness. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 1, p. 1–10, 2004.
- NG, E. W.; YEUNG, M.; TONG, P. S. Effects of yogurt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 169–175, 2011.
- O'TOOLE, P. W.; MARCHESI, J. R.; HILL, C. Next-generation probiotics: The spectrum from probiotics to live biotherapeutics. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 17057, 2017.
- OUWEHAND, A. C. A review of dose-responses of probiotics in human studies. **Beneficial Microbes**, v. 8, n. 2, p. 143–151, 2017.
- PADILHA, M. et al. A prebiotic mixture improved: *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* gastrointestinal in vitro resistance in petit-suisse. **Food and Function**, v. 7, n. 5, p. 2312–2319, 2016.
- PEREIRA, G. DAS G. et al. Influência do pH nas características físico-químicas e sensoriais de frozen yogurt de morango. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 675–686, 2012.
- RANADHEERA, C. S. et al. Probiotic delivery through fermentation: Dairy vs. non-dairy beverages. **Fermentation**, v. 3, n. 4, p. 1–17, 2017.
- RANADHEERA, C. S.; NAUMOVSKI, N.; AJLOUNI, S. Non-bovine milk products as emerging probiotic carriers: recent developments and innovations. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 109–114, 2018.
- REID, G. Probiotics : definition, scope and mechanisms of action. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v. 30, p. 17–25, 2016.
- REZAEI, R. et al. Effect of inulin on the physicochemical properties, flow behavior and probiotic survival of frozen yogurt. **J Food Sci Technol**, v. 51, n. 10, p. 2809–2814, 2014.
- RIBEIRO, A. P. DE O. et al. Development of a probiotic non-fermented blend beverage with juçara fruit: Effect of the matrix on probiotic viability and survival to the gastrointestinal tract. **Lwt**, v. 118, p. 108756, 2020.
- RICHTER, R. L.; VEDAMUTHU, E. R. Milk and milk products. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Eds.). . **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: Alpha, 2001. p. 483–495.
- RODRIGUES, V. C. D. C. et al. Modulation of the intestinal microbiota and the metabolites produced by the administration of ice cream and a dietary supplement containing the same probiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 124, n. 1, p. 57–68, 2020.

RUIZ, L.; MARGOLLES, A.; SÁNCHEZ, B. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 396, dec. 2013.

SALVETTI, E.; TORRIANI, S.; FELIS, G. E. The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 4, n. 4, p. 217–226, 2012.

SÁNCHEZ, B. et al. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 61, n. 1, p. 1–15, 2017.

SAQIB, S. et al. Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2017.

SHOKRYAZDAN, P. et al. Probiotics: From Isolation to Application. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 36, n. 8, p. 666–676, 2017.

ŠIPAILIENĖ, A.; PETRAITYTĖ, S. Encapsulation of Probiotics: Proper Selection of the Probiotic Strain and the Influence of Encapsulation Technology and Materials on the Viability of Encapsulated Microorganisms. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2018.

SKRYPLONEK, K. et al. Characteristics of lactose-free frozen yogurt with κ -carrageenan and corn starch as stabilizers. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 9, p. 7838–7848, 2019.

SNIFFEN, J. C. et al. Choosing an appropriate probiotic product for your patient: An evidence-based practical guide. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, p. 1–23, 2018.

SOFJAN, R. P.; HARTEL, R. W. Effects of overrun on structural and physical characteristics of ice cream. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 3, p. 255–262, 2004.

SOLER, M. P.; VEIGA, P. G. **Sorvetes - série publicações técnicas do centro de informação em alimentos**. Campinas: ITAL, 2001.

SOUKOULIS, C.; FISK, I. D.; BOHN, T. Ice cream as a vehicle for incorporating health-promoting ingredients: Conceptualization and overview of quality and storage stability. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 627–655, 2014.

SOUKOULIS, C.; LYRONI, E.; TZIA, C. Sensory profiling and hedonic judgement of probiotic ice cream as a function of hydrocolloids, yogurt and milk fat content. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 9, p. 1351–1358, 2010.

SOUKOULIS, C.; TZIA, C. Impact of the acidification process, hydrocolloids and protein fortifiers on the physical and sensory properties of frozen yogurt. **International Journal of Dairy Technology**, v. 61, n. 2, p. 170–177, 2008.

SOUKOULIS, C.; TZIA, C. Grape, raisin and sugarcane molasses as potential partial sucrose substitutes in chocolate ice cream: A feasibility study. **International Dairy Journal**, v. 76, p. 18–29, 2018.

SOUZA, C. H. B. DE; GIOIELLI, L. A.; SAAD, S. M. I. Inulin increases *Bifidobacterium animalis* Bb-12 in vitro gastrointestinal resistance in margarine. **LWT - Food Science and Technology**, v. 79, p. 205–212, jun. 2017.

SUCHY, F. J. et al. National Institutes of Health Consensus Development Conference :Lactose Intolerance and Health. **Annals of Internal Medicine**, v. 152, n. 12, p. 792–796, 2010.

TAVERNITI, V. et al. Short-term daily intake of 6 billion live probiotic cells can be insufficient in healthy adults to modulate the intestinal bifidobacteria and lactobacilli. **Journal of Functional Foods**, v. 6, n. 1, p. 482–491, 2014.

TERPOU, A. et al. Novel frozen yogurt production fortified with sea buckthorn berries and probiotics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 105, p. 242–249, 2019.

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.

UGIDOS-RODRIGUEZ, S.; MATELLANA-GONZÁLEZ, M. C.; SÁNCHEZ-MATA, M. C. Lactose malabsorption and intolerance: a review. **Food & Function**, v. 9, n. 8, p. 4056–4068, 2018.

USP; FORC. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA)**. Disponível em: <http://www.tbca.net.br/base-dados/int_composicao_alimentos.php?cod_produto=C0141K>. Acesso em: 28 set. 2020.

VALENCIA, M. S. et al. Development of creamy milk chocolate dessert added with fructo-oligosaccharide and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81. . **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 104–109, 2016.

VASCONCELOS, B. G. et al. Innovative açai (*Euterpe oleracea*, Mart., Arecaceae) functional frozen dessert exhibits high probiotic viability throughout shelf-life and supplementation with inulin improves sensory acceptance. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 1843–1849, 31 dez. 2014.

VILLARREAL, M. L. M. et al. Advantageous direct quantification of viable closely related probiotics in petit-suisse cheeses under in vitro gastrointestinal conditions by propidium monoazide - QPCR. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–11, 2013.

VINDEROLA, C. .; REINHEIMER, J. . Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 8, p. 497–505, ago. 1999.

VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J.; SALMINEN, S. The enumeration of probiotic issues: From unavailable standardised culture media to a recommended procedure? **International Dairy Journal**, v. 96, p. 58–65, 2019.

WU, B.; FREIRE, D. O.; HARTEL, R. W. The Effect of Overrun, Fat Destabilization, and Ice Cream Mix Viscosity on Entire Meltdown Behavior. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 9, p. 2562–2571, 2019.

XAVIER SANTOS, D. et al. Improved probiotic survival to in vitro gastrointestinal stress in a mousse containing *Lactobacillus acidophilus* La-5 microencapsulated with inulin by spray drying. **Lwt**, v. 99, p. 404–410, 2019.

ZHENG, J. et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 2020.

ZHERNAKOVA, A. et al. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. **Science**, v. 352, n. 6285, p. 565–569, 2016.

8 ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência da matriz de gelado comestível probiótico de base láctea sobre o comportamento e a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* Bb-12 a condições do trato gastrointestinal simuladas in vitro.

Pesquisador: Susana Marta Isay Saad

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 11221719.8.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.313.418

Apresentação do Projeto:

O projeto refere-se ao estudo da influência da matriz de gelados comestíveis probióticos, fermentados ou não (sorvete e iogurte frozen), com lactose e sem lactose, sobre as características sensoriais e tecnológicas do produto e sobre a viabilidade e a resistência gastrointestinal simulada in vitro dos probióticos adicionados ao longo do armazenamento congelado (~-18oC) dos produtos. Após o desenvolvimento dos produtos, a análise sensorial será realizada no 14o dia, 42o dia e no 84o dia de armazenamento, após análise microbiológica para a verificação da segurança dos produtos. Os resultados obtidos referentes à análise sensorial, análises microbiológicas e físico-químicas dos produtos serão analisados estatisticamente visando a comparação entre formulações distintas para um mesmo período de armazenamento e entre períodos distintos de armazenamento de uma mesma formulação.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a influência da matriz de gelado comestível de base láctea sobre o comportamento e a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb- 12 a condições do trato gastrointestinal simuladas in vitro e comparar as formulações de gelados comestíveis probióticos de base láctea, com diferenças no tipo de leite de vaca (normal ou lactose + e sem lactose ou lactose -) e quanto à fermentação (não fermentado ou sorvete e fermentado ou

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

Continuação do Parecer: 3.313.418

frozen yogurt) quanto às suas características tecnológicas e aceitabilidade sensorial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa oferece benefícios a longo prazo pelo desenvolvimento de produto probiótico. No entanto, não traz nenhum benefício direto aos participantes. A pesquisa apresenta risco muito baixo, somente associado à algum desconforto no consumo dos produtos. Serão preparados produtos sem lactose, o que diminui os riscos da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Diversos benefícios são atribuídos às culturas probióticas, incluindo controle da microbiota intestinal, estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos, promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos, estimulação do sistema autoimune, alívio da constipação, aumento da absorção de minerais, produção de vitaminas e a promoção da digestão da lactose em pessoas intolerantes a esse carboidrato. A matriz alimentar pode afetar a sobrevivência, a fisiologia e a eficácia das cepas probióticas. Portanto, o estudo se justifica e a etapa de análise sensorial fundamental para o desenvolvimento do produto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados e estão adequados.

Recomendações:

Recomenda-se a aprovação do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1323385.pdf	08/05/2019 12:02:43		Aceito
Outros	CartaRespostaMarcela.pdf	08/05/2019 12:01:52	Susana Marta Isay Saad	Aceito
Parecer Anterior	PARECERCEP302072.pdf	08/05/2019 12:01:03	Susana Marta Isay Saad	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLEcorrigido.pdf	08/05/2019 11:58:33	Susana Marta Isay Saad	Aceito

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

Continuação do Parecer: 3.313.418

Justificativa de Ausência	TCLEcorrigido.pdf	08/05/2019 11:58:33	Susana Marta Isay Saad	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	05/04/2019 15:36:48	Susana Marta Isay Saad	Aceito
Outros	Equipe.docx	03/04/2019 14:42:53	Susana Marta Isay Saad	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia.pdf	27/03/2019 20:56:58	Susana Marta Isay Saad	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	27/03/2019 20:51:59	Susana Marta Isay Saad	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Recursos.pdf	27/03/2019 20:51:27	Susana Marta Isay Saad	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	27/03/2019 20:41:18	Susana Marta Isay Saad	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	27/03/2019 20:40:24	Susana Marta Isay Saad	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoParticipacaoProjetoMarcelaLeite.pdf	27/03/2019 18:50:36	Susana Marta Isay Saad	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoParticipacaoIgorProjMarcelaLeite.pdf	27/03/2019 18:49:36	Susana Marta Isay Saad	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoParticipacaoSusanaSaadProjMarcelaLeite.pdf	27/03/2019 18:49:21	Susana Marta Isay Saad	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 08 de Maio de 2019

Assinado por:
Mauricio Yonamine
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

ANEXO B – Ficha utilizada na análise sensorial

Produto: Gelado Comestível Probiótico	
Nome: _____ Data: ____/____/____	
Idade: _____	
Você recebeu uma amostra de gelado comestível (sorvete ou iogurte <i>frozen</i>). Por favor, prove a amostra e avalie de maneira geral (aparência, sabor e textura), usando a escala abaixo, para descrever o quanto você gostou ou desgostou do produto.	
Amostra: _____	Amostra: _____
1 - Desgostei muitíssimo	1 - Desgostei muitíssimo
2 - Desgostei muito	2 - Desgostei muito
3 - Desgostei regularmente	3 - Desgostei regularmente
4 - Desgostei ligeiramente	4 - Desgostei ligeiramente
5 - Não gostei nem desgostei	5 - Não gostei nem desgostei
6 - Gostei ligeiramente	6 - Gostei ligeiramente
7 - Gostei regularmente	7 - Gostei regularmente
8 - Gostei muito	8 - Gostei muito
9 - Gostei muitíssimo	9 - Gostei muitíssimo
Comentários: _____	
_____	
Obrigada pela participação!	

ANEXO C – Ficha do aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9133 - 10908050/1 - Marcela de Souza Leite

Email:	marcela_leite@usp.br
Data de Nascimento:	09/06/1982
Cédula de Identidade:	RG - 20.134.033-8 - RJ
Local de Nascimento:	Estado do Rio de Janeiro
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Engenheira - Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Rio de Janeiro - Brasil - 2013

Curso:	Mestrado
Programa:	Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área:	Tecnologia de Alimentos
Data de Matrícula:	24/04/2018
Início da Contagem de Prazo:	24/04/2018
Data Limite para o Depósito:	19/04/2021
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Susana Marta Isay Saad - 24/04/2018 até o presente. Email: susaad@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 24/04/2018
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 31/05/2019
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 24/04/2018

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/03/2021

Impresso em: 23/03/2021 17:44:53

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9133 - 10908050/1 - Marcela de Souza Leite

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBT5788-1/3	Aplicação de Alimentos Probióticos na Modulação de Imunidade de Mucosas	06/08/2018	26/08/2018	60	4	100	A	N	Concluída
FBF5805-2/6	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	14/08/2018	22/10/2018	90	6	100	A	N	Concluída
FBT5781-5/3	Culturas Probióticas: Aplicações Tecnológicas	20/08/2018	10/09/2018	60	4	100	A	N	Concluída
PQI5850-8/6	Fundamentos de Engenharia de Alimentos (Escola Politécnica - Universidade de São Paulo)	10/09/2018	21/12/2018	120	8	100	B	N	Concluída
FBA5874-6/3	Química e Análise dos Alimentos Lipídicos	06/11/2018	20/12/2018	60	0	-	-	N	Pré-matricula recusada
FBT5773-8/3	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	11/03/2019	19/05/2019	30	2	90	A	N	Concluída
FBC5954-1/2	Redação de Trabalhos Científicos	11/04/2019	17/04/2019	15	0	-	-	N	Turma cancelada
FBT5719-1/1	Segurança Química e Biossegurança: gerenciamento de laboratórios	14/10/2019	27/10/2019	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	26
Estágios:			
Total:	0	25	26

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Concelto a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/03/2021

Impresso em: 23/03/2021 17:44:54

ANEXO D – Currículo Lattes

23/04/2019

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Marcela de Souza Leite)

Marcela de Souza Leite

Bolsista de Mestrado do CNPq

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/7223377797110747>

Última atualização do currículo em 24/10/2018

Engenheira de Produção com ênfase em qualidade química pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro e pós-graduada em logística e operações pelo Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia. Possui experiência na área de Controle de Qualidade e na realização de análises físico-químicas e sensoriais. Possui conhecimento das normas ISO 9001:2008 e ISO 22000:2006 e das legislações pertinentes a fabricação e rotulagem de alimentos. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Marcela de Souza Leite
Nome em citações bibliográficas	LEITE, Marcela de Souza; LEITE, MARCELA DE SOUZA

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2018	Mestrado em andamento em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica (Conceito CAPES 5). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Influência da matriz de gelado comestível probiótico de base láctea sobre o comportamento e a sobrevivência de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 e <i>Bifidobacterium animalis</i> Bb-12 a condições do trato gastrointestinal simuladas in vitro, Orientador: Susana Marta Isay Saad. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
2015 - 2016	Especialização em Logística e Operações. (Carga Horária: 400h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, IFSP, Brasil. Título: TRANSPORTATION MODAL CHOICE IN COOLANT IMPORTATION THROUGH TOTAL COSTS MINIMIZATION: A CASE STUDY. Orientador: Wagner Roberto Garo.
2001 - 2006	Graduação em Engenharia de Produção. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, Brasil. Título: Levantamento de Critérios de Sustentabilidade para Avaliação de Processos Industriais (Estudo da Madeira Plástica). Orientador: Alexandre Rodrigues Torres.

Formação Complementar

2017 - 2017	Cromatografia Líquida de Alta Performance. (Carga horária: 24h). SENAI Mario Amato, SENAI, Brasil.
2017 - 2017	Análise Sensorial para Alimentos. (Carga horária: 8h). Conselho Regional de Química - IV Região (SP), CRQ-IV, Brasil.
2016 - 2016	Entendendo a Responsabilidade Técnica. (Carga horária: 5h). Conselho Regional de Química - IV Região (SP), CRQ-IV, Brasil.
2016 - 2016	Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP/APPCC). (Carga horária: 16h). SGS Academy, SGS, Brasil.
2016 - 2016	Treinamento em Boas Práticas de Fabricação para Indústria de Alimentos. (Carga horária: 9h). Conselho Regional de Química - IV Região (SP), CRQ-IV, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2018 - Atual

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aluna, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

Atividades

04/2018 - Atual

Pesquisa e desenvolvimento , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .
Linhas de pesquisa

[Influência da matriz de gelado comestível probiótico de base láctea sobre o comportamento e a sobrevivência de Lactobacillus acidophilus La-5 e Bifidobacterium animalis Bb-12 a condições do trato gastrointestinal simuladas in vitro.](#)

Bifum Brasil Alimentos Ltda, BIFUM, Brasil.

Vínculo institucional

2015 - 2017

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Chefe de Controle de Qualidade, Carga horária: 44

Outras informações

Realizava as análises físico-químicas e sensoriais nas matérias primas, insumos e nos produtos acabados. Responsável pelo controle de qualidade da água, pelo manejo integrado de pragas e por supervisionar a higienização dos móveis, equipamentos, máquinas e utensílios. Responsável direta pela aprovação e alterações dos padrões de produção. Responsável por toda documentação da qualidade e dos documentos referentes às boas práticas de fabricação (BPF). Realizava treinamento e orientação aos colaboradores sobre as boas práticas de fabricação. Desenvolvi a documentação da ISO 22000:2006. Participei da elaboração da nova rotulagem dos produtos.

AGTAL A Guedes Torrefação de Amendoim Ltda, AGTAL, Brasil.

Vínculo institucional

2013 - 2014

Outras informações

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Analista de Qualidade, Carga horária: 44
Realizava as análises físico-químicas e sensoriais nas matérias primas, insumos e nos produtos acabados. Responsável por toda documentação da qualidade e dos documentos referentes às boas práticas de fabricação (BPF) além de treinar e orientar os colaboradores na unidade produtiva de Queluz. Responsável pelo controle de qualidade da água, pelo manejo integrado de pragas e por supervisionar a higienização dos móveis, equipamentos, máquinas e utensílios. Responsável pelo suprimento de EPIS, descartáveis e materiais de limpeza utilizados pelos colaboradores. Fazia a avaliação de fornecedores junto com a diretoria.

Desk Móveis Escolares e Produtos Plásticos Ltda, DESK, Brasil.

Vínculo institucional

2008 - 2010

Outras informações

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Analista de Produção, Carga horária: 44
Responsável pelo Planejamento e Controle de Produção, inclusive pelo acompanhamento diário da produção no chão de fábrica, supervisionando encarregados, líderes e colaboradores. Responsável pelo setor de tratamento de superfície e pintura inclusive pelas análises físico-químicas. Responsável pelo desenvolvimento de produtos para licitações. Responsável direta pela qualidade dos produtos dos setores de serralheria, pintura e montagem. Desenvolvi a documentação técnica para implementação de itens da norma ISO 9001:2008.

Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, Brasil.

Vínculo institucional

2003 - 2005

Vínculo: Bolsista de Iniciação Científica, Enquadramento Funcional: aluno, Carga horária: 20

Linhas de pesquisa

1.

[Influência da matriz de gelado comestível probiótico de base láctea sobre o comportamento e a sobrevivência de Lactobacillus acidophilus La-5 e Bifidobacterium animalis Bb-12 a condições do trato gastrointestinal simuladas in vitro.](#)

Projetos de pesquisa

2003 - 2005

MODELOS TERMODINÂMICOS APLICADOS À CATÁLISE: MODELAGEM DA ADSORÇÃO DE FENOL EM CARVÃO ATIVO - INFLUÊNCIA DO AMBIENTE SALINO

Descrição: Usando a ferramenta UNIQUAC, os processos de contribuição de grupo em adsorção em carvão de moléculas orgânicas, são estudados. Vários ácidos e compostos orgânicos alifáticos e aromáticos são estudados, dando ênfase, principalmente ao ácido fórmico e ao fenol.

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (2) / Especialização: (0) / Mestrado acadêmico: (0) / Mestrado profissional: (0) / Doutorado: (0) .

Integrantes: Marcela de Souza Leite - Coordenador / Elaine Ferreira Tôres - Integrante / Alexandre Rodrigues Tôres - Integrante.

Financiador(es): Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Bolsa.

Áreas de atuação

1.	Grande área: Ciências Exatas e da Terra / Área: Química / Subárea: Físico-Química/Especialidade: Cinética Química e Catálise.
2.	Grande área: Ciências Exatas e da Terra / Área: Química / Subárea: Físico-Química/Especialidade: Termodinâmica Química.
3.	Grande área: Engenharias / Área: Engenharia de Produção / Subárea: Logística e Operações.
4.	Grande área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Controle de Qualidade de Alimentos.

Idiomas

Inglês	Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Bem.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica ▼

- ★ **LEITE, MARCELA DE SOUZA**; SANTOS, STEPHANIE CONCEIÇÃO ; DA SILVA, ADRIANO MANIÇOBA ; FERREIRA, WILLIAM DE PAULA . Eficácia da heurística da utilização incremental para balanceamento de linha: estudo de caso em um processo de tratamento de superfície. REVISTA PRODUÇÃO ONLINE, v. 17, p. 781, 2017.
- ★ **LEITE, MARCELA DE SOUZA**; SANTOS, STEPHANIE CONCEIÇÃO ; GARO JUNIOR, WAGNER ROBERTO . TRANSPORTATION MODAL CHOICE IN COOLANT IMPORTATION THROUGH TOTAL COSTS MINIMIZATION: A CASE STUDY. Independent Journal of Management & Production (IJM&P), v. 7, p. 714-728, 2016.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

- ★ **TÔRES, Elaine Ferreira** ; **TÔRES, Alexandre Rodrigues** ; **LEITE, Marcela de Souza** . Modelos Termodinâmicos Aplicados à Catálise: Modelagem da Adsorção de Fenol em Carvão Ativo - Influência do Ambiente Salino. In: 13º Congresso Brasileiro de Catálise e III Congresso Mercosul de Catálise, 2005, Foz do Iguaçu. 13º CBcat. 3º Mercocat. São Carlos: Compacta, 2005. v. 2. p. 670-675.

Resumos publicados em anais de congressos

- TÔRES, Elaine Ferreira** ; **LEITE, Marcela de Souza** . Modelos Termodinâmicos Aplicados à Catálise: Modelagem da Adsorção de Fenol em Carvão Ativo - Influência do Ambiente Salino. In: 13ª Semana de Iniciação Científica da Uerj, 2004, Rio de Janeiro. 13ª Semana de Iniciação Científica da UERJ, 2004. v. 1.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 14ª Semana de Iniciação Científica. Estudo Comparativo de Modelos de Isotermas de Adsorção de Fenol em Carvão Ativo - Ambiente Salino. 2005. (Outra).
2. 13ª Semana de Iniciação Científica. Modelos Termodinâmicos Aplicados à Catálise: Modelagem da Adsorção de Fenol em Carvão Ativo - Influência do Ambiente Salino. 2004. (Outra).

Educação e Popularização de C & T

Artigos

Artigos completos publicados em periódicos

1. ★ **LEITE, MARCELA DE SOUZA**; SANTOS, STEPHANIE CONCEIÇÃO ; DA SILVA, ADRIANO MANIÇOBA ; FERREIRA, WILLIAM DE PAULA . Eficácia da heurística da utilização incremental para balanceamento de linha: estudo de caso em um processo de tratamento de superfície. REVISTA PRODUÇÃO ONLINE, v. 17, p. 781, 2017.
2. ★ **LEITE, MARCELA DE SOUZA**; SANTOS, STEPHANIE CONCEIÇÃO ; GARO JUNIOR, WAGNER ROBERTO . TRANSPORTATION MODAL CHOICE IN COOLANT IMPORTATION THROUGH TOTAL COSTS MINIMIZATION: A CASE STUDY. Independent Journal of Management & Production (IJM&P), v. 7, p. 714-728, 2016.