UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Alimentos

Desenvolvimento de *mix* de açaí probiótico, prebiótico e
simbiótico

BRUNO GARCIA VASCONCELOS

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Prof. Dra. Susana Marta Isay Saad

São Paulo

2010

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Vasconcelos, Bruno Garcia
V331d Desenvolvimento de *mix* de açaí probiótico, prebiótico e
simbiótico / Bruno Garcia Vasconcelos. -- São Paulo, 2010.
1 v.(várias paginações)

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

Orientador: Saad, Susana Marta Isay

1. Alimentos : Processamento : Tecnologia 2. Sobremesas
geladas 3. Microbiologia de alimentos I. T. II. Saad, Susana
Marta Isay, orientador.

664 CDD

Bruno Garcia Vasconcelos

Desenvolvimento de *mix* de açaí probiótico, prebiótico e simbiótico

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa^a. Dra^a Susana Marta Issay Saad
Orientadora/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICATÓRIA

Às pessoas que buscam uma melhor qualidade de vida

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, a minha irmã e a minha yaya por me apoiarem diariamente. Agradeço também aos meus padrinhos, tios e demais familiares, por sempre estarem torcendo por mim.

À Profa. Dra. Susana Saad pela oportunidade de fazer o mestrado, pela amizade ao longo destes dois anos e por todas suas contribuições em meu trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, a saber: Daniel, Cínthia, Flávia, Juliana, Raquel e Regina e, mais recentemente, Cristina, Martha, Natália e Raquel Bedani, pelas sugestões e ajudas, ao longo do desenvolvimento do trabalho. Agradeço à aluna de iniciação científica Marina pelo seu apoio fundamental nas análises de cor. Agradeço, também, aos demais colegas do departamento ou de outros departamentos e até de outras faculdades da USP, pela amizade e pelos auxílios.

Aos funcionários do departamento, a saber: Alexandre, Elza, Fátima, Ivani, Miriam e Nilton e pelos demais funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelos constantes auxílios.

À Profa. Dra. Inar Alves de Castro, pelo direcionamento nas análises sensoriais e grande ajuda em análises estatísticas. Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli, pelos diversos direcionamentos. Agradeço, também, à Profa. Dra. Maria Ines Genovese Rodriguez, por disponibilizar seu laboratório e sua equipe na realização das análises de antocianinas, entre outras.

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli e Dra. Alcina Maria Liserre, pelas sugestões e melhorias durante o exame de qualificação.

A todos os provadores das análises sensoriais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado.

Às empresas Orafti e Kerry do Brasil, por colaborarem com parte dos recursos materiais aqui utilizados.

"Faça do seu alimento o seu remédio,
e do seu remédio o seu alimento."

Hipócrates

SUMÁRIO

	página
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Importância da dieta para a saúde e os alimentos funcionais.....	1
1.1.1. Abrangência do mercado funcional.....	2
1.2. A microbiota intestinal e a sua importância para a saúde.....	2
1.3. Os microrganismos probióticos.....	4
1.3.1. Escolha do probiótico.....	4
1.3.2. Segurança dos probióticos e FDA.....	5
1.3.3. Mecanismos de atuação dos probióticos e seus efeitos benéficos.....	5
1.3.4. Sobrevivência dos probióticos em produtos alimentícios....	6
1.3.5. <i>Lactobacillus</i> spp. e <i>Bifidobacterium</i> spp.	8
1.4. Os ingredientes prebióticos e seus efeitos.....	9
1.4.1. A inulina como ingrediente prebiótico.....	10
1.5. Os produtos simbióticos.....	11
1.6. O açaí e seus benefícios à saúde.....	11
1.7. A abrangência do mercado de alimentos funcionais e de alimentos funcionais probióticos.....	13
1.8. A importância da suplementação de <i>mix</i> de açaí com ingredientes probióticos e prebióticos.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Produção e armazenamento.....	17
3.2. Períodos de amostragem.....	21
3.3. Análises físico-químicas.....	22
3.4. Análise física.....	22
3.5. Análise sensorial.....	23
3.6. Análises microbiológicas.....	23
3.7. Análises estatísticas.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1. Composição centesimal e teor de sólidos.....	25
4.2. Evolução do pH.....	26
4.3. Evolução dos parâmetros de coloração instrumental.....	27
4.4. Avaliação sensorial dos <i>mixes</i>	30
4.5. Viabilidade dos microrganismos probióticos.....	34
5. CONCLUSÕES.....	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

ÍNDICE DE TABELAS

página

Tabela 1. Variáveis envolvidas na produção das formulações de <i>mix</i> de açaí.....	18
Tabela 2. Proporção dos ingredientes utilizados no preparo dos <i>mixes</i> de açaí.....	21
Tabela 3. Composição centesimal e teor de sólidos (média $\pm$ desvio padrão) obtidos para os diferentes <i>mixes</i> de açaí estudados. (vide Tabela 1 para a descrição das formulações M1–M4).....	26
Tabela 4. Evolução do pH das diferentes formulações de <i>mixes</i> de açaí estudados durante o armazenamento a -18 °C por 84 dias. (vide Tabela 1 para a descrição das formulações M1–M4).....	27
Tabela 5. Evolução dos parâmetros de coloração das diferentes formulações de <i>mixes</i> de açaí estudados durante o armazenamento a -18 °C por 84 dias. (vide Tabela 1 para a descrição das formulações M1–M4).....	29
Tabela 6. Resultados de aceitabilidade sensorial das diferentes formulações (M1-M4) em três períodos de armazenamento.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
Figura 1. Etapas envolvidas na produção do <i>mix</i> de açaí das diferentes formulações estudadas.....	19
Figura 2. Efeito da interação entre os probióticos e a inulina na aceitabilidade média dos produtos.....	31
Figura 3. Número de características apontadas como mais apreciadas (acima da abscissa) e menos apreciadas (abaixo da abscissa). ■, formulações não suplementadas com inulina; □, formulações suplementadas com inulina.....	33
Figura 4. Viabilidade de <i>L. acidophilus</i> (a) e de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (b) adicionados ao <i>mix</i> de açaí (■) ou à formulação de <i>mix</i> de açaí suplementada com inulina (□), armazenados a -18 °C. Valores são representados como média ± desvio padrão (n = 3 produções). * n = 2 produções). (vide Tabela 1 para a descrição das formulações M1–M4).....	35

RESUMO

Diversos estudos têm mostrado que alimentos adicionados de probióticos e prebióticos, em quantidades suficientes, trazem benefícios à saúde humana. Estes benefícios se devem, fundamentalmente, ao seu efeito na manutenção da microbiota intestinal benéfica. Paralelamente, ocorre aumento do consumo de derivados do açaí em grandes centros urbanos no Brasil e até mesmo no exterior, principalmente a sua polpa e derivados, que se deve, principalmente, ao alto valor calórico da fruta e à presença de pigmentos antioxidantes. O presente trabalho teve como principal objetivo desenvolver um *mix* de açaí que apresente aspectos nutricionais e sensoriais semelhantes ao produto tradicional, porém com propriedade funcional suplementar, por se tratar de um alimento probiótico, prebiótico ou simbiótico.

Quatro tratamentos foram produzidos (três vezes cada um deles), todos contendo *mix* de açaí congelado: M1 (controle), M2 (com *L. acidophilus* La-5 + *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12), M3 (com inulina) e M4 (com *L. acidophilus* La-5 + *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 + inulina) e armazenados a -18 °C por até 3 meses. Após 1, 7, 14, 21, 28, 56 e 84 dias de armazenamento, foram determinadas as populações de microrganismos probióticos, o pH e a cor instrumental dos produtos. O teor de umidade foi determinado após a fabricação dos produtos (dia 0). Adicionalmente, após 7, 42 e 84 dias de armazenamento, foi realizada análise sensorial (aceitabilidade). Foi determinada a composição centesimal dos produtos, a partir de amostras mantidas liofilizadas. Todos os resultados foram comparados, através de análise estatística.

A diferenciação na composição centesimal e no teor de sólidos entre as formulações decorreu da adição da fibra prebiótica. Com relação à evolução da cor e do pH, não houve variação importante ao longo do tempo, assim como entre os diferentes *mixes* de açaí estudados. Os produtos obtiveram boa aceitabilidade sensorial por parte dos provadores (médias das notas acima de 7, na maioria das formulações). Houve maior aceitabilidade dos *mixes* suplementados com o ingrediente prebiótico e o *mix* simbiótico recebeu notas médias significativamente mais elevadas ($p < 0,05$) em dois períodos de armazenamento (7 e 84 dias), quando comparado aos demais. O tempo de armazenamento não influenciou a avaliação sensorial significativamente ($p > 0,05$). Durante o período de armazenamento proposto, os probióticos apresentaram sobrevivência satisfatória (populações superiores a 10^8 UFC por porção diária), sob o ponto de vista da legislação brasileira vigente, com exceção do *B. animalis* subsp. *lactis* no *mix* não suplementado de inulina. O *mix* de açaí apresentou-se como boa matriz para veicular os microrganismos probióticos testados e a inulina contribuiu para uma maior aceitabilidade sensorial do produto.

Palavras-chave: Probiótico. Inulina. Simbiótico. Não lácteo. Açaí

DEVELOPMENT OF PROBIOTIC, PREBIOTIC AND SYNBIOTIC AÇAÍ MIX

ABSTRACT

Some studies have been showing that food products supplemented with probiotics and prebiotics, in sufficient amounts, result in benefits to human health. These benefits are related, fundamentally, to their effect on the healthy intestinal microbiota maintenance. Concomitantly, consumption of açaí food products, mainly its pulp and derivatives, is increasing in urban centers in Brazil and also abroad. The high caloric value and the presence of antioxidant pigments are responsible for its higher consumption. The main aim of the present study was to develop an açaí mix with nutritional and sensory aspects similar to the conventional product, but with a supplementary functional property, by being a probiotic, prebiotic or synbiotic food.

Four trials were produced (three times each), all containing frozen açaí mix: M1 (control), M2 (supplemented with *L. acidophilus* La-5 + *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12), M3 (supplemented with inulin) and M4 (supplemented with *L. acidophilus* La-5 + *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 + inulin) and stored at -18 °C for up to 3 months. After 1, 7, 14, 21, 28, 56 and 84 days of storage, the products were analyzed for probiotic microorganisms populations, pH and instrumental color. The moisture content was determined soon after production (on day 0). Additionally, after 7, 42 and 84 days of production, sensory evaluation (acceptability test) was carried out. Finally, compositional analyses proceeded from freeze-dried samples. Results were compared through statistical analysis.

Differences in compositional analyses and moisture content between trials were attributed to the presence or absence of inulin. Instrumental color and pH evolution were not influenced by the storage period and also no differences between the different açaí mixes studied were observed ($p > 0,05$). Products were well accepted by the panellists, and mean scores were often above 7. Prebiotic fiber inulin improved overall acceptability of açaí mixes and the synbiotic mix obtained higher mean score ($p < 0.05$) in two storage periods (7 and 84 days), when compared to the others. The storage period did not influence sensory evaluation significantly ($p > 0.05$). During the storage period studied, probiotics showed a satisfactory survival (viability higher than 10^8 cfu for the product's daily portion), according to the current Brazilian legislation, except for *B. animalis* subsp. *lactis* in the mix not supplemented with inulin. The açaí mix showed to be a good matrix for the probiotic microorganisms tested and inulin contributed for a higher acceptability of the product.

Keywords: Probiotic. Inulin. Synbiotic. Non-dairy. Açaí

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância da dieta para a saúde e os alimentos funcionais

Os alimentos consumidos pelo homem definem, em grande parte, a saúde, o crescimento e o desenvolvimento das pessoas. A dieta e a nutrição são de extrema importância para promover e manter a boa saúde ao longo de toda a vida. Está bem estabelecida sua função como fatores determinantes de doenças incluindo, por exemplo, doenças crônicas não transmissíveis. Dessa forma, a dieta e nutrição são componentes fundamentais das atividades de prevenção (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Tendo em vista a importância da alimentação relativa ao seu impacto na saúde, em meados dos anos 80, o Japão esforçou-se para desenvolver alimentos que possibilitassem a redução dos gastos com saúde pública, considerando a elevada expectativa de vida naquele país. Criou-se o conceito de Alimentos para Uso Específico de Saúde (ou *FOSHU*, em inglês) (STRINGHETA *et al.*, 2007). Tais alimentos deram início para o conceito de “alimentos funcionais”. Um alimento pode ser considerado como “funcional” caso tenha sido demonstrado satisfatoriamente sua influência benéfica em um ou mais funções alvo no organismo, além dos efeitos nutricionais adequados, de forma a ser relevante tanto para melhorar o estado de saúde e bem-estar quanto reduzir o risco de dada doença. Alimentos funcionais devem continuar sendo alimentos e devem apresentar seus efeitos e quantidades normalmente ingeridas (HOWLETT, 2008).

Entretanto, cada país aborda o assunto à sua maneira. No Brasil, é definido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (1999a) “alegação de propriedade funcional”, ao invés de “alimentos funcionais” em si, sendo a alegação “relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano”.

1.1.1. Abrangência do mercado funcional

Os alimentos funcionais são conhecidos e consumidos por indivíduos que buscam uma melhor qualidade de vida. Adicionalmente, a venda de produtos “saudáveis” para outros que não “pessoas saudáveis” alcançou sucesso sem precedentes. Muitos consumidores optam por versões mais saudáveis de produtos dos quais eles já consomem, sendo incapazes ou relutantes em adaptar a sua dieta aos guias dietéticos sugeridos (ARVANITOYANNIS; HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, 2005). Tendo em vista esse desafio, cientistas e indústrias têm desenvolvido produtos voltados aos consumidores supracitados, a fim de combinar o sabor e a conveniência com os benefícios a curto ou longo prazo (KATAN; ROOS, 2004). São exemplos de produtos já comercializados ao redor do mundo, segundo Arai (2002), Arvanitoyannis e Houwelingen-Koukaliaroglou (2005) e Siró *et al.* (2008), seguidos de seus ingredientes funcionais entre parênteses, os quais possuiriam alegações funcionais permitidas sob a ótica da presente legislação brasileira (ANVISA, 2008): açúcar (FOS), almôndegas (proteínas de soja), arroz cozido (fibras alimentares), biscoito (proteínas de soja), cereais (probiótico, prebiótico), coalhada (inclusive de soja (FOS)), galantina (*aspic*, em inglês) (probiótico), iogurte (probiótico), leite (ômega 3) e leite fermentado (probiótico), margarina (fitoesteróis, proteínas de soja), molho (inulina), ovos (ômega 3), pães (ômega 3), salsichas (proteínas de soja) e sopas (licopeno, proteínas de soja) (inclusive tipo missô). O mercado de alimentos funcionais tende a aumentar, à medida que os consumidores forem se sensibilizando com seus benefícios.

1.2. A microbiota intestinal e a sua importância para a saúde

Segundo Guarner e Malagelada (2003), a colonização do trato gastrointestinal (TGI) de recém-nascidos tem início imediatamente após o nascimento e ocorre em poucos dias. Inicialmente, o tipo de parto (natural *versus* cesárea) e o tipo de alimentação (leite materno *versus* fórmulas infantis) podem afetar o perfil de colonização. Outros fatores ambientais também desempenham um papel importante, estes vão desde diferenças existentes entre crianças nascidas em países desenvolvidos e os nascidos em países em desenvolvimento, a crianças de diferentes alas hospitalares. A colonização

inicial é muito importante para a composição da microbiota permanente em adultos.

Os gêneros *Bacterioides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Ruminococcus* são predominantes nos seres humanos, enquanto os aeróbios (anaeróbios facultativos) como *Escherichia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Proteus*, etc estão entre os gêneros sub-dominantes. Tais bactérias anaeróbias superam em número as aeróbias na razão 100-1000:1. Cada indivíduo possui várias centenas de espécies pertencentes a tais gêneros, com uma combinação particular de espécies predominantes diferentes de outros indivíduos (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

No entanto, a composição da microbiota de um indivíduo pode flutuar sob algumas circunstâncias, como, por exemplo, em diarreias agudas, antibioticoterapia ou, em menor grau, induzidas pelas intervenções alimentares. Contudo, a composição do perfil da microbiota normalmente permanece constante (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

A microbiota humana tem um papel importante na nutrição e saúde humanas, ao promover suprimentos de nutrientes, prevenindo a colonização de patógenos e modulando e fazendo a manutenção da nossa imunidade normal de mucosa (KELLY *et al.*, 2005). A microbiota desempenha um papel chave no sistema imunológico humano. Ela atua, induzindo tolerância aos epítomos microbianos e, conseqüentemente, reduzindo as respostas produzidas por alimentos e outros antígenos do ambiente. Dessa maneira, há uma manipulação da expressão de genes do hospedeiro, de forma a estabilizar e manter a vantagem da parceria. Estudos com ratos gnotobióticos colonizados por componentes da microbiota intestinal humana revelaram outras funções das bactérias autóctones, incluindo fortificação da barreira da mucosa e angiogênese. Esta pode ser responsável por aumentar a capacidade do hospedeiro em absorver nutrientes. Adicionalmente, o gênero *Bacteroides* é conhecido por lisar polissacarídeos alimentares provenientes de plantas que de outra forma não seriam aproveitados por nosso organismo, contribuindo para nossa ingestão calórica diária. Contudo, *Bacteroides thetaiotaomicron* (microrganismo mais abundante do intestino delgado distal) possui um proteoma dedicado a capturar polissacarídeos alimentares e metabolizar seus

açúcares liberados. Esta é uma característica que confere vantagem frente a outros membros da microbiota menos dotados, incluindo os microrganismos patogênicos, reduzindo, assim, a probabilidade destes fermentarem tais açúcares (XU *et al.*, 2003).

1.3. Os microrganismos probióticos

A definição de probióticos tem evoluído com o passar dos anos (SANDERS, 2003). Atualmente, é aceito que probióticos são microrganismos vivos que, ao serem ingeridos em quantidade suficiente, trazem benefícios à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001). Segundo a ANVISA (2008), a quantidade mínima viável para probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC por porção diária do produto pronto para o consumo.

1.3.1. Escolha do probiótico

Segundo Saarela *et al.* (2000), para que um probiótico seja utilizado, deve possuir algumas características, incluindo segurança, além de aspectos funcionais e tecnológicos. Entre as especificações de segurança, estão incluídos os seguintes critérios: cepas para uso em humanos devem ser, preferencialmente, de origem humana, sendo isoladas do TGI de humanos saudáveis; devem possuir um histórico de não patogenicidade, incluindo histórico de não associação à endocardite bacteriana ou distúrbios do TGI; não desconjugar sais biliares (a desconjugação ou desidrogenação de sais biliares pode ter consequências deletérias no intestino delgado); e não portar genes transmissíveis de resistência a antibióticos.

De modo a se selecionar uma melhor cepa probiótica, alguns aspectos funcionais se destacam: resistir a baixos valores de pH e ao suco gástrico; possuir resistência a bile (propriedade importante para a sobrevivência no intestino delgado); apresentar aderência à superfície epitelial e persistência no TGI humano; ser imunoestimulante, mas não possuir efeito proinflamatório; possuir atividade antagônica contra patógenos, como *Helicobacter pylori*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e *Clostridium difficile*; e propriedades

antimutagênicas e anticarcinogências. Mesmo possuindo histórico de segurança e funcionalidade, alguns aspectos são de extrema importância para sua produção e processamento. São características tecnológicas desejadas: apresentar boas propriedades sensoriais; possuir resistência a bacteriófagos (conhecidos também como fagos); apresentar viabilidade durante o processamento; e estabilidade no produto e durante o seu armazenamento (SAARELA *et al.*, 2000).

1.3.2. Segurança dos probióticos e FDA

Complementarmente ao exposto a respeito da característica segurança, é esperado que os probióticos, prebióticos (discutidos a seguir), e produtos que os contenham sejam reconhecidos como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) usado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), órgão sanitário vigente dos Estados Unidos. Para serem aprovados como tal, deve haver um reconhecimento de sua segurança geral, através da experiência baseada no uso comum em alimentos. Seu reconhecimento é proveniente do histórico considerável de consumo para o uso alimentar por um número significativo de consumidores. Caso não haja um consumo anterior enquadrado no exposto acima, o reconhecimento de sua segurança geral pode ser decorrente de estudos científicos, os quais requerem quantidade e qualidade de evidência científica. Este rigor é equivalente àquele para obtenção da aprovação de uma substância como um aditivo alimentar (é entendido pelo FDA como qualquer substância adicionada intencionalmente a um alimento) e geralmente é baseado em estudos publicados, os quais devem ser comprovados por estudos ainda não publicados e outros dados e informações (FDA, 2004).

1.3.3. Mecanismos de atuação dos probióticos e seus efeitos benéficos

Segundo Parvez *et al.* (2006), não se sabe a maneira exata como os probióticos atuam. Contudo, três mecanismos podem ser especulados, a saber: efeitos bioquímicos, competição (nutrientes e sítios de adesão) e efeitos relacionados à imunidade do hospedeiro. Como exemplos de efeitos bioquímicos, são citados a produção de bacteriocinas e o efeito destrutivo de produtos do metabolismo dos probióticos sobre as bactérias patogênicas e a

redução do pH intestinal. Estes mecanismos dificultam a multiplicação de microrganismos patogênicos. Na competição por nutrientes, há uma disputa entre os microrganismos probióticos e os patogênicos por essas substâncias. Já a colonização está relacionada à ocupação de locais onde patógenos poderiam se alocar. São exemplos de efeitos relacionados à imunidade do hospedeiro: o aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade de macrófagos (FOOKS *et al.*, 1999; SAAD, 2006).

Diversos benefícios têm sido atribuídos aos probióticos, entre eles: controle da microbiota intestinal; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antimicrobianos; promoção da resistência gastrintestinal à colonização por patógenos; diminuição da população de patógenos, consequente à produção de ácidos acético e láctico, de bacteriocinas e outros compostos antimicrobianos; digestão da lactose em indivíduos com deficiência da produção de lactase; estimulação do sistema imune; alívio da constipação; aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas (FULLER, 1989; LEVRI *et al.*, 2005; SULLIVAN; NORD, 2005).

Há estudos que atribuem outros efeitos aos probióticos, ainda que não comprovadas, como: diminuição do risco de doenças cardiovasculares e câncer de cólon, diminuição da concentração plasmática de colesterol, atividade anti-hipertensiva, redução da atividade ulcerativa do *Helicobacter pylori*, controle da colite induzida por rotavírus e *Clostridium difficile*, prevenção de infecções urogenitais e, ainda, efeitos inibitórios sobre a mutagenicidade (CHARTERIS *et al.*, 1998; KLAENHAMMER, 2001; KAUR *et al.*, 2002; TUOHY *et al.*, 2003; GUARNER; MALAGELADA, 2003; SAAD, 2006).

1.3.4. Sobrevivência dos probióticos em produtos alimentícios

A viabilidade dos probióticos na matriz alimentícia é dependente de fatores, como pH, temperatura de armazenamento, presença de microrganismos competidores e inibidores (SAARELA *et al.*, 2000). A presença de oxigênio também é um fator deletério às células: de forma direta, como toxicidade; e de forma indireta, onde certas culturas, particularmente *Lb. delbrueckii*, na presença de oxigênio excretam peróxido de hidrogênio no meio (CHAMPAGNE *et al.*, 2005). Alimentos lácteos, como, por exemplo, queijos e,

principalmente, leites fermentados, podem apresentar decréscimo na viabilidade das culturas adicionadas. Contudo, estudos indicam que há queijos onde houve aumento na viabilidade dos probióticos (CHAMPAGNE *et al.*, 2005; KOMATSU *et al.*, 2008), como, por exemplo, queijo minas frescal, durante a sua vida de prateleira (SOUZA *et al.*, 2008). No exemplo mencionado, o queijo probiótico (com *Lactobacillus acidophilus*) sem a cultura iniciadora (*starter*) termofílica, apresentou 6,22 e 7,04 log UFC/g, respectivamente, após 7 e 14 dias de armazenamento. Adicionalmente, o conteúdo de gordura do leite oferece proteção durante a digestão do alimento (STANTON *et al.*, 1998).

Alimentos congelados apresentam a vantagem frente a outros, por permanecerem a baixas temperaturas durante o armazenamento. Desta forma, é verificada pouca ou nenhuma mobilidade dos diversos componentes presentes no alimento, por conta da cristalização da água, reduzindo-se, dessa forma, a sua interação, resultando em um fator de proteção dos probióticos empregados. Paralelamente, segundo Alamprese *et al.* (2005), diversos estudos mostram que temperaturas mais baixas podem assegurar uma maior taxa de sobrevivência e que a mortalidade aumenta com o tempo de armazenamento do produto.

A primeira fórmula desenvolvida para administrar deliberadamente bactérias lácticas foi um iogurte fermentado a partir de uma cultura chamada *la Lactobacilline*, isolada por Ilja Metjnikov (ou Eli Metchnikoff, em francês). O produto foi lançado em Paris, no início do século 20. Tal cultura consistia da associação de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (MOLIN, 2001). Desde então, tem sido extensamente estudado o uso de probióticos em alimentos, como leites fermentados e iogurtes, sendo estes os principais produtos comercializados no mundo, contendo culturas probióticas.

A suplementação de outros produtos lácteos com probióticos é frequente, destacando-se os iogurtes congelados, sorvetes e algumas variedades de queijo, a saber: queijo fresco tipo Minas (BURITI *et al.*, 2005a,b; BURITI *et al.*, 2007d; SOUZA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2009), *petit-suisse* (MARUYAMA *et al.*, 2006; CARDARELLI *et al.*, 2008b) e queijo fresco cremoso (BURITI *et al.*, 2007a,b), entre outros. Adicionalmente, a viabilidade desses microrganismos em alimentos como: doces (“*confectionary*”) (MATTILA-

SANDHOLM *et al.*, 2002), manjar branco (CORRÊA *et al.*, 2008), musse de chocolate (ARAGON-ALEGRO *et al.*, 2007; CARDARELLI *et al.*, 2008a) e musse de maracujá (BURITI *et al.*, 2007c) tem sido estudada.

O uso de probióticos em produtos alimentícios não lácteos é um desafio (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002). A pesquisa no campo dos probióticos, até o presente momento, tem sido focada a produtos lácteos. Entretanto, diversos outros povos consomem alimentos e bebidas não lácteos com microrganismos que podem, em alguns casos, ser considerados probióticos (BROWN *et al.*, 2005). Sua maioria está concentrada nos continentes africano e asiático, tendo como base cereais e legumes, de forma a complementar a qualidade protéica do produto fermentado (PRADO *et al.*, 2008).

Outros exemplos de alimentos tradicionais não lácteos que contém elevada concentração de lactobacilos são azeitonas em salmoura (*brined olives*), pepinos salgados e chucrute. Entretanto, há alimentos de origem vegetal, nos quais não são encontrados microrganismos vivos no momento do consumo, uma vez que não resistem a alguma etapa de produção como, por exemplo, massas-azedas (*sourdough*). Tais produtos são fermentados, entre outros, por bactérias lácticas (BAL), as quais são mortas durante a etapa de assagem do produto, não sendo, dessa forma, considerados como probióticos (MOLIN, 2001). Somente em 1994, foi produzido industrialmente, na Suécia, o primeiro produto probiótico isento de leite ou seus derivados, denominado Proviva®. Foi utilizada uma cepa de *Lb. plantarum* para fermentar o mingau de farinha de aveia adicionado de bebida à base de fruta (PRADO *et al.*, 2008).

1.3.5. *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp.

Segundo Gomes e Malcata (1999), Moro foi o primeiro pesquisador a isolar bastonetes anaeróbios estritos de fezes de lactentes alimentados com leite humano, nomeando-os de *Bacillus acidophilus*, um nome genérico para lactobacilos intestinais. Os lactobacilos são caracterizados como sendo bastonetes Gram-positivos, não esporulados e sem flagelos. São tanto aerotolerantes quanto anaeróbios e fermentadores estritos. Lactobacilos podem fermentar a glicose, produzindo o ácido láctico, no caso de cepas homofermentativas, ou quantidades equimolares de ácido láctico, gás carbônico

e etanol (e/ou ácido acético), no caso daquelas heterofermentativas. A maioria das cepas de *L. acidophilus* fermentam também: amigdalina, celobiose, esculina, frutose, galactose, lactose, maltose, manose, sacarose, salicilina e trealose. Seu pH e temperatura ótimos para multiplicação encontram-se nas faixas de 5,5-6,0 e de 35-40 °C, respectivamente

As bifidobactérias foram inicialmente isoladas e descritas por Tissier, por volta de 1900, a partir de fezes de lactentes alimentados com leite humano. Tais microrganismos são caracterizados como sendo Gram-positivos, catalase negativos, anaeróbios, não sendo esporulados e não possuindo mobilidade. Podem apresentar-se na forma de bastonetes pequenos e curvos, claviformes ou em forma de “Y”. Além disso, as bifidobactérias fermentam açúcares e produzem ácido acético e láctico, não produzindo CO₂, exceto na degradação do gluconato. Todas as bifidobactérias de origem humana fermentam, além da glicose, a galactose, lactose e, frequentemente, a frutose, também sendo capazes de usar carboidratos complexos como fonte de carbono. Seu pH e temperatura ótimos para multiplicação estão nas faixas de 6-7 e de 37-41 °C, respectivamente (GOMES e MALCATA, 1999).

1.4. Os ingredientes prebióticos e seus efeitos

Prebióticos são ingredientes fermentados seletivamente que permitem mudanças específicas, na composição e/ou na atividade da microbiota gastrointestinal. Eles conferem, dessa forma, benefícios ao hospedeiro, como bem-estar e saúde (ROBERFROID, 2007). Em outras palavras, são três as suas características fundamentais: não serem digeríveis, serem fermentados e serem seletivos.

Segundo Antunes (2007), os prebióticos empregados atualmente são: inulina, lactulose, lactiol, rafinose, fruto-oligosacarídeos, galacto-oligosacarídeos e amido resistente, sendo os principais utilizados a inulina e a oligofrutose. Roberfroid (2007) defende que estes últimos (além dos trans-galactoolisacarídeos) são os únicos ingredientes que atualmente preenchem os critérios de classificação para prebióticos. Tais compostos são denominados frutanos, termo genérico utilizado para descrever oligo ou polissacarídeos de origem vegetal e refere-se a qualquer carboidrato que contenha uma ou mais ligações frutossil-frutose predominando entre as ligações glicosídicas. Os

frutanos são encontrados amplamente no reino vegetal, constituindo-se no segundo polissacarídeo não-estrutural mais abundante, sendo o amido o mais encontrado (SAAD, 2006).

É atribuído aos prebióticos o efeito de modulação da composição da microbiota intestinal em suas diversas porções (ROBERFROID, 2002). Há estudos *in vitro* e *in vivo* que comprovam existir relação entre a ingestão de inulina e oligofrutose e o aumento de bactérias bifidogênicas, dessa forma sendo denominados como compostos bifidogênicos, uma vez que estimulam a multiplicação de tais bactérias (KAUR; GUPTA, 2002).

Estudos *in vivo* realizados em animais mostraram que o consumo de inulina está relacionado à redução do pH do ceco e o aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta, predominando o acetato, seguido do butirato e propionato (CARABIN; FLAMM, 1999). Em células saudáveis, o butirato é utilizado como fonte de energia, enquanto que, em células tumorais, o butirato reduz a sobrevivência de tais células, por induzir apoptose e inibir sua proliferação (SCHARLAU *et al.*, 2009). Outros estudos relacionam os oligossacarídeos não digeríveis em geral com: o alívio da constipação, consequente ao aumento da motilidade intestinal e do aumento do bolo fecal; o aumento da absorção de minerais, como cálcio e o magnésio; os efeitos hipocolesterolêmico e hipotrigliceridêmico; o tratamento de encefalopatia hepática (através da redução da produção de amônia e outras neurotoxinas ou de bactérias produtoras, quando há excessivo consumo de proteínas); e a influência na glicemia e insulinemia via retardo do esvaziamento gástrico e/ou diminuição do trânsito intestinal no intestino grosso (SWENNEN *et al.*, 2006).

1.4.1. A inulina como ingrediente prebiótico

Inulina é um termo genérico que compreende todos os frutanos lineares com ligações glicosídicas frutossil-frutose β (2-1). Caso haja necessidade de identificar os oligômeros *versus* os polímeros, os termos oligofrutose ou inulina podem ser usados, respectivamente (ROBERFROID, 2007). Devido à configuração β das ligações entre os monômeros de frutose, os frutanos do tipo inulina não são hidrolisados enzimaticamente por enzimas humanas salivares ou intestinais – específicas para ligações α -glicosídicas. Como resultado, os

frutanos do tipo inulina não são digeríveis e são fermentados no cólon (KELLY, 2008), assim como ocorre no caso de outras fibras na dieta. Eles exercem um efeito de aumento de volume, como consequência do aumento da biomassa microbiana que resulta de sua fermentação, bem como promovem um aumento na frequência de evacuações, efeitos estes que confirmam a sua classificação no conceito atual de fibras da dieta. Quando adicionados como ingredientes funcionais a produtos alimentícios normais, prebióticos típicos, como a inulina e a oligofructose, modulam a composição da microbiota intestinal, a qual exerce um papel primordial na fisiologia gastrintestinal (SAAD, 2006).

A inulina utilizada na indústria de alimentos é extraída principalmente de chicória (*Chicorium intybus*) e da alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus*) (CARABIN; FLAMM, 1999; KAUR; GUPTA, 2002). Contudo, também é encontrada em cebolas (*Allium cepa* Lineu), aspargos (*Asparagus officinalis*), trigo (*Triticum* spp.), banana (*Musa paradisíaca* Lineu), bardana (*Arctium lappa*), alho (*Allium sativum*), mel, aveia (*Avena sativa*) e centeio (*Secale cereale*) (BERGMARK *et al.*, 2001).

1.5. Os produtos simbióticos

Ao associarmos probióticos e prebióticos em um mesmo alimento, este é denominado como simbiótico. Dessa forma, o probiótico ingerido tem maior probabilidade de se fixar e multiplicar no intestino, por conta da prévia adaptação do probiótico ao substrato (SAAD, 2006). Sabe-se que eles comprovadamente trazem benefícios à saúde. Entretanto, ainda não se sabe se as vantagens individuais dos simbióticos se dão por conta de um efeito aditivo ou sinérgico dos probióticos e prebióticos (BIELECKA *et al.*, 2002).

1.6. O açaí e seus benefícios à saúde

O açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.), uma palmácea (Anexo 1), foi primeiramente descrito por Martius (1824). Este é nativo da Amazônia brasileira, sendo o estado do Pará o seu centro de dispersão natural. Populações espontâneas também são encontradas nos estados do Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Tocantins e em países da América do Sul (Colômbia, Equador, Guiana, Suriname e Venezuela) e na América Central (Panamá). No entanto, é na região do estuário do Rio Amazonas que se encontram as

maiores e mais densas populações naturais dessa palmeira, adaptada às condições elevadas de temperatura, precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar. Tais altas concentrações ocorrem em solos de várzeas e igapós, compondo ecossistemas de floresta natural ou em forma de maciços conhecidos como aç aizais, mas também podem ser encontradas em terra firme, próximo às várzeas e igapós (NOGUEIRA, 2006).

Seu fruto, o aç aí, se assemelha a um coco, porém é pequeno, possui de 1,0 a 1,5 cm de diâmetro e tem peso médio de 0,5 a 1,0 g. Segundo Tinoco (2005), ele é basicamente composto de polpa (15 %) e caroço (85 %). Sua coloração roxo-escuro é devida à alta concentração de antocianinas (flavonóides) (PEREIRA *et al.*, 2003).

A população de origem ribeirinha consome o aç aí com farinha de mandioca, podendo, também, ter peixe, camarão ou carne associado a esse consumo, sendo o aç aí um de seus alimentos básicos. Também é muito conhecida na região sua polpa ou seu suco, popularmente conhecido na região Norte do Brasil por “vinho” (SOUSA *et al.*, 2006). Adicionalmente, são feitos doces, geléias, licores, néctares e sorvetes a partir da fruta. Contudo, a forma na qual ele é mais conhecido fora de sua região de origem, é o *mix* de aç aí. Este é um gelado comestível, constituído, essencialmente, de polpa de aç aí e xarope de guaraná, podendo ser adicionado de outros ingredientes, como frutas, picadas ou batidas junto ao *mix*; e granola, entre outros. Nesta forma, o *mix* por ser consumido com o auxílio de colher. Caso seja desejada uma consistência mais fluida, adiciona-se água e bate-se em liquidificador antes de ser servido. Assim, ele pode ser consumido em copos, sendo chamado popularmente como “suco de aç aí”.

O consumo de aç aí tem apresentado crescimento expressivo nos últimos anos. O produto tem, também, boa receptividade entre esportistas e o público em geral nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, principalmente entre jovens e adultos jovens, em virtude do apelo energético e alto teor de antioxidantes presentes no fruto, sendo, desta forma, considerado um alimento com grande potencial funcional.

Algumas citações foram encontradas onde se avaliam potenciais efeitos benéficos do aç aí à saúde. Entretanto, esses benefícios foram testados

somente *in vitro*, sendo que a comprovação *in vivo* com estudos controlados ainda seria necessária.

Entre os fitoquímicos encontrados no açaí, destacam-se as antocianinas, as proantocianidinas e outros flavonóides (SCHAUSS *et al.*, 2006). Foram encontradas 50 mg/100 g de antocianinas em frutos manual e cuidadosamente descascados de açaí vindo do Pará, sendo que sua casca apresentou quantidade superior a cinco vezes (263 mg/100 g de casca), comparado ao encontrado no fruto descascado (BOBBIO *et al.*, 2000). Segundo Mojzisová e Kuchta (2001), os flavonóides apresentam uma vasta gama de atividades benéficas, tais como: anti-agregante plaquetário, anti-alérgico, anti-inflamatório, antilipoperoxidante, antineoplásico ou protetor gástrico. Foi demonstrado que o açaí inibe a produção de óxido nítrico (NO), através de mecanismo de inibição da atividade da óxido nítrico sintetase induzível. O NO tem efeitos benéficos como agente essencial na homeostase vascular, sendo o principal mediador citotóxico (destrói patógenos e células tumorais, entre outros mecanismos). Contudo, ele tem potencial tóxico. Essa toxicidade se faz presente, particularmente, em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante (DUSSE *et al.*, 2003).

1.7. A abrangência do mercado de alimentos funcionais e de alimentos funcionais probióticos

À medida que os consumidores percebem na alimentação uma alternativa para uma melhor qualidade de vida, estudos são dirigidos com a finalidade de buscar alternativas à demanda de alimentos mais saudáveis. Paralelamente, o reconhecimento do papel dos pro- e prebióticos como agentes benéficos por parte da população, intensifica a pesquisa e, assim, o interesse na indústria alimentícia em trazer produtos que satisfaçam as necessidades dos consumidores.

Alimentos funcionais são encontrados em diversas categorias de alimentos. Contudo, produtos não são homogeneamente dispersos sobre tais segmentos desse mercado em expansão. O desenvolvimento e comércio de tais produtos são de alta complexidade, caros e arriscados, à medida que requisitos especiais devem ser respondidos. Além dos obstáculos tecnológicos em potencial, aspectos legislativos, assim como as demandas dos

consumidores, devem ser levados em consideração ao se desenvolver novos alimentos funcionais. Em particular, a aceitação por parte dos consumidores tem sido reconhecida como um fator chave no sucesso de um produto (SIRÓ *et al.*, 2008). Deve ser ressaltado que os estudos podem não considerar as próprias legislações dos países como referência para delimitar a inclusão ou não dos alimentos na categoria de produtos funcionais.

Os maiores mercados atualmente são os Estados Unidos da América, Europa e Japão, sendo previsto um volume de vendas somente nos EUA de 25 bilhões de dólares em 2009. Na Europa, estimou-se um consumo de alimentos funcionais na ordem de 15 bilhões em 2006, sendo os principais mercados a Alemanha, França, Reino Unido e Holanda. Deve-se ressaltar que o mercado europeu é heterogêneo, uma vez que o consumo de tais alimentos é observado com maior frequência em países da Europa Central e do Norte. Em países do Mediterrâneo, alimentos naturais e frescos são vistos como mais saudáveis. Não é de se surpreender que o Japão, país criador do conceito de alimentos funcionais, possuía mais de 500 produtos FOSHU em 2005. Seu mercado foi estimado, em 2006, em 5,73 bilhões de dólares (SIRÓ *et al.*, 2008).

Segundo Benkouider (2005), analista do Euromonitor International, estima-se que o mercado funcional brasileiro alcance 1,9 bilhão de dólares em 2009. O mercado brasileiro está à frente de outras economias de rápida evolução, como México, China, Coreia do Sul, Hungria, Polônia e Rússia. A principal categoria são os produtos lácteos funcionais, os quais corresponderam a 1,1 bilhão de dólares em 2004, equivalente a 73 % das vendas de funcionais e 11 % das vendas de lácteos.

É estimado que, em 2005, tenham sido lançados 379 produtos ao redor do mundo destinados à saúde intestinal, em particular os probióticos, desempenhando estes um papel importante dentre os alimentos funcionais. Estimou-se, em 2004, que os produtos probióticos lácteos corresponderam a 56 % dos 31,1 bilhões de dólares em vendas mundiais de alimentos funcionais. Os mercados mais importantes de tais produtos são: Croácia, Escandinávia, Estônia, Holanda e Suíça, enquanto a Espanha, França e Grécia podem ser considerados mercados em desenvolvimento (SIRÓ *et al.*, 2008). Adicionalmente, o mercado probiótico é um dos setores que mais cresce no mercado de lácteos frescos (JONES; JEW, 2007).

Embora ainda pouco explorado, há um crescente mercado para probióticos não lácteos. Sucos de frutas também têm sido sugeridos como meios apropriados para a adição de culturas, por já serem posicionados como produtos saudáveis e serem consumidos, frequentemente e lealmente, por grande percentagem de consumidores (SIRÓ *et al.*, 2008). Adicionalmente, microrganismos probióticos, como *Lactobacillus* GG (LUCKOW; DELAHUNTY, 2004b) e *Lactobacillus plantarum* (LUCKOW; DELAHUNTY, 2004a) possuem viabilidade durante o processamento em determinados alimentos à base de frutas e são estáveis durante o seu armazenamento. Essas características tecnológicas são de extrema importância, uma vez que não há proteção conferida pelo leite ou seus constituintes nessa classe de alimentos probióticos.

Dados globais, ou mesmo locais, contendo informações a respeito do mercado de probióticos não lácteos são escassos, mas acredita-se que este esteja em expansão. São encontrados dados pontuais a respeito desse mercado. Por exemplo, é afirmado que uma linha de sucos de frutas na Suécia contendo probióticos, lançada em 1994, apresentou crescimento de 15 a 25 % ao ano (PROBI, 2009).

1.8. A importância da suplementação de *mix* de açaí com ingredientes probióticos e prebióticos

Como exposto anteriormente, há uma grande demanda por produtos conhecidos, em versões mais saudáveis, por parte dos consumidores. O *mix* de açaí é um alimento conhecido há muito tempo no Norte e Nordeste brasileiro e atualmente é vastamente conhecido no Brasil como um todo, sendo também conhecido em países europeus, nos EUA e no Japão. No exterior, o açaí é conhecido por ser, além de exótico, um alimento saudável, trazendo consigo, como principal apelo, os benefícios conferidos pelas antocianinas, presentes em grande quantidade no fruto e, principalmente, em sua casca. Adicionalmente, por ser um alimento congelado, seu período de armazenamento é maior, quando comparado a alimentos refrigerados, possuindo, assim, maior vida de prateleira. Dessa forma, esse alimento possui grande potencial para se tornar um alimento funcional probiótico e/ou prebiótico reconhecido nacional e internacionalmente.

Adicionalmente, grupos especiais podem fazer uso desse novo alimento. Alimentos probióticos são frequentemente vendidos na forma de leites fermentados e iogurtes; contudo, com o aumento do vegetarianismo, sobretudo em países desenvolvidos (BEARDSWORTH; KEIL, 1992), há uma demanda por produtos probióticos vegetarianos. Indivíduos com intolerância à lactose podem consumi-lo, por não haver adição de leite e/ou algum de seus derivados. Por fim, esse alimento pode ser consumido por indivíduos que objetivam reduzir a ingestão de colesterol, uma vez que este possui exclusivamente derivados vegetais em sua composição.

Assim, o desenvolvimento de um produto que aliasse os benefícios atribuídos ao açaí àqueles atribuídos aos ingredientes probióticos e prebióticos seria de grande importância, para atender as demandas do mercado consumidor com relação à disponibilidade de alimentos mais saudáveis e funcionais, além de impulsionar a pesquisa brasileira no campo dos alimentos probióticos e prebióticos não lácteos. Consequentemente, o presente trabalho tem o objetivo de incorporar probióticos e/ou prebióticos ao *mix* de açaí, a fim de obter produtos com potencial funcional, que poderão ser destinados ao consumo por parte de todos os segmentos da população, incluindo, entre outros, jovens, idosos e, possivelmente, vegetarianos e indivíduos intolerantes à lactose e podendo estender-se ao mercado externo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Desenvolver um *mix* de açaí que apresente aspectos nutricionais e sensoriais semelhantes ao produto tradicional, porém com propriedade funcional suplementar, por se tratar de um alimento probiótico, prebiótico ou simbiótico.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o *mix* de açaí suplementado com microrganismos probióticos e/ou ingrediente prebiótico físico-química e sensorialmente;
- Avaliar o efeito do armazenamento sobre a viabilidade do probiótico e as características físico-químicas, física e sensoriais dos produtos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Produção e armazenamento

O delineamento experimental conduzido foi inteiramente aleatorizado, utilizando um planejamento fatorial 2^2 , constituído de 2 fatores (culturas probióticas e ingrediente prebiótico inulina), em 2 níveis (presença ou ausência), para o qual foram realizados experimentos para todas as possíveis combinações nos níveis dos fatores (BARROS NETO *et al.*, 2007; LAWLESS; HEYMANN, 1999), com 3 repetições. Portanto, foram realizadas 4 combinações em termos de adição ou não de probióticos e/ou de inulina (prebiótico) durante a elaboração dos novos produtos a base de açaí, conforme descrito na Tabela 1:

Tabela 1. Variáveis envolvidas na produção das formulações de *mix* de açaí.

Formulação	<i>L. acidophilus</i> ^a e <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> ^b	Inulina ^c
M1	-	-
M2	+	-
M3	-	+
M4	+	+

Adição (+), não adição (-).

^a cultura de *Lactobacillus acidophilus* La-5 (Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca).

^b cultura de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Christian Hansen).

^c Inulina (Beneo HSI™, Orafiti, Oreya, Bélgica).

Os *mixes* de açaí das diversas formulações (controle, probiótico, prebiótico e simbiótico) foram produzidos conforme fluxograma mostrado na Figura 1, respeitando as boas práticas de processamento (*GMP*).

Figura 1. Etapas envolvidas na produção do *mix* de açaí das diferentes formulações estudadas.

¹ em triturador industrial (mod. 48, Lucre Ltda, Catanduva, Brasil)

A Figura 1 ilustra as etapas gerais de fabricação para as quatro formulações (M1-M4) desenvolvidas no presente trabalho. Ao final de cada lote produzido, foram obtidos 2,2 kg a 3 kg em função da formulação e suas análises correspondentes. Os novos produtos foram preparados, utilizando-se

como matéria-prima polpa de açaí industrializado congelado a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Icefruit Maisa, Tatuí, Brasil) e xarope de guaraná (Lú-mirin, Rio de Janeiro, Brasil), de acordo com a Tabela 2. A polpa de açaí teve sua temperatura de congelamento elevada (descongelamento parcial), através da sua manutenção em cabine refrigerada de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Metalfrio, mod. VB43R, São Paulo, Brasil), por cerca de 1 hora. Em seguida, foi adicionado xarope de guaraná, com posterior mistura em triturador de alimentos industrial (mod. 48, Lucre Ltda, Catanduva, Brasil) a 3450 rpm por 40 segundos, objetivando a completa fragmentação da polpa de açaí e resultando em um primeiro *mix* de açaí. Paralelamente, em béquer de vidro, os sólidos foram solubilizados ou suspensos em água aquecida em banho de água ($80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para tal, foi adicionado ou não o ingrediente prebiótico (Beneo[®] HSI, Orafiti, Tienen, Bélgica - M3 e M4), e misturado por 20 segundos.

Em seguida, foram adicionados o sistema emulsificantes/espessantes (mono/diglicerídeos de ácidos graxos, polisorbato 80, goma guar, carboximetilcelulose, goma carragena e silicato de cálcio) (Sherex[®] IC9516, Kerry, Rochester, EUA) e o açúcar (Nova América S.A., Tarumã, Brasil) ao béquer, sendo, então, misturados, vigorosamente, por 30 segundos. A mistura de sólidos em água quente foi vertida no liquidificador industrial, contendo o *mix* de açaí inicialmente preparado, sendo, em seguida, misturada por 20 segundos. As culturas liofilizadas do tipo DVS (*direct vat set*) de *Lactobacillus acidophilus* La-5 (Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca) ($8,20 \pm 0,02$ log UFC/g da cultura de *Lactobacillus acidophilus* La-5 DVS (HARAMI, 2008)) e cultura de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Christian Hansen) ($9,66 \pm 0,27$ log UFC/g da cultura de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 DVS (HARAMI, 2008)) (M2 e M4) foram adicionadas, ou não, diretamente ao *mix* de açaí, misturando-se por 20 segundos.

Os produtos foram transferidos para a produtora de sorvetes Skymssen (mod. BSK-16, Metalúrgica Siemens, Brusque, Brasil) a qual possuía a solução refrigerante a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, para serem congelados por 15 minutos, a fim de se evitar a formação de cristais de gelo grandes e apresentar pequeno aumento de volume, consequente da baixa incorporação de ar. Desta forma, os produtos obtidos apresentavam $4,02 \pm 1,09\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, foram acondicionados em embalagens plásticas, com capacidade de 50 ml, próprias para alimentos

(polipropileno branco), seladas com selo aluminizado (seladora Delgo nº 1968, Cotia, Brasil) e armazenadas em congelador a -18 °C (Metalfrio, mod. VF50R/C, São Paulo, Brasil), por até 3 meses, para simular as condições usuais de comercialização e preparo do produto.

Entretanto, parte das amostras utilizadas nas análises físico-químicas (item 3.5) foi liofilizada logo após a sua produção. Para tal, as embalagens seladas contendo os produtos foram armazenadas em ultra congelador Kelvinator series 100 (Kelvinator Commercial Products, Manitowoc, EUA) a -76 °C durante 1 dia e, posteriormente, foram submetidas à liofilização (Edwards, mod. L4KR 118, São Paulo, Brasil) por 4 dias. O armazenamento das amostras já liofilizadas foi realizado em temperatura ambiente na embalagem original selada novamente, com exceção das amostras utilizadas nas análises de determinação de fenólicos totais e antocianinas totais e potencial antioxidante que foram armazenadas em congelador a -18 °C.

Tabela 2. Proporção dos ingredientes utilizados no preparo dos *mixes* de açaí.

Ingredientes (%)	Formulação			
	M1	M2	M3	M4
Polpa de açaí ¹	65,79	65,70	61,94	61,85
Xarope de guaraná ²	16,45	16,42	15,48	15,46
Água	14,04	14,02	13,22	13,20
Açúcar refinado ³	3,19	3,19	3,00	3,00
Emulsificantes e espessantes ⁴	0,53	0,53	0,50	0,50
Inulina ⁵	-	-	5,85	5,85
<i>L. acidophilus</i> ⁶	-	0,07	-	0,07
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> ⁷	-	0,07	-	0,07
Total	100,00	100,00	100,00	100,00

¹ Polpa de açaí (Icefruit Maisa, Tatuí, Brasil) (teor de sólidos totais de $10,71 \pm 0,63$ g/100 g de polpa de açaí, conteúdo de sólidos solúveis $1,9 \pm 0,11$ °Brix e teor de lipídios $40,86 \pm 0,11$ g/100 g em base seca), ² xarope de guaraná (Lú-mirin, Rio de Janeiro, Brasil) (conteúdo de sólidos solúveis $55,38 \pm 5,28$ °Brix), ³ açúcar refinado (Nova América S.A., Tarumã, Brasil), ⁴ emulsificantes e espessantes (Sherex® IC9516R, Kerry, Rochester, EUA), ⁵ (Beneo® HSI, Orafiti, Tienen, Bélgica), ⁶ cultura de *Lactobacillus acidophilus* La-5 (Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca), ⁷ cultura de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Christian Hansen).

3.2. Períodos de amostragem

O teor de umidade (item 3.5) foi determinado após a fabricação dos produtos (dia 0). As demais características físico-químicas (item 3.5) dos produtos foram determinadas a partir de amostras liofilizadas dos produtos

previamente congelados. As medidas de pH, determinação de cor e análises microbiológicas (itens 3.3, 3.4 e 3.6, respectivamente) foram realizadas no dia seguinte à sua fabricação e durante sua vida de prateleira, a saber: semanalmente, durante o primeiro mês e mensalmente, 2 e 3 meses após sua produção, de forma a se obter um efetivo acompanhamento da viabilidade dos probióticos. Todas as análises foram realizadas em triplicata. As análises sensoriais (item 3.6) das diversas formulações foram realizadas 7, 42 e 84 dias após a sua produção.

3.3. Análises físico-químicas

As determinações do teor de sólidos totais (realizada em estufa a vácuo a 70 °C, modelo 440/D, Nova Ética, Vargem Grande Paulista, Brasil), do teor de cinzas totais, do teor de lipídios (utilizando extrator de Soxhlet) e do teor de proteínas (através do método de micro-Kjeldahl) foram realizadas conforme metodologia oficial (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

Adicionalmente, foram realizadas medidas de pH a partir de leitura direta em medidor de pH Orion Modelo *Three Stars* (Analyser Comércio e Indústria Ltda., São Paulo, Brasil), empregando-se um Eletrodo tipo Penetração modelo 2AO4 GF (Analyser).

3.4. Análise física

Foi determinada a cor de amostras de todas as formulações nos períodos descritos no item 3.2, com o auxílio de espectrofotômetro Color Quest XE (Hunter Laboratory Associates Inc., Reston, EUA) equipado com lâmpada de D⁶⁵ (padrão de luz solar), sendo o ângulo de observação 10°. As amostras foram acomodadas em cubeta de quartzo, de modo que todo o seu conteúdo fosse preenchido. Foram feitas leitura de ambos os lados da cubeta, para determinar os valores de CIE: L* (medição do escuro ao claro, luminosidade), a* (medição do verde ao vermelho), b* (medição do azul ao amarelo), ΔE^* (diferenças totais da coloração) ($\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$), C* (saturação, tonalidade) e h° (coloração); conforme recomendado pelo fabricante.

3.5. Análise sensorial

Foram realizadas 12 análises sensoriais (quatro formulações em três períodos de armazenamento), tendo participado, em cada uma, 50 voluntários adultos (provadores), metade destes no período matutino e a outra metade no período vespertino. Provadores de ambos os sexos participaram deste estudo, sendo estes alunos de graduação ou pós-graduação, docentes e funcionários da Universidade de São Paulo ou outros voluntários saudáveis interessados em participar. Todos os provadores aceitaram consumir as amostras, previamente às análises, atestando: gostar do produto testado, serem consumidores de *mix* de açaí e não possuírem algum problema de alergia ou intolerância relacionado a algum ingrediente presente nas formulações testadas no presente estudo. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Ofício CEP número 53 de 2008, Anexo 2).

A aceitabilidade de todas as formulações foi comparada após 7, 42 e 84 dias de armazenamento, em cabines individuais. Amostras de aproximadamente 20 g foram batidas em liquidificador (Magic Bullet®, modelo MB1001, Homeland Housewares, Los Angeles, EUA), imediatamente antes de seu oferecimento a cada provador. As amostras foram servidas nas próprias embalagens plásticas em que foram previamente armazenadas, com uma colher descartável. Foi empregada uma escala hedônica de 9 pontos, onde “um” representava “desgostei muitíssimo” e “nove” “gostei muitíssimo”, baseado em aparência, textura e sabor (LAWLESS; HEYMANN, 1999). Adicionalmente, também questionado sobre o atributo mais e menos apreciado (Anexo 3).

3.6. Análises microbiológicas

Decorridos os tempos de armazenamento descritos no item 3.2, porções de 25 gramas dos produtos (retiradas em condições de assepsia) foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1 % (diluição 10^{-1}), utilizando-se um “Bag Mixer” 400 (Interscience, St. Nom, França). Diluições decimais subsequentes foram preparadas, utilizando o mesmo diluente.

Nas formulações M2 (probiótico) e M4 (simbiótico) foram realizadas as contagens das bactérias probióticas, a fim de estabelecer a sua viabilidade. A contagem de *L. acidophilus* foi realizada, utilizando o ágar DeMan-Rogosa-

Sharpe (MRS) modificado, preparado como meio basal e adicionado de maltose, em substituição à glicose, conforme descrito pela International Dairy Federation (IDF Standard 306, 1995), fundido e resfriado a cerca de 45 °C e a sementeira realizada em profundidade (*pour plate*). Para este fim, alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas de Petri estéreis e adicionadas de ágar. Após homogeneização e endurecimento do ágar, as placas foram incubadas em aerobiose a 37 °C por 48 horas.

A contagem de *Bifidobacterium* spp. foi realizada, utilizando, também, a técnica de sementeira em profundidade de 1 mL de cada diluição em ágar MRS (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), adicionado de cloreto de lítio (Merck) (0,2 % m/v) e propionato de sódio (Sigma-Aldrich) (0,3 % m/v) - ágar MRS-LP, com 72 horas de incubação a 37 °C em anaerobiose (Sistema de Anaerobiose Anaerogen, Oxoid), conforme descrito por LAPIERRE *et al.* (1992) e por VINDEROLA e REINHEIMER (1999).

3.7. Análises estatísticas

Os resultados das análises de composição centesimal, teor de sólidos e pH foram verificados pelo modelo de GLM (General Linear Models) uma vez que o desenho amostral não estava balanceado. Foi verificada normalidade dos resultados, com exceção dos resultados das análises de lipídeos e proteínas. Em seguida, o teste de Tukey HSD foi realizado para identificar diferenças entre as formulações na interação formulações x tempo.

Nas análises de sensoriais, primeiramente foi conferida a homogeneidade das variâncias de todas as formulações e das respostas dos 50 provadores pelo teste Hartlett ($p = 0,424$) e foram comparados com o resíduo, usando MANOVA (análise de variância multivariada). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as respostas dos provadores ($p = 0,126$). Esse fato significa que as respostas foram consensuais. Em seguida, os resultados observados nos três intervalos de tempo (após 7, 42 e 84 dias) foram submetidos à ANOVA para medidas repetidas. Nesse caso, não foi verificada homogeneidade das variâncias ($p < 0,001$) dos resultados ao 84º dia, e os resultados da ANOVA foram convertidos em valores transformados ($\cos x$). O teste de Tukey HSD foi utilizado para identificar diferenças na interação (formulações x tempo). A média dos

resultados de cada formulação foi submetida à ANOVA fatorial (2^2), onde foi analisada a interação entre o fator 1 (presença de cultura probiótica) e o fator 2 (adição do ingrediente prebiótico) na aceitabilidade sensorial dos produtos. Nesse caso, a homogeneidade das variâncias também foi verificada pelo teste de Hartlett ($p = 0,944$) e as diferenças foram identificadas pelo teste de Tukey HSD.

As análises microbiológicas apresentaram homogeneidade de variâncias, conferida pelo teste de Hartlett e, conseqüentemente, foram submetidos à ANOVA de medidas repetidas seguida do teste de Tukey HSD.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Composição centesimal e teor de sólidos

Os resultados das análises de composição centesimal e teor de sólidos revelaram que as formulações M1 e M2 apresentaram valores próximos entre si, de um modo geral, quando comparadas às formulações M3 e M4, conforme ilustrado na Tabela 3. Estas diferenças são atribuídas, basicamente, à presença de inulina nas formulações M3 e M4.

Os valores de sólidos totais e carboidratos dos *mixes* prebiótico e simbiótico são superiores aos das demais amostras, por conterem a fibra prebiótica, conforme mencionado anteriormente. De modo contrário, os valores das demais análises para as amostras supracitadas são inferiores quando comparados aos valores das formulações M1 e M2, uma vez que, a adição de inulina se apresenta como um fator de diluição para o demais nutrientes e cinzas. Adicionalmente, foi verificado o efeito de diluição da inulina na determinação de fenólicos totais, antocianinas totais e capacidade antioxidante (Anexo 4).

Tabela 3. Composição centesimal e teor de sólidos (média $\pm$ desvio padrão) obtidos para os diferentes mixes de açaí estudados. (vide Tabela 1 para a descrição das formulações M1–M4).

	Formulação			
	M1	M2	M3	M4
Sólidos (%)	21,24 ± 0,45 ^b	21,22 ± 0,49 ^b	26,25 ± 0,60 ^a	26,01 ± 0,74 ^a
Carboidratos (%) ^{1,2}	5,81 ± 1,84 ^{b*}	8,70 ± 0,48 ^b	15,87 ± 1,16 ^a	16,53 ± 0,75 ^a
Lipídios (%) ¹	10,62 ± 1,58 ^{a*}	7,81 ± 0,83 ^b	7,25 ± 1,76 ^b	5,76 ± 0,78 ^c
Proteínas (%) ¹	3,35 ± 0,18 ^{a*}	3,62 ± 0,28 ^a	2,63 ± 0,39 ^c	2,88 ± 0,17 ^b
Cinzas (%) ¹	1,22 ± 0,13 ^a	1,08 ± 0,02 ^b	0,86 ± 0,07 ^c	0,84 ± 0,04 ^c

^{a,b,c} sobrescritas distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes formulações. Os valores são representados em média ± desvio padrão ($n = 3$). * ($n = 2$). (vide Tabela 1 para a descrição das formulações M1–M4).

¹ base seca; ² calculado por diferença para se obter 100% dos sólidos

4.2. Evolução do pH

No Brasil, é preconizado pelo ANVISA (1999b) que a polpa de fruta de açaí deve apresentar pH mínimo de 4,0 e máximo de 6,2. Sendo a polpa de açaí o principal constituinte dos produtos desenvolvidos, seu pH é fortemente influenciado pela mesma, conforme verificado na Tabela 4. Os outros constituintes implicam fracamente no pH final.

Tabela 4. Evolução do pH das diferentes formulações de *mixes* de açaí estudados durante o armazenamento a -18 °C por 84 dias. (vide Tabela 1 para a descrição das formulações M1–M4).

Armazenamento (dias)	pH			
	M1	M2	M3	M4
1	3,97 ± 0,08	3,96 ± 0,08	3,93 ± 0,08	4,09 ± 0,26
7	3,95 ± 0,05	4,02 ± 0,15	3,94 ± 0,10	4,08 ± 0,04
14	3,97 ± 0,07	4,24 ± 0,24	3,96 ± 0,07	3,96 ± 0,10
21	3,97 ± 0,09	4,00 ± 0,07	4,06 ± 0,14	4,04 ± 0,10
28	3,97 ± 0,09	4,01 ± 0,04	3,97 ± 0,14	4,12 ± 0,09
56	4,19 ± 0,34*	3,95 ± 0,08*	3,97 ± 0,12	4,11 ± 0,15
84	4,09 ± 0,16	4,00 ± 0,04	4,06 ± 0,19	4,13 ± 0,10*
Média geral (formulações)	3,98 ± 0,07 ^b	4,00 ± 0,09 ^b	3,98 ± 0,12 ^b	4,07 ± 0,13 ^a

^{a,b} sobresscritas distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes formulações. Não houve diferença significativa ao longo do tempo ($p > 0,05$). Os valores são representados em média ± desvio padrão ($n = 3$). * ($n = 2$). (vide Tabela 1 para a descrição das formulações M1–M4).

Não houve alterações expressivas no pH durante o armazenamento a -18 °C por 84 dias ($p > 0,05$). De fato, de acordo com Sun (2006), o congelamento rápido resulta em um considerável aprisionamento dos solutos pelos cristais em formação e uma maior dispersão dos solutos na fase não congelada. Quanto menor a concentração dos solutos, menor a força iônica e menores as variações do pH. Diferentemente, foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a média geral do pH das diferentes formulações ($p < 0,05$). Entretanto, a esta diferença não acarretou alterações importantes nos produtos finais nas análises de cor, sensoriais e microbiológicas, conforme ilustrado nos itens 4.3, 4.4 e 4.5, respectivamente.

4.3. Evolução dos parâmetros de coloração instrumental

Os parâmetros CIE a^* , b^* , C^* e h° mostraram uma leve tendência de decréscimo ao longo do armazenamento dos produtos congelados, conforme ilustrado na Tabela 1. Ao contrário, as mudanças no parâmetro L^* indicam um pequeno aumento. Desta forma, foi verificado que, ao longo do armazenamento, os produtos apresentam as seguintes tendências: ao claro, à perda da intensidade da cor (tendência ao cinza) e ao deslocamento para a cor vermelha. Todas as formulações, incluindo o próprio controle, revelaram diferenças totais da coloração (ΔE^*), decrescentes ao longo do

armazenamento, indicando uma maior proximidade ao *mix* controle (M1 ao primeiro dia de armazenamento).

Tabela 5. Evolução dos parâmetros de coloração das diferentes formulações de *mixes* de açaí estudados durante o armazenamento a -18 °C por 84 dias. (vide Tabela 1 para a descrição das formulações M1–M4).

Armazenamento				Parâmetros CIE de cor									
(dias)		L*		a*		b*		ΔE*		C*		h°	
M1	1	17,69	± 2,99	12,97	± 0,66	13,14	± 2,17			18,51	± 1,78	45,03	± 4,44
	7	15,21	± 1,99	12,80	± 0,91	13,95	± 1,68	3,45	± 1,49	18,94	± 1,82	47,32	± 1,74
	14	15,00	± 1,45	13,03	± 0,94	14,35	± 1,96	3,61	± 1,53	19,40	± 2,04	47,56	± 2,21
	21	16,06	± 0,66	12,21	± 0,88	12,92	± 1,72	2,63	± 0,56	17,78	± 1,85	46,46	± 1,71
	28	15,79	± 1,18	12,36	± 0,67	13,15	± 1,76	2,84	± 0,79	18,06	± 1,72	46,58	± 2,39
	56**	16,22	± 0,65	12,14	± 0,41	12,75	± 0,61	1,94	± 0,30	17,61	± 0,70	46,39	± 0,70
	84	18,32	± 1,23	12,01	± 0,93	11,51	± 0,69	2,46	± 0,81	16,66	± 0,76	43,84	± 2,97
M2	1	15,86	± 0,93	13,03	± 0,79	14,86	± 2,04	3,05	± 1,57	19,77	± 2,04	48,54	± 2,32
	7	16,10	± 0,91	13,19	± 0,74	15,17	± 2,00	3,12	± 1,46	20,11	± 1,97	48,78	± 2,40
	14	16,26	± 0,73	12,98	± 0,81	14,83	± 2,19	3,00	± 1,29	19,73	± 2,16	48,54	± 2,60
	21	15,97	± 0,80	12,91	± 0,77	14,35	± 1,75	2,76	± 0,94	19,31	± 1,79	47,86	± 2,06
	28	16,35	± 0,79	12,19	± 0,83	13,21	± 1,69	2,37	± 0,86	17,98	± 1,80	47,14	± 1,72
	56	19,04	± 1,53	12,33	± 0,37	12,43	± 0,93	1,99	± 1,43	17,52	± 0,50	45,17	± 2,84
	84	17,74	± 1,05	11,57	± 0,34	12,51	± 0,56	1,80	± 0,76	17,04	± 0,61	47,22	± 0,73
M3	1	14,22	± 2,64	13,15	± 0,57	13,74	± 0,80	3,86	± 2,30	19,04	± 0,59	46,23	± 2,39
	7	15,08	± 1,41	12,43	± 1,45	13,21	± 3,12	4,13	± 1,80	18,17	± 3,25	46,19	± 3,54
	14	14,77	± 2,66	12,84	± 0,68	12,99	± 1,99	3,89	± 2,14	18,29	± 1,82	45,06	± 3,23
	21	14,86	± 1,70	12,62	± 0,74	13,37	± 1,98	3,69	± 1,27	18,40	± 1,94	46,41	± 2,59
	28	15,27	± 0,96	12,28	± 0,57	12,67	± 1,53	3,00	± 0,98	17,66	± 1,49	45,74	± 2,15
	56	16,49	± 2,17	12,15	± 1,10	11,59	± 2,06	3,65	± 0,93	16,84	± 1,90	43,38	± 4,57
	84**	18,10	± 1,40	12,69	± 0,68	11,71	± 1,22	2,19	± 1,09	17,31	± 0,52	42,62	± 4,31
M4	1	14,94	± 0,88	13,48	± 0,74	15,34	± 2,04	4,02	± 1,33	20,44	± 2,01	48,49	± 2,23
	7	14,66	± 1,28	13,76	± 1,18	15,86	± 2,64	4,74	± 2,12	21,02	± 2,72	48,78	± 2,65
	14	16,06	± 0,76	12,18	± 0,60	12,92	± 1,33	2,29	± 0,81	17,76	± 1,37	46,58	± 1,53
	21	15,41	± 1,73	12,70	± 0,70	13,45	± 1,42	2,86	± 1,57	18,50	± 1,45	46,53	± 1,87
	28	15,24	± 1,08	12,51	± 0,65	13,53	± 1,30	2,95	± 0,89	18,43	± 1,39	47,14	± 1,34
	56	16,32	± 0,54	11,94	± 0,59	12,58	± 1,28	2,27	± 0,55	17,35	± 1,33	46,39	± 1,47
	84**	17,71	± 0,33	12,69	± 0,88	11,56	± 0,84	1,92	± 0,59	17,20	± 0,28	42,36	± 3,94

Os valores são representados em média ± desvio padrão (n = 3). ** (n=2)

Tais alterações observadas nos parâmetros CIE de cor, provavelmente, não acarretariam em mudanças expressivas na aceitação dos produtos, por conta da sua pequena magnitude e baixa luminosidade (14,66 a 19,04). Segundo HunterLab e Izasa (2001), indivíduos questionam mais alterações de coloração (h°), quando comparadas a diferença de saturação (C^*), sendo ainda menos questionadas alterações na luminosidade (L^*). Adicionalmente, é afirmado que, devido à não uniformidade do espaço de cor, quanto mais escuro são menos questionáveis alterações nos valores a^* e b^* . Estudos de comparações pareadas deveriam ser conduzidos, com a finalidade de confirmação da percepção de alterações visuais dos produtos no decorrer do armazenamento estudado. Entretanto, conforme apontado anteriormente, a partir das características intrínsecas do produto, estima-se a não percepção de suas alterações pelo olho humano.

4.4. Avaliação sensorial dos *mixes*

Os resultados de aceitabilidade sensorial dos *mixes* de açaí encontram-se na Tabela 6. Valores médios iguais ou superiores a 7 (gostei regularmente) indicam uma aceitação satisfatória para o produto.

Tabela 6. Resultados de aceitabilidade sensorial das diferentes formulações (M1-M4) em três períodos de armazenamento.

Armazenamento (dias)	Formulação			
	M1	M2	M3	M4
7	7,0 ± 1,4 ^{ab}	7,2 ± 1,4 ^{ab}	7,6 ± 1,2 ^{ab}	7,7 ± 1,5 ^a
42	7,2 ± 1,6 ^{ab}	7,1 ± 1,2 ^{ab}	7,4 ± 1,4 ^{ab}	7,4 ± 1,5 ^{ab}
84	7,6 ± 1,0 ^{ab}	6,8 ± 1,6 ^b	7,3 ± 1,1 ^{ab}	7,8 ± 0,9 ^a

^{a,b} sobrescritas distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes formulações. Não houve diferença significativa ao longo do tempo. Os valores são representados em média ± desvio padrão. (vide Tabela 1 para a descrição das formulações M1–M4).

A aceitabilidade dos produtos não diferiu significativamente ao longo do tempo ($p > 0,05$). Diferentemente, foram percebidas diferenças entre as formulações ($p < 0,001$). A maior aceitabilidade foi observada para o M4, aos 7 e 84 dias de armazenamento, e a menor para o M2, aos 84 dias de armazenamento.

O efeito de interação da associação probióticos e prebiótico na aceitabilidade foi estatisticamente significativo ($p = 0,036$), como mostrado na Figura 2. Os resultados das quatro formulações foram comparados, sendo que a M4 obteve a maior nota, em média (7,6). Desta forma, uma diferenciação positiva decorrente da adição de fibra foi observada e estes produtos obtiveram uma aceitação superior em sua presença. De modo contrário, Aragon-Alegro *et al.* (2007) reportaram que a adição de inulina não interferiu na preferência sensorial de uma musse de chocolate simbiótica.

Figura 2. Efeito da interação entre os probióticos e a inulina na aceitabilidade média dos produtos.

É provável que a adição de probióticos não resultou em alteração da aceitação, por se tratar de um produto congelado ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$). A atividade metabólica dos probióticos em temperaturas inferiores a zero é muito pequena e, certamente, não resultaria em produtos de metabolismo, em quantidades suficientes para acarretar uma diferença sensorial. Donkor *et al.* (2007) relataram que iogurtes à base de soja fermentados com probióticos (*L.*

acidophilus L10, *L. casei* L26 e *B. animalis* B94) resultaram na produção de uma maior quantidade de ácido láctico, quando comparados ao controle (contendo somente culturas iniciadoras). Consequentemente, os produtos probióticos resultaram, entre outros fatores, em menor aceitação sensorial.

Enfatiza-se que, em alguns casos, mais de uma característica foi informada como preferida ou não. Entretanto, somente a primeira característica descrita foi utilizada para uniformizar as respostas, de modo a atingir a proposta inicial, de se obter somente uma característica positiva e uma negativa. Adicionalmente, aproximadamente 10 % das avaliações sensoriais não reportaram atributo negativo, sendo superior ao número de avaliações sensoriais sem relato de atributo positivo (2 %).

No entanto, deve ser ressaltado o fato das características positivas possuírem menos informações quanto ao seu componente responsável pela tomada de decisão, quando comparadas às negativas, tanto para o sabor quanto para a textura. De modo geral, os provadores sentiram-se mais inclinados a fornecer informações de componentes que não foram de seu agrado.

As características sabor e textura foram as que mais influenciaram as avaliações sensoriais (Figura 3), totalizando aproximadamente 85 % das respostas referentes aos atributos positivos e atributos negativos. A característica sabor foi apontada com maior frequência como atributo positivo e com menor frequência como atributo negativo nas formulações suplementadas com inulina, quando comparado àquelas sem o ingrediente prebiótico. De modo similar, Cardarelli *et al.*, (2008b) reportaram que o sabor foi o atributo mais preferido em queijos tipo *petit-suisse* adicionados ou não de inulina, entre outros fatores. O componente mais referenciado para a característica sabor foi o dulçor. Nas formulações não suplementadas de inulina, a característica positiva dulçor, referida como dulçor ideal, totalizou 7,84 % das avaliações desse grupo, enquanto nas formulações suplementadas com o ingrediente prebiótico esse valor subiu para 13,71 %. De fato, conforme descrito por Franck (2008), a inulina contribui para o aumento do dulçor nos alimentos e possui menor valor energético, entre outros fatores. Dessa forma, pode ser utilizada como substituto parcial de açúcar.

Figura 3. Número de características apontadas como mais apreciadas (acima da abscissa) e menos apreciadas (abaixo da abscissa). ■, formulações não suplementadas com inulina; □, formulações suplementadas com inulina.

Em formulações não adicionadas de inulina (M1 e M2) foram obtidas 32,20 % de referências positivas relativas aos atributos cremosidade e consistência. Já nas formulações suplementadas com inulina, elas subiram para 35,11 % das referências positivas. Kip *et al.* (2006) relataram que o efeito mais importante da adição de inulina a um iogurte de baixa caloria foi o aumento da consistência e ela influenciou positivamente na sensação de cremosidade. De fato, de acordo com Franck (2008), a melhoria sensorial pode ser explicada pela propriedade da inulina de aumentar o volume do alimento, contribuindo para seu corpo e sensação na boca, oferecendo uma estrutura mais cremosa. Entretanto, o maior número de referências relativo à cremosidade no presente trabalho pode ser, também, decorrente do maior teor de sólidos de tais produtos.

Ainda, houve outros dois componentes relativos à textura que devem ser discutidos. Houve provadores que relataram falhas na homogeneização. Caso tais falhas tivessem sido eliminadas, a aceitação do produto, provavelmente, teria sido superior, uma vez que os provadores poderiam focar sua atenção em outras características. Além deste componente, a presença de partículas, referenciadas principalmente como “arenosidade”, compreendeu 21,62 % das características negativas relativas à textura. Na realidade, essas partículas

perceptíveis são pedaços da própria casca do açaí, não sendo elas relativas a ingredientes não solubilizados ou mesmo insolúveis. Dessa forma, sua presença decorre da grande quantidade de açaí, no produto final, na forma de polpa da fruta. Caso houvesse um maior esclarecimento, por parte dos voluntários, com relação ao fator responsável pela arenosidade e seus benefícios à saúde do produto, tal fator poderia não ter sido relevante ou poderia até ter resultado em uma maior aceitação do produto. Segundo Bobbio *et al.* (2000), a casca do açaí pode apresentar quantidade de antocianinas superior a 5 vezes a da polpa. Adicionalmente, uma vez que a avaliação sensorial foi restrita a provadores que gostavam de *mix* de açaí, é provável que eles tenham sido mais críticos, quando comparados a indivíduos que não apresentassem histórico de consumo de açaí. Desta forma, as notas poderiam ter sido superiores.

4.5. Viabilidade dos microrganismos probióticos

A Figura 4 mostra a evolução na viabilidade dos probióticos nos *mixes* de açaí M2 e M4 durante o armazenamento dos produtos a -18 °C, pelo período de 84 dias. Ambos os microrganismos probióticos tiveram populações iniciais acima de $1,3 \times 10^6$ UFC/g (ou 6,11 log UFC/g). No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas entre os fatores formulação, período de armazenamento e a interação formulação x período de armazenamento na população de *L. acidophilus* e *B. animalis* subsp. *lactis* ($p > 0,05$). Desta forma, foi observado que o decréscimo da população de ambos os microrganismos probióticos não foi expressivo durante o período estudado, nem tampouco a adição da fibra influenciou as contagens probióticas.

Os valores são representados em média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). * ($n = 2$)

Figura 4. Viabilidade de *L. acidophilus* (a) e de *B. animalis* subsp. *lactis* (b) adicionados ao *mix* de açai (■) ou à formulação de *mix* de açai suplementada com inulina (□), armazenados a -18 °C. Valores são representados como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$ produções. * $n = 2$ produções). (vide Tabela 1 para a descrição das formulações M1–M4).

Resultados semelhantes foram obtidos em outros estudos com sobremesas geladas. Buriti *et al.* (2008) não observaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) para populações de *L. acidophilus* entre formulações nos mesmos dias de armazenamento de musse de goiaba suplementada com inulina (4 g/100 g), quando comparada às contagens da musse controle (adição de gordura láctea, 4 g/100 g). Ambos os produtos foram adicionados de oligofrutose e armazenados a -18 °C.

A ausência de efeito positivo conferido pela inulina sobre *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 também foi encontrada em um sorvete com teor reduzido de gordura (Akalin; Erişir, 2008). Os autores também atribuíram as baixas populações de *B. animalis* Bb-12 no primeiro e nos dias

posteriores ao elevado *overrun* desses produtos. De acordo com os autores, isto resultaria em um efeito negativo do gás oxigênio sobre essa bactéria anaeróbia estrita. No presente estudo, a incorporação de ar foi minimizada, em virtude da baixa temperatura de congelamento (-15 °C), desejada na produção de produtos congelados a base de frutas.

De acordo com a legislação brasileira vigente (ANVISA, 2008), para o alimento ser considerado probiótico, deve apresentar quantidade superior a 10^8 UFC em sua porção diária. No caso específico de *mix* de açaí, a porção diária é de 60 g do produto. Logo, deve haver população superior a 6,22 log de UFC/g do produto até o final do período do seu armazenamento. No Brasil, poderia ser alegada propriedade funcional para o M2 somente em virtude da viabilidade de *L. acidophilus*, enquanto para o M4, ambos os microrganismos probióticos contribuem para essa propriedade, durante o período de armazenamento estudado.

5. CONCLUSÕES

O *mix* de açaí apresentou-se como boa matriz para veicular os microrganismos probióticos testados, durante o período de armazenamento proposto, com exceção do *B. animalis* subsp. *lactis* no *mix* não suplementado de inulina. Adicionalmente, a adição dos ingredientes funcionais não resultou em alterações importantes de pH e cor às formulações e a inulina contribuiu para uma maior aceitabilidade sensorial do produto.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS¹

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução n.19, de 30 de abril de 1999a**. Aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=110&word=Alimentos%20Funcionais>. Acesso em: 21 jan. 2009.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Instrução Normativa n.12, de 10 de setembro de 1999b**. Aprova os padrões de identidade e qualidade para polpas de frutas, para polpa de maracujá, de acerola, de cacau, de cupuaçu, de graviola, de açaí, de cajú, de manga, de goiaba, de pitanga, de uva, de mamão, de cajá, de melão, de mangaba; padrões de identidade e qualidade para sucos de maracujá, de cajú, de cajú alto teor de polpa, de cajú clarificado, de abacaxi, de uva, de pêra, de maçã, de limão, de laranja e para suco tropical de acerola, de pitanga, de manga, de goiaba, de mangaba, de cajá e de graviola. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=12478&word=>. Acesso em: 29 mai. 2009.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Área de Atuação. Alimentos. Comissões e Grupos de Trabalhos. Comissões Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **IX. Lista das Alegações de Propriedade Funcional Aprovadas**. (atualizada em julho/2008). Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 1 jun. 2009.
- AKALIN, A.S.; ERIŞIR, D. Effects of inulin and oligofructose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic ice cream. **Journal of Food Science**, v.73, n.4, p.M184-M188, 2008.
- ALAMPRESE C.; FOSCHINO R.; ROSSI M.; POMPEI C.; CORTI S. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG addition in ice cream. **International Journal of Dairy Technology**, v.58, n.4, p.200-206, 2005.
- ANTUNES, A.E.C. Bebidas lácteas probióticas: benefícios à saúde. In: SEMINÁRIO DE PRODUTOS LÁCTEOS FUNCIONAIS, Campinas, 2007. Campinas: ITAL, 2007. CD-ROM.
- ARAGON-ALEGRO, L.C.; ALEGRO, J.H.A.; CARDARELLI, H.R.; CHIU, M.C.; SAAD, S.M.I. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT-Food Science and Technology**, v.40, n.4, p.669-675, 2007.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

- ARVANITOYANNIS, I.; HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLU, M. Functional foods: a survey of health claims, pros and cons, and current legislation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, p.385-404, 2005.
- BARROS NETO, B.; SCARMINO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: UNICAMP, 2007. 480p.
- BEARDSWORTH, A.D.; KEIL, E.T. The vegetarian option: varieties, conversions, motives and careers. **Sociological Review**, v.40, n.2, p.253-293, 1992.
- BENKOUIDER, C. The world's emerging markets. **Functional Foods and Nutraceuticals**, 2005. Disponível em: <http://www.functionalingredientsmag.com/article/Trends/the-world-s-emerging-markets.aspx>. Acesso em: 1 de jun. de 2009.
- BERGMARK, S.; LORENZO, A.G.; CULEBRAS, J. M. Use of pro-, pre and synbiotics in the ICU: future options. **Nutrición Hospitalaria**, v.16, n.6, p.239-256, 2001.
- BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their *in vivo* effectiveness. **Food Research International**, v.35, n.2/3, p.125-131, 2002.
- BOBBIO, F.O. DRUZIAN, J.I.; ABRÃO, P.A.; BOBBIO, P.A.; FADELLI, S.I. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaizeiro (*Euterpe oleracea*) Mart. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.3, p.388-390, 2000.
- BROWN, A.C.; SHOVIĆ, A.; IBRAHIM, S.; HOLCK, P.; HUANG, A. A non-dairy probiotic's (poi) influence on changing the gastrointestinal tract's microflora environment. **Alternative Therapies in Health and Medicine**, v.11, n.1, p.58-64, 2005.
- BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.; ASSIS, E.G.; SAAD, S.M.I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **LWT-Food Science and Technology**, v.38, n.2, p.173-180, 2005a.
- BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.; SAAD, S.M.I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, v.15, n.12, p.1279-1288, 2005b.
- BURITI, F.C.A.; CARDARELLI, H.R.; FILISETTI, T.M.C.C.; SAAD, S.M.I. Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. **Food Chemistry**, v.104, p.1605-1610, 2007a.
- BURITI, F.C.A.; CARDARELLI, H.R.; SAAD, S.M.I. Biopreservation by *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus* in potentially probiotic and synbiotic fresh cream-cheeses. **Journal of Food Protection**, v.70, n.1, p.228-235, 2007b.

- BURITI, F.C.A.; KOMATSU, T.R.; SAAD, S.M.I. Activity of passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*) pulps on *Lactobacillus acidophilus* in refrigerated mousses. "Short Communication". **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.2, p.315-317, 2007c.
- BURITI, F.C.A.; OKAZAKI, T.Y.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh cheese in comparison with the traditional products. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.57, n.2, p.179-185, 2007d.
- BURITI, F.C.A. **Sobremesa aerada simbiótica**: desenvolvimento do produto e resistência *in vitro*. São Paulo, 2008. 144p. Tese de Doutorado - Faculdade Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- BURITI, F.C.A.; HARAMI, J.B.; SOUZA, C.H.B.; SAAD, S.M.I. *Lactobacillus acidophilus* survival in synbiotic guava mousses under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. In: INTERNATIONAL PROBIOTIC CONFERENCE, 3, High Tatras, 2008. **Conference Proceedings**. Bratislava: Samed, 2008. p.49S.
- CARABIN, I.G.; FLAMM, W.G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.30, p.268-282, 1999.
- CARDARELLI, H.R.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; ALEGRO, J.H.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Effect of inulin and *Lactobacillus paracasei* on sensory and instrumental texture properties of functional chocolate mousse. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.88, n.8, p.1318-1324, 2008a.
- CARDARELLI, H.R.; BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic *petit-suisse* cheese. **LWT-Food Science and Technology**, v.41, n.6, p.1037-1046, 2008b.
- CHAMPAGNE, C.P.; GARDNER, N.J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, p.61-84, 2005.
- CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **International Journal of Dairy Technology**, v.51, n.4, p.123-136, 1998.
- CORRÊA, S.B.M.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Probiotic potential and sensory properties of coconut flan supplemented with *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*, during shelf life of the product. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, n.9, p.1560-1568, 2008.
- DONKOR, O.N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Rheological properties and sensory characteristics of set-type soy yogurt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.24, p.9868-9876, 2007.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.4, p.343-350, 2003.

UNITED STATES. Department of Health & Human Services. Food and Drug Administration. Food. Guidance, Compliance & Regulatory Information. Food Ingredients and Packaging Guidance: ... More Food Ingredients and Packaging Guidance. **Gras Notices: Frequently Asked Questions About GRAS**. 2004. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodIngredientsandPackaging/ucm061846.htm>. Acesso em: 1 jun. 2009. (alterei a entrada de autor; alterar no texto)

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 bacteria**. 2001. 34p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/y6398e.pdf>. Acesso em: 1 jun. 2009. [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 Bacteria, Córdoba, 2001].

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crônicas**. 2003. 152p. Disponível em: <http://www.fao.org/wairdocs/who/ac911s/ac911s00.htm>. Acesso em: 1 jun. 2009.

FOOKS, L.J.; FULLER, R.; GIBSON, G.R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy Journal**, v.9, p.53-61, 1999.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, p.365-378, 1989.

FRANCK, A. Food applications of prebiotics. In GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B., eds. **Handbook of prebiotics**. Boca Raton: CRC Press, 2008. cap.22, p.437-448.

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

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v.360, p.512-518, 2003.

HEENAN, C.N.; ADAMSA, M.C.; HOSKENA, R.W.; FLEET, G.H. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. **LWT-Food Science and Technology**, v.37, p461-466, 2004.

- HOWLETT, J. Functional Foods - From Science to Health and Claims. 2008. :1-36. (ILSI Europe Concise Monograph Series). Disponível em: <http://europe.ilsa.org/NR/rdonlyres/97C50D2F-8DDB-415F-AC6C-E20ED1B5E7D1/0/FunctionalFoods2008.pdf>. Acesso em: 1 jun. 2009.
- HUNTERLAB; IZASA. **Principios básicos de medida y percepción del color**. 2001. Versão 1.2. Disponível em: <http://www.hunterlab.com/pdf/color-s.pdf>. Acesso em: 30 maio 2009.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para a análise de alimentos**. 4.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005. 1018p.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Fermented and non-fermented milk products: detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus*. Culture media**. Bruxelas: International Dairy Federation, 1995. [Bulletin of the IDF, 306].
- JONES, P.J.; JEW, S. Functional food development: concept to reality. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, n.7, p.387-390, 2007.
- KATAN, M.B.; ROOS, N.M. Promises and problems of functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.44, p.369-377, 2004.
- KAUR, N.; GUPTA, A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **Journal of Biosciences**, v.27, p.703-714, 2002.
- KAUR, I.P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.15, p.1-9, 2002.
- KELLY, D.; CONWAY, S.; AMINOV, R. Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation. **Trends in Immunology**, v.26, n.6, p.326-333, 2005.
- KELLY, G. Inulin-type prebiotics: a review. Part I. **Alternative Medicine Review**, v.13, n.4, p.315-330, 2008.
- KIP, P.; MEYER, D.; JELLEMA, R.H. Inulins improve sensoric and textural properties of low-fat yoghurts. **International Dairy Journal**, v.16, n.9, p.1098-1103, 2006.
- KLAENHAMMER, T.R. Probiotics and prebiotics. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. 2.ed. Washington: ASM, 2001. p.797-811.
- KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.3, p.329-347, 2008. [Revisão].

- LAPIERRE, L.; UNDELAND, P.; COX, L.J. Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.5, p.1192-1196, 1992.
- LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. **Sensory evaluation of foods**: principles and practices. Gaithersburg: Aspen, 1999. 827p.
- LEVRI, K.M.; KETVERTIS, K.; DERAMO, M.; MERESTEIN, J.H.; D'AMICO, F. Do probiotics reduce adult lactose intolerance? a systematic review. **Journal of Family Practice**, v.54, n.7, p.613-620, 2005.
- LUCKOW, T.; DELAHUNTY, C. Which juice is healthier? a consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. **Food Quality and Preference**, v.15, p751-759, 2004a.
- LUCKOW, T.; DELAHUNTY, C. Consumer acceptance of orange juice containing. **Food Research International**, v.37, p.805-814, 2004b.
- MARTIUS, K.F.P. **Historia Naturalis Palmarum**: genera et species. Leipzig: T.O. Weigel, 1824. v.2, p.29-31.
- MARUYAMA, L.Y.; CARDARELLI, H.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Textura instrumental de queijo *petit-suisse* potencialmente probiótico: influência de diferentes combinações de gomas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.386-393, 2006.
- MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v.12, p.173-182, 2002.
- MOJZISOVÁ, G.; KUČHTA, M. Dietary flavonoids and risk of coronary heart disease. **Physiological Research**, v.50, n.6, p529-535, 2001.
- MOLIN, G. Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, suppl.2, p.380S–385S, 2001.
- NOGUEIRA, O.L. **Sistema de produção do açaí**. Embrapa Amazônia Oriental. Sistemas de Produção, v.4, 2006. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed/paginas/intro.htm. Acesso: em 01 jun. 2009.
- PARVEZ, S.; MALIK, K.A.; KANG, S.A.; KIM, H.Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, p.1171-1185, 2006.
- PEREIRA, H.A.; MONTEIRO, P.L.; LEMOS, J.L.S. **Produção de vinho de açaí**. Local: Universidade Estácio de Sá. p.67. 2003. [Monografia de Conclusão de Curso].
- PRADO, F.C.; PARADA, J.L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**, v.41, p.111-123, 2008.

- PROBI. Disponível em: <http://www.probi.com/>. Acesso em: 19 fev. 2009.
- ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v.34, suppl.2, p.S105-S110, 2002.
- ROBERFROID, M.B. Prebiotics: the concept revisited. **Journal of Nutrition**, v.137, p-830S-837S, 2007.
- SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.1, p.1-16, 2006.
- SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, n.84, p.197-215, 2000.
- SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, v.61, n.3, p.91-99, 2003.
- SCHARLAU, D.; BOROWICKI, A.; HABERMANN, N.; HOFMANN, T.; KLENOW, S.; MIENE, C.; MUNJAL, U.; STEIN, K.; GLEI, M. Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. **Mutation Research, Reviews in Mutation Research**, v.682, n.1, p.39-53, 2009.
- SCHAUSS, A.G.; WU, X.; PRIOR, R.L.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D.; KABABICK, J.P. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Açaí). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.8598-8603, 2006.
- SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food: product development, marketing and consumer acceptance; a review. **Appetite**, v.51, n.3, p.456-467, 2008.
- SOUSA, M.A.C.; YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; PANTOJA, L. Suco de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.): avaliação microbiológica, tratamento térmico e vida de prateleira. **Acta Amazônica**, v.36, n.4, p.483-496, 2006.
- SOUZA, C.H.B.; BURITI, F.C.A.; BEHRENS, J.H.; SAAD, S.M.I. Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in co-culture with a thermophilic starter culture. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, p.871-877, 2008.
- SOUZA, C.H.B.; SAAD, S.M.I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-chemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. **LWT-Food Science and Technology**, v.42, n.2, p.633-640, 2009.
- STANTON, C.; GARDINER, G.; LYNCH, P.B.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Probiotic cheese. **International Dairy Journal**, v.8, p.491-496, 1998.

- STRINGHETA, P.C.; OLIVEIRA, T.T.; GOMES, R.C.; AMARAL, M.P.H.; CARVALHO, A.F.; VILELA, M.A.P. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.2, p.181-194, 2007.
- SULLIVAN, Å.; NORD, C.E. Probiotics and gastrointestinal diseases. **Journal of Internal Medicine**, v.257, p.78-92, 2005.
- SUN, DA-WEN, ed. **Handbook of frozen food packaging and processing**. Boca Raton: CRC Press, 2006. 723p.
- SWENNEN, K.; COURTIN, C.M.; DELCOUR, J.A. Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.46, p.459-471, 2006.
- TINOCO, A.C. **Açaí amazônico**: novas perspectivas de negócio. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2005. 1 CD-ROM. [Workshop Regional do Açaizeiro: pesquisa, produção e comercialização, Belém, PA, 2005].
- TUOHY, K.M.; PROBERT, H.M.; SMEJKAL, C.W.; GIBSON, G.R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today**, v.8, n.15, p.692-700, 2003.
- VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. 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, 1999.
- XU, J.; BJURSELL, M.K.; HIMROD, J.; DENG, S.; CARMICHAEL, L.K.; CHIANG, H.C.; HOOPER, L.V.; GORDON, J.I. A genomic view of the human - *Bacterioides thetaiotaomicron* symbiosis. **Science**, v.299, n.5615, p.2074-2076, 2003.

Anexo 1: Figuras da *Euterpe oleracea* Mart. *in situ*; anatomia do seu ramo frutífero, frutos e folhas; e anatomia da sua evolução (Martius, 1824).

EUTERPE oleracea.

EUTERPE oleracea .

EUTERPE oleracea .

A. Folger sc.

Anexo 2: Protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (Ofício CEP número 53 de 2008).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP**

Ofício CEP nº 53 /2008

São Paulo, 01 de julho de 2008.

**Ilmo(a). Sr(a).
Bruno Garcia Vasconcelos
Orientador Prof. Susana Marta Isay Saad
FBT**

Prezado(a) Senhor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 30 de junho de 2008, **APROVOU** o projeto "Desenvolvimento de mix de açaí probiótico, prebiótico e simbiótico" (Protocolo CEP nº 469) apresentado por Vossa Senhoria, devendo apenas no TCLE, a redação do item "benefícios esperados", do grupo "Provadores Treinados", ser idêntica ao Grupo "Provadores Não Treinados".

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP

Anexo 3: Modelo da ficha de avaliação sensorial utilizada nas análises do presente trabalho.

Ficha para teste de aceitação – Açaí na tigela

Nome: _____

Data: ____/____/____

Amostra: _____

Você recebeu uma amostra de açaí na tigela. Por favor, prove a amostra e avalie de maneira geral (aparência, sabor e textura) usando a escala abaixo o seu grau de aceitação relacionado ao produto.

- 1 - Desgostei muitíssimo
- 2 - Desgostei muito
- 3 - Desgostei regularmente
- 4 - Desgostei ligeiramente
- 5 - Não gostei nem desgostei
- 6 - Gostei ligeiramente
- 7 - Gostei regularmente
- 8 - Gostei muito
- 9 - Gostei muitíssimo

Cite a característica que você **mais** gostou na amostra: 😊 _____

Cite a característica que você **menos** gostou na amostra: ☹ _____

Obrigado pela participação!

Anexo 4: Fenólicos e antocianinas totais e atividade antioxidante (média $\pm$ desvio padrão) obtidos para os diferentes mixes de açaí estudados organizados em função da adição ou não de inulina.

	Formulação	
	não adicionadas de inulina	adicionadas de inulina
Fenólicos totais ¹	5724,13 ± 331,35	4621,72 ± 112,45
Antocianinas totais ²	60,20 ± 5,56	51,01 ± 3,28
Atividade antioxidante ³	1275,17 ± 93,58	1115,80 ± 99,28

¹ mg equivalentes de catequinas / 100 g de amostra em base seca (BS), ² mg equivalentes de 3-glicosídeo de cianidina / 100 g de amostra em BS, ³ µmoles equivalentes de Trolox / 100 g de amostra em BS. (vide Tabela 1 para a descrição das formulações M1–M4).