UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Alimentos

Desenvolvimento de sorvete simbiótico de maçã e avaliação do efeito dos ingredientes na sobrevivência dos probióticos no produto e *in vitro*, utilizando técnicas dependentes e independentes de cultivo

Natalia Silva Matias

São Paulo
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Alimentos

Desenvolvimento de sorvete simbiótico de maçã e avaliação do efeito dos ingredientes na sobrevivência dos probióticos no produto e *in vitro*, utilizando técnicas dependentes e independentes de cultivo

Natalia Silva Matias

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Susana Marta Isay Saad

São Pulo
2015

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

Matias, Natalia Silva
M433d Desenvolvimento de sorvete simbiótico de maçã e avaliação do efeito dos ingredientes na sobrevivência dos probióticos no produto e in vitro, utilizando técnicas dependentes e independentes de cultivo / Natalia Silva Matias. -- São Paulo, 2015.
111p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Saad, Susana Marta Isay

1. Alimentos : Processamento : Tecnologia 2. Sorvete 3. Alimentos funcionais I. T. II. Saad, Susana Marta Isay, orientador.

664 CDD

NATALIA SILVA MATIAS

Desenvolvimento de sorvete simbiótico de maçã e avaliação do efeito dos ingredientes na sobrevivência dos probióticos no produto e *in vitro*, utilizando técnicas dependentes e independentes de cultivo

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof.ª Dr.ª Susana Marta Isay Saad
orientador/presidente

_____
1º examinador

_____
2º examinador

_____
3º examinador

_____
4º examinador

São Paulo, _____ de 2015.

À minha família, com amor e gratidão pelo carinho, presença e apoio ao longo da elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelas oportunidades e por sua graça que permitiram que eu pudesse chegar até aqui, suportando todas as adversidades. Nele está a minha força!

Aos meus pais e aos meus irmãos, pelo imenso amor e carinho, pelo incentivo e orações.

Ao Rogério, pelo carinho, dedicação, apoio, compreensão na angústia e suporte em momentos difíceis.

À Prof.ª Dr.ª Susana Marta Isay Saad, por me orientar, auxiliar e ensinar, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

À Raquel Bedani, pela amizade e por todo auxílio durante a realização deste trabalho!

Aos companheiros de laboratório Diogo, Marina Gomes, Fernanda, Marina Padilha, Mayra, Marcela, Douglas, Felipe.

À Prof.ª Dr.ª Inar Alves de Castro pela colaboração na realização das análises estatísticas.

À Yasumi pelo apoio no fornecimento das amostras de suco de maçã da Yakult.

Aos colegas do departamento pela convivência.

Ao Nilton, ao Alexandre e à Ivani pelo auxílio, pela prontidão em ajudar, pelos momentos de descontração, conversas e risadas do dia a dia.

Aos funcionários do departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Mirian, Elza, Juarez, Gledson, Tania e Rose. Aos funcionários da informática, pelo suporte técnico.

À Kátia e D. Lúcia pelo auxílio no Laboratório de Microbiologia de Alimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa (Processos 2011/12981-0 e 2013/50506-8).

À CAPES e CNPq.

ÀYakult que forneceu o suco de maçã concentrado sem aditivos.

Às empresas Duas Rodas, Agropalma, e Danisco pelo fornecimento de parte dos ingredientes utilizados neste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a finalização deste trabalho.

Quanto melhor é adquirir a sabedoria do que o ouro! e quanto mais excelente é escolher o entendimento do que a prata!

Provérbios 16:16

RESUMO

MATIAS, N. S. **Desenvolvimento de sorvete simbiótico de maçã e avaliação do efeito dos ingredientes na sobrevivência dos probióticos no produto e *in vitro*, utilizando técnicas dependentes e independentes de cultivo**. 2015. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da substituição total ou parcial do leite (M-x_1) por extrato de soja (S-x_2) e/ou WPI combinado com inulina (PI-x_3) em formulações de sorvete simbiótico de maçã sobre a viabilidade e sobrevivência de *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis* Bb-12 através de condições gastrointestinais simuladas *in vitro* e monitorar mudanças morfológicas das células durante períodos de estresse gastrointestinal em uma das formulações, bem como investigar características tecnológicas (*overrun*, taxa de derretimento e dureza instrumental) e aceitação sensorial. Para este fim, um desenho experimental para misturas simples (*simplex-centroid*) foi utilizado, incluindo um ponto axial, utilizando diferentes proporções de x_1, x_2, x_3. Foram estudadas oito formulações de sorvete simbiótico de maçã durante o armazenamento congelado por até 84 dias. Os sorvetes mostraram-se satisfatórios como veículos para La-5 e Bb-12 (cerca de 7,5 log ufc/g), mesmo ao final do período de 84 dias de armazenamento a -18 °C. Em todas as formulações, a análise por qPCR combinada com o uso de propidium monoazide (PMA-qPCR) evidenciou que os probióticos resistiram ao ensaio *in vitro*, com níveis significativos de sobrevivência, atingindo taxas de sobrevivência superiores a 50%. Além disso, imagens de microscopia eletrônica de varredura evidenciaram células com diferenças morfológicas, sugerindo alterações fisiológicas em resposta ao estresse induzido durante o ensaio *in vitro*. Um modelo linear e um especial cúbico foram obtidos para os parâmetros de *overrun* e de dureza, respectivamente, mostrando que os fatores leite, extrato de soja e isolado proteico de soro + inulina influenciaram fortemente esses parâmetros tecnológicos. No entanto, a taxa de derretimento foi pouco afetada por tais fatores. O modelo especial cúbico mostrou que a interação binária (S-PI) e ternária (M-S-PI) resultou em maiores valores de dureza. Para este parâmetro específico, a combinação recomendada dos ingredientes é de 3,7% de leite em pó, 1,3% de extrato de soja e 5,0% PI. Os escores médios de aceitabilidade sensorial variaram de 5,6 a 8,0. A aceitabilidade geral do sorvete produzido apenas com o PI foi menor quando comparada a ao sorvete de leite (M), embora uma grande frequência de escores tenha sido observada na área da escala compreendendo as opiniões "gostei ligeiramente" (escore 6) e "gostei extremamente" (escore 9) para todas as formulações de sorvete avaliadas. Apesar de todas as formulações terem conferido resistência às cepas sob estresse, a variação encontrada na sobrevivência de La-5 e Bb-12 sugere que a tolerância é, de fato, afetada pela escolha da matriz alimentar. Os resultados também mostraram que, além de ser um alimento nutritivo, as formulações de sorvete que tiveram a substituição parcial do leite em pó poderiam assegurar aos consumidores um produto funcional com baixo teor de lactose, enquanto sorvetes sem leite em pó oferecem um alimento funcional sem lactose.

Palavras-chave: alimentos funcionais, probiótico, quantificação independente de cultivo, MEV, avaliação sensorial, textura instrumental.

ABSTRACT

MATIAS, N. S. **Development of synbiotic apple ice-cream and effect of ingredients on probiotics survival in the product and *in vitro*, using culture-dependent and culture-independent techniques**.2015. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The aim of this study was to assess the effect of the total or partial replacement of milk (M-x_1) by soy extract (S-x_2), and/or WPI combined with inulin (PI-x_3) in synbiotic apple ice cream formulations on the viability and survival of *L. acidophilus* La-5 and *B. animalis* Bb-12 through *in vitro* simulated gastrointestinal (GI) conditions and to monitor cells morphological changes during gastrointestinal stress in one of the formulations, as well as investigating technological features (overrun, meltdown rate, instrumental hardness) and sensory acceptability. For this purpose, an experimental design for simple mixtures (*simplex-centroid*) was used including an axial point, using different proportions of x_1, x_2, x_3. Eight formulations of synbiotic apple ice cream were studied during frozen storage for up to 84 days. The ice creams showed to be satisfactory vehicles for La-5 and Bb-12 (populations around 7.5 log cfu/g), even after the whole storage period (84 days/-18°C). In all formulations, the propidium monoazide qPCR (PMA-qPCR) analysis evidenced that probiotics could resist to the *in vitro* GI assay, with significant survival levels, achieving survival rates exceeding 50%. Additionally, scanning electron microscopy images evidenced cells with morphological differences, suggesting physiological changes in response to the induced stress during the *in vitro* assay. A linear and a special cubic models were obtained for the overrun and hardness parameters showing that factors milk, soy extract, and whey protein isolate + inulin strongly influenced these technological parameters. However meltdown rate was slightly affected by the factors studied. The special cubic model showed that the binary (S-PI) and tertiary (M-S-PI) interactions resulted in higher hardness values. For this specific parameter, combination of the factors is recommended to be 3.7% milk, 1.3% soy extract, and 5.0% PI. The sensory acceptability mean scores ranged from 5.6 to 8.0. The overall acceptability of the ice cream produced only with PIn was lower when compared to milk based ice cream (M), even though a high frequency of scores was observed in the scale area comprising the opinions "liked slightly" (score 6) and "liked extremely" (score 9) for all ice cream formulations evaluated. Although all formulations provided resistance to the probiotic strains under GI stress, the variation found in La-5 and Bb-12 survival suggests that GI tolerance is indeed affected by the choice of the food matrix. The results also showed that, besides being a nutritious food, the ice cream formulations that had the partial replacement of milk powder could assure consumers a functional product with low content of lactose, whereas ice creams with no milk powder offer a lactose-free functional food.

Keywords: functional food, probiotic, culture independent quantification, SEM, sensory evaluation, instrumental texture.

INTRODUÇÃO

A demanda por alimentos que forneçam benefícios à saúde de forma a reduzir o risco do aparecimento de doenças e que supram as necessidades nutricionais do organismo é cada vez mais evidente. A incorporação de micro-organismos probióticos e ingredientes prebióticos aos alimentos pode agregar valor aos produtos e oferecer os benefícios dos alimentos funcionais se incluídos diariamente na dieta. O sorvete é uma excelente fonte de energia e, apesar de conter açúcares e gorduras, é geralmente considerado um alimento nutritivo, uma vez que contém leite e frutas em sua formulação (GOFF; HARTEL, 2013).

Os ingredientes da matriz alimentícia podem influenciar a viabilidade dos probióticos no produto e durante a digestão. Ensaios de simulação gastrintestinal *in vitro* têm sido desenvolvidos e aplicados para avaliar a resistência e o desempenho de cepas probióticas como cultura pura, em diferentes matrizes alimentares ou na forma encapsulada (BEDANI et al., 2014; CHAMPAGNE et al, 2015).

A quantificação dos micro-organismos presentes no alimento ou nas amostras submetidas à simulação gastrintestinal *in vitro* pode ser feita por métodos dependentes (cultura em placa) ou independentes de cultivo (utilizando técnicas de biologia molecular). A Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) ou PCR em tempo real permite a detecção rápida e específica do DNA total em uma amostra, incluindo as células não viáveis, e portanto não se distingue células mortas e vivas. O tratamento com reagentes intercalantes de DNA, como o PMA (propidium monoazide), facilita a exclusão de resultados de falsos positivos resultantes da amplificação do DNA de células mortas. O mecanismo de ação do PMA consiste na sua ligação ao DNA de células cujas membranas foram danificadas e, consequentemente, a amplificação do DNA dessas células não ocorre, sendo quantificado apenas o DNA de células viáveis, mesmo que estas estejam em um estado não cultivável (GENSBERGER et al., 2014; NOCKER et al., 2009). O uso dessa técnica é importante para a quantificação de probióticos submetidos a estresse. É o que ocorre no caso dos ensaios de simulação gastrintestinal *in vitro*, pois permite uma quantificação mais sensível e confiável, uma vez que o cultivo em placa pode subestimar a população de bactérias e o PCR tradicional pode superestimar tal população.

A incorporação de leite, extrato de soja ou proteína isolada do soro de leite combinada com inulina, além de suco de fruta, probióticos e FOS a sorvetes é promissora, com o objetivo de atender as expectativas dos consumidores, tanto nutricional quanto sensorialmente. Diferentes combinações desses ingredientes podem resultar em modificações sensoriais e

nutricionais e, principalmente, nas características físico-químicas dos sorvetes, tais como incorporação de ar, taxa de derretimento e textura e, ainda, na viabilidade e resistência dos probióticos no produto e sob condições de digestão simulada *in vitro.*

Esta Tese divide-se em três capítulos:

Capítulo 1: "Revisão de Literatura". Visa abordar os principais temas envolvidos no trabalho, apresentando o embasamento bibliográfico.

Capítulo 2: "Survival of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis Bb*-12 in synbiotic apple (*Malus domestica* Borkhausen) ice creams under *in vitro* gastrointestinal conditions assessed by propidium monoazide qPCR". Esse capítulo foi elaborado na forma de artigo científico. Os principais objetivos desse capítulo foram avaliar a viabilidade dos micro-organismos probióticos nas formulações de sorvete (empregando-se técnicas dependentes de cultivo) e a sobrevivência destes micro-organismos no produto submetido ao estresse gastrintestinal *in vitro* (empregando-se técnicas independentes de cultivo), além de monitorar alterações morfológicas nas células durante as etapas de digestão simulada, com a aplicação de técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Capítulo 3: "Technological features and sensory acceptance of synbiotic apple ice creams developed with replacement of milk by soymilk and whey protein isolate combined with inulin". Esse capítulo foi elaborado na forma de artigo para ser submetido ao periódico Food Chemistry e teve como objetivo avaliar os efeitos dos ingredientes sobre as características tecnológicas (*overrun*, taxa de derretimento e dureza instrumental) e aceitabilidade geral dos sorvetes simbióticos de maçã.

Capítulo 1

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Alimentos funcionais

A crescente preocupação com a saúde e o interesse no bem estar físico são as principais razões para o aumento do consumo de alimentos que garantem benefícios à saúde. Nos últimos anos, o alimento não é visto apenas como um veículo de nutrientes essenciais para assegurar o crescimento e o bom desenvolvimento do organismo, mas como uma via para melhorar o bem estar e a saúde (HASLER; BROWN, 2009).

O consumidor entende que alimentação saudável envolve a escolha de alimentos que, ao mesmo tempo, são capazes de fornecer os nutrientes necessários ao organismo e minimizar o risco de doenças como hipertensão, diabetes, osteoporose, doenças cardiovasculares, entre outras. Durante os últimos 60 anos, alimentos com atributos de saúde tornaram-se cada vez mais importantes e os estudos indicam que os consumidores dão igual peso para atributos de saúde e sensoriais no momento da escolha dos produtos alimentícios (CODRON et al., 2005).

Os produtos lácteos fermentados por bactérias láticas, tais como cepas do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, enriquecidos com FOS (fruto-oligossacarídeos) ou inulina, surgiram no mercado de alimentos há mais de 10 anos (SAAD et al., 2013). Estima-se que em 2013 o mercado global de probióticos movimentou US $ 62,7 bi e deve chegar a US $ 96 bi em 2020, a uma taxa de aumento de 7,4% ao ano (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2015). Como consequência de seus benefícios à saúde, bactérias probióticas são um componente importante da indústria de alimentos lácteos e funcionais, contribuindo para um mercado de bilhões de dólares (O'FLAHERTY; KLAENHAMMER, 2010). Assim, o número de produtos alimentícios contendo esses micro-organismos "promotores de saúde" encontra-se em expansão.

1.2 A microbiota gastrintestinal

A microbiota humana é um ecossistema complexo e usualmente estável, muito importante para o hospedeiro, no sentido de possibilitar a ocorrência de várias funções metabólicas e resistência a infecções bacterianas. A composição desse ecossistema bacteriano é dinâmica e passível às mudanças impulsionadas por fatores dietéticos e por diversas condições de doenças. Portanto, componentes da microbiota intestinal ou micro-organismos estabelecidos no intestino podem ter tanto efeitos nocivos como benéficos à saúde humana (CANI; DELZENNE, 2011; SALMINEN; ISOLAURI, 2006; LAPARRA; SANZ, 2010).

Inicialmente, o trato gastrintestinal do recém-nascido é estéril, mas torna-se imediatamente colonizado após o nascimento: os recém-nascidos de parto normal são colonizados por micro-organismos, principalmente da microbiota vaginal (constituída por uma população de espécies de *Lactobacillus* maior que 50%, dentre todas as bactérias) e intestinal da mãe, enquanto os que nascem de parto cesariano são colonizados principalmente com a microbiota ambiental (BIASUCCI et al., 2010; DI MAURO et al., 2013; DOMINGUEZ-BELLO et al., 2011).

Nos recém-nascidos, a microbiota é composta relativamente por poucas espécies e linhagens, mas a diversidade aumenta rapidamente (embora com um considerável grau de instabilidade), evoluindo para uma microbiota semelhante à do indivíduo adulto durante os primeiros 24 meses de vida (DOMINGUEZ-BELLO et al., 2011; LAPARRA; SANZ, 2010). No indivíduo adulto, embora o intestino abrigue uma combinação de espécies predominantes, a composição da microbiota intestinal pode se alterar com o estilo de vida, com a dieta e idade (O'HARA; SHANAHAN, 2007). Por isso, torna-se interessante o consumo de alimentos que contenham culturas de bactérias probióticas ou ingredientes que estimulem a multiplicação desses micro-organismos, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002), uma vez que vários estudos têm indicado um efeito protetor dos lactobacilos contra patógenos potenciais no trato gastrintestinal (HÄNNINEN; SEN, 2008). Adicionalmente, algumas evidências sugerem que modificações na composição da microbiota podem gerar efeitos benéficos na prevenção de algumas doenças (REID, 2008; SOETERS, 2008) ou impedir que micro-organismos potencialmente patogênicos nela presentes exerçam os seus efeitos (SAAD, 2006).

1.3 Probióticos, prebióticos e simbióticos

Probióticos são definidos atualmente como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro (HILL et al., 2014). Os principais probióticos estudados e utilizados são as bactérias que pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (O'FLAHERTY; KLAENHAMMER, 2010; ROSS et al., 2010; RAMASAMY et al., 2012; SHARMA; DEVI, 2014).

Os lactobacilos são tradicionalmente utilizados na produção de alimentos lácteos fermentados, porém a adição de bifidobactérias aos alimentos é uma prática mais recente. Esses micro-organismos são geralmente resistentes à bile e aos ácidos, sendo encontrados

naturalmente no trato gastrintestinal, constituindo parte da microbiota normal (O'FLAHERTY; KLAENHAMMER, 2010; STOLAKI et al., 2012).

Para que os efeitos benéficos sejam verificados, uma população suficiente de micro-organismos viáveis deve estar presente durante toda a vida de prateleira do produto. Além disso, candidatos a cepas probióticas devem possuir traços positivos bem caracterizados, tais como a resistência à acidez gástrica e à toxicidade da bile, a capacidade de colonizar transitoriamente o trato gastrintestinal, a capacidade de inibir patógenos intestinais ou a capacidade de modular o sistema imunológico (SÁNCHEZ et al., 2009).

Os prebióticos, por sua vez, são definidos como "ingredientes seletivamente fermentáveis que permitem modificações específicas na composição e/ou na atividade da microbiota gastrintestinal que resultam em benefícios ao bem estar e à saúde do hospedeiro" (GIBSON et al., 2004; RASTALL; GIBSON, 2015; ROBERFROID, 2007; WELLS, SAULNIER; GIBSON, 2008). Tais ingredientes podem ser adicionados a alimentos industrializados e serem combinados com probióticos para a produção de um alimento simbiótico (HAMILTON-MILLER, 2004). A definição para *simbiótico*, por sua vez, inclui duas abordagens: complementaridade e sinergia. Nos produtos simbióticos complementares, o probiótico é escolhido com base nos efeitos benéficos sobre o hospedeiro, independentemente do prebiótico escolhido, para aumentar seletivamente a concentração de micro-organismos benéficos já presentes no trato gastrintestinal. Já nos sinérgicos, o prebiótico é escolhido especificamente para estimular a multiplicação e a atividade do probiótico selecionado para a adição no produto, contribuindo, assim, para a sua sobrevivência no trato gastrintestinal (SU; HENRIKSSON; MITCHELL, 2007; KOLIDA; GIBSON, 2011).

O desenvolvimento de alimentos com doses adequadas de probióticos no momento do consumo é um desafio, pois vários fatores durante o processamento e armazenamento afetam a viabilidade dos micro-organismos (TRIPATHI; GIRI, 2014). Alterações favoráveis na composição da microbiota intestinal foram observadas com doses de 100 g de produto alimentício contendo 10^9 unidades formadoras de colônias (ufc) de micro-organismos probióticos (10^7 ufc g^{-1} de produto). Sendo assim, recomenda-se que a porção diária de produto alimentar contenha de 10^8 a 10^9 ufc para que exerça seus efeitos terapêuticos. Porém, valores menores que esses podem ser administrados, desde que o fabricante comprove a eficácia do produto e de seus efeitos terapêuticos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008). Além disso, é de fundamental importância considerar a somatória dos micro-organismos viáveis ingeridos nos diversos produtos probióticos consumidos ao longo do dia (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008). No entanto, de acordo com Martinez, Bedani e Saad

(2015), não é fácil determinar a quantidade ideal de micro-organismos probióticos a ser administrada, uma vez que esta pode variar em função da cepa utilizada e do efeito desejado sobre a saúde do hospedeiro.

Os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas que mais se destacam são: modulação da microbiota intestinal, estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos, promoção da resistência gastrintestinal à colonização por patógenos, diminuição da população de patógenos por meio da produção de ácidos acético e lático e de outros compostos antimicrobianos, promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose devido à produção de β-galactosidase, estimulação do sistema imune, alívio da constipação, prevenção de diarréia, aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas. Outros possíveis efeitos incluem a redução do colesterol, a modulação de reações alérgicas, a melhoria da saúde urogenital feminina e a prevenção do câncer de cólon (FOOKS; FULLER; GIBSON, 1999; HEKMAT; SOLTANI; REID, 2009; KWAN et al., 2012; LYRA; LAHTINEN; OUWEHAND, 2012; NEISH, 2009; ROBERFROID, 2000; SAAD, 2006; SAAD; BEDANI; MAMIZUKA, 2011; SANDERS; DOUGLAS, 2008). É importante ressaltar que os efeito benéficos dos probióticos são amplamente dependentes da sua capacidade de atingir o seu local de ação apropriado, geralmente o intestino distal, em estado viável e em populações suficientes (KENT; DOHERTY, 2014).

As pesquisas envolvendo prebióticos estão sendo direcionadas no sentido de identificar aspectos de saúde associados à sua utilização, o que inclui a redução da diarreia, a modulação da resposta imune e o incremento na biodisponibilidade mineral (RASTALL; GIBSON, 2015).

1.4 Os ingredientes prebióticos inulina e fruto-oligossacarídeos

Os principais prebióticos conhecidos atualmente são os carboidratos não digeríveis fruto-oligossacarídeos (FOS), inulina, galacto-oligossacarídeos (GOS), trans-galacto-oligossacarídeos (TOS) e lactulose. No entanto, a maioria dos dados disponíveis na literatura científica sobre efeitos prebióticos é relacionada à inulina e FOS (MARTINEZ; BEDANI; SAAD, 2015). Embora o critério de não-digestibilidade tenha sido excluído das mais recentes definições de prebióticos, estas fibras não devem ser digeríveis por enzimas humanas ou devem ser apenas parcialmente digeríveis, a fim de atingirem, em quantidades adequadas, segmentos mais distantes do trato gastrintestinal (KOLIDA; GIBSON, 2011).

A quantidade mínima diária recomendada de inulina ou oligofrutose na porção do produto alimentar para a alegação de efeito prebiótico é de 3 g se o alimento for sólido ou 1,5 g se o

alimento for líquido (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008). Com o intuito de assegurar um efeito contínuo, os prebióticos devem ser consumidos diariamente, tal como no caso dos probióticos.

A inulina é composta por cadeias de frutose cujas ligações frutosil-frutose β (2-1) não podem ser metabolizadas pelos seres humanos (MEYER et al., 2011). O comprimento da cadeia varia de 2 a 60 monômeros, mas a inulina contendo até 10 unidades de frutose é, também, referida como oligofrutose. A inulina é amplamente utilizada na indústria de alimentos para modificar textura, substituir a gordura ou como adoçante de baixa caloria, além de ter inúmeras aplicações na área farmacêutica, uma vez que seu maior comprimento de cadeia a torna farmaceuticamente mais útil do que a oligofrutose (MENSINK et al., 2015).

Os mecanismos pelos quais os prebióticos promovem crescimento específico de bifidobactérias no intestino ainda não estão claros. No entanto, algumas hipóteses podem ser citadas: bifidobactérias podem usar uma variedade de oligossacarídeos e carboidratos complexos como fontes de carbono e energia; bifidobactérias tem taxas de crescimento mais elevadas na presença de vários oligossacarídeos não digeríveis, quando comparadas às bactérias putrefativas ou potencialmente patogênicas no ambiente do intestino; bifidobactérias parecem metabolizar fontes de prebióticos de uma forma mais eficiente do que outros gêneros de bactérias, tais como *Lactobacillus, Bacteroides e Eubacteria* (MARTINEZ; BEDANI; SAAD, 2015).

A inulina e a oligofrutose estão presentes em quantidades significativas em muitas frutas e vegetais comestíveis, incluindo trigo, cebola, chicória, alho, alho-poró, alcachofra e banana. A maioria das evidências sobre os potenciais benefícios à saúde fornecidos pelos prebióticos é derivada de estudos experimentais em animais e testes em humanos em um número reduzido de indivíduos (QUIGLEY, 2010). Resultados indicam que esses frutanos foram bem tolerados com o consumo de até 20 g por dia (CARABIN; FLAMM, 1999). Por outro lado, dosagens de 20 a 40g por dia de inulina administrada para idosos com constipação levaram a um efeito laxativo (VAN DOKKUM et al., 1999). Adicionalmente, os resultados obtidos por Costabileet al. (2010) demonstraram que a ingestão de 10 g/dia de inulina de cadeia longa foi capaz de aumentar significativamente a população de bifidobactérias e lactobacilos recuperados nas fezes de indivíduos saudáveis.

A inulina é predominantemente isolada da raiz de chicória. O processo de isolamento consiste basicamente de três passos: extração de componentes solúveis em água a partir de raiz de chicória, purificação para remover impurezas (ou, opcionalmente, separar inulinas com baixo grau de polimerização) e secagem por pulverização (*spray dryer*). A purificação é feita

principalmente por meio da utilização da diferença de solubilidade das frações presentes nos extratos (MENSINK et al., 2015).

1.5 *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* Bb-12

Diversas linhagens de lactobacilos e bifidobactérias têm sido comercialmente utilizadas como probióticos. No entanto, é importante que as cepas probióticas sejam bem caracterizadas nos alimentos antes de sua comercialização ou utilização (SANDERS; KLAENHAMMER, 2001).

Lactobacillus acidophilus La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 são cepas probióticas de propriedade da Christian Hansen (Dinamarca) que possuem efeitos benéficos à saúde e, por este motivo, são amplamente comercializadas e empregadas em alimentos probióticos (JUNGERSEN et al., 2014).

Evidências sugerem que a associação entre La- 5 e Bb-12 pode reduzir a duração da indisposição gástrica (DE VRESE et al., 2011) ou favorecer a recolonizarão da microbiota intestinal (NORD et al., 1997). Adicionalmente, em estudo realizado por Wang et al. (2004), a ingestão regular de iogurte contendo La- 5 e Bb-12 suprimiu efetivamente a infecção por *Helicobacter pylori* em humanos.

Em geral, La-5 e Bb-12 apresentam viabilidade satisfatória e não resultam em aspectos sensoriais ou mesmo nutricionais indesejáveis (MEIRA et al., 2015).

1.6 Proteínas de soro de leite

O leite e seus derivados têm sido testados como alimentos funcionais e tem despertado grande interesse por parte da indústria de laticínios, com destaque para o soro obtido como um subproduto da produção de queijo, que vem sendo apontado como alimento funcional com vários benefícios à saúde (TAVARES; MALCATA, 2016).

Na indústria de laticínios, o soro, que é gerado após o processo de coagulação da caseína, é um subproduto descartado na maioria das vezes. Para reduzir os danos ambientais causados pelo descarte deste material, muitas indústrias têm desenvolvido produtos baseados na utilização do soro de leite (BALDISSERA et al., 2011). Entre as suas vantagens, há o valor nutricional, devido ao elevado teor de aminoácidos essenciais, além de ser uma importante fonte de proteínas e de vitamina B e imunoglobulinas, em adição às suas propriedades antioxidantes, imunomodulatórias, anti-inflamatórias, anti-hipertensivas, antitumorais, antivirais, conferindo, ainda, aumento da força muscular e da composição corporal (GEISER, 2003; KRISSANSEN, 2007; TAVARES; MALCATA, 2016). Portanto, os concentrados

proteicos obtidos de frações do soro do leite, em conjunto com seus peptídeos biologicamente ativos, podem ser utilizados como suplementos alimentares, bem como em preparações farmacêuticas ou como ingredientes funcionais, e têm sido empregados com sucesso em estudos clínicos contra doenças infecciosas, câncer, HIV, hepatite, doenças cardiovasculares e osteoporose, além de conferirem benefícios nutricionais e no desempenho do exercício físico.

O concentrado proteico de soro do leite (*whey protein concentrate* - WPC) resulta da remoção das frações não proteicas do leite. Os concentrados proteicos comumente disponíveis são WPC34, WPC50, WPC60, WPC75 e WPC80, onde os valores numéricos definem o percentual de proteínas no produto; WPC34, por exemplo, não deve conter menos do que 34% de proteínas. Da mesma forma, o isolado proteico de soro (*whey protein isolate* – WPI) é obtido através da remoção da fração não-proteica para alcançar concentrações de proteína superior a 90% no produto final (USDEC, 2006). Enquanto os WPC possuem níveis de lactose que variam entre 10% e 55%, o WPI contém menos de 0,5% de lactose e, por esta razão, pode ser consumido com segurança por indivíduos intolerantes à lactose, tornando-se uma excelente alternativa proteica para tais consumidores (GEISER, 2003).

Estudos indicam que concentrados e isolados proteicos exercem influência benéfica na viabilidade de probióticos e de bactérias láticas. Em um estudo recente com culturas puras de *Streptococcus thermophilus* ST-M5 e *Lactobacillus bulgaricus* LB-12, a adição de WPI resultou no aumento significativo da tolerância à acidez gástrica e a sais biliares (VARGAS; OLSON; ARYANA, 2015).

1.7 A soja e sua aplicação em alimentos probióticos

Nos últimos anos o Brasil aparece como o segundo maior produtor mundial de soja. A produtividade média da soja brasileira na safra de 2014/2015 foi de 3.033 kg/ha, com uma produção de 95,8 milhões de toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2015). Em média, a composição da soja é de 40% de proteína, 20% de lipídios, 30% de carboidratos, 5% de fibras e 5% de cinzas (ROSSI et al., 2011). Tal composição é influenciada pelas condições de cultivo e por interações com o genótipo (KUMAR et al., 2006). A soja também é importante fonte de outros compostos, tais como fibras, oligossacarídeos (rafinose e estaquiose), vitaminas e minerais, como o cálcio (AHMAD et al., 2008; FUCHS et al., 2005; TSENG; XIONG, 2009; ZULKURNAIN et al., 2008).

As concentrações relativamente elevadas de compostos bioativos existentes na soja, tais como as isoflavonas e saponinas, contribuem para a alegação de que a soja é um alimento saudável (BEHRENS; SILVA, 2004; TSENG; XIONG, 2009). O consumo desses compostos colabora na prevenção de doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose e sintomas da menopausa (SETCHELL; CASSIDY, 1999). O consumo diário de, no mínimo, 25 g de proteína de soja, associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis, pode ajudar a reduzir o colesterol (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008).

Alimentos probióticos não-lácteos estão se tornando populares, uma vez que não causam problemas de intolerância à lactose, enquanto oferecem uma alternativa como substitutos dos produtos lácteos (ANEKELLA; ORSAT, 2013). Em virtude do desejo por alternativas vegetarianas e da intolerância a produtos lácteos, a demanda mundial por produtos não derivados do leite está crescendo (FARNWORTH et al., 2007; PRADO et al., 2008; RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010). Nesse contexto, a soja aparece como um substituto ideal para o consumo, com características nutricionais intrínsecas favoráveis à saúde do consumidor.

Entretanto, para que um produto alimentício exerça um papel sobre a saúde, não basta que ele possua características nutricionais vantajosas. É preciso que ele chegue até o consumidor com propriedades atrativas (BEHRENS; ROIG; SILVA, 2004; HEENAN et al., 2004). Adicionalmente, quando as proteínas da soja são metabolizadas por micro-organismos probióticos, esses produzem peptídeos bioativos conhecidos por conferir benefícios à saúde (LIONG et al., 2009).

Diversos trabalhos demonstram que o extrato hidrossolúvel de soja é apropriado para a multiplicação de bactérias láticas e de bifidobactérias (AHMAD et al., 2008; KAMALY, 1998; PRADO et al., 2008; WEI; CHEN; CHEN, 2007). Lactobacilos e bifidobactérias foram utilizados com sucesso em diversos trabalhos para o desenvolvimento de extrato hidrossolúvel de soja fermentado (WEI; CHEN; CHEN, 2007), “iogurte” de soja (FARNWORTH et al., 2007; KAUR; MISHRA; KUMAR, 2009), “iogurte” de soja com farinha de okara (BEDANI; ROSSI; SAAD, 2013; BEDANI et al., 2014), sobremesa vegetariana congelada (HEENAN et al., 2004) e “queijo” de soja tipo *cream cheese* e tipo *petit-suisse* (LIU et al., 2006; MATIAS et al., 2014).

1.8 Os sorvetes e as perspectivas quanto à incorporação de prebióticos e probióticos

De acordo com a legislação brasileira, o sorvete é um produto que se encontra na categoria de “alimentos gelados comestíveis”, que são alimentos congelados obtidos a partir

de uma emulsão de gorduras e proteínas ou de uma mistura de água e açúcar(es) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2005). Embora muitas formulações de sorvetes apresentem quantidades consideráveis de açúcares e gorduras, o sorvete costuma ser considerado um alimento nutritivo, por apresentar em sua formulação leite e, algumas vezes, frutas, representando fonte de proteínas, vitaminas e minerais. A adição de culturas probióticas em sorvetes, além de agregar valor ao produto, poderia proporcionar um produto com apelo funcional (CRUZ et al., 2009; CRUZ et al., 2011).

Diversos estudos mostram que culturas probióticas são capazes de manter a viabilidade em produtos alimentícios congelados, com perda mínima de viabilidade (ABGHARI; SHEIKH-ZEINODDIN; SOLEIMANIAN-ZAD, 2011; ALAMPRESE et al., 2002; ALAMPRESE et al., 2005; HARAMI, 2008; NOUSIA; ANDROULAKIS; FLETOURIS, 2011). Adicionalmente, estudos relataram que o emprego combinado de ingredientes prebióticos com os micro-organismos probióticos em sorvetes auxilia a sobrevivência destes. Assim, os prebióticos apresentam-se como uma opção atrativa para a adição em sorvetes, atuando também como substitutos de gordura (CRUZ et al., 2011)

1.9 Emprego de técnicas independentes de cultivo para a quantificação de micro-organismos

A quantidade, diversidade e interação (competição e sinergismo) são os principais critérios avaliados no estudo de micro-organismos presentes em alimentos e no trato gastrintestinal humano, sendo que o estudo da interação também inclui os micro-organismos já presentes no hospedeiro (ZOETENDAL et al., 2004).

A identificação de bactérias com base em características fenotípicas não é tão precisa quanto a identificação por características genotípicas. Com o intuito de aprimorar as técnicas e metodologias de análise da diversidade microbiana na natureza, os métodos independentes de cultivo são os mais apropriados, uma vez que excluem as limitações das técnicas convencionais, aumentando a sensibilidade na caracterização e especificação dos micro-organismos (ZOETENDAL et al., 2006). Como exemplo, nos produtos lácteos, a aplicação de métodos biomoleculares tem sido um melhor indicador de cepas e espécies microbianas. Além disso, técnicas independentes de cultivo resultam em maior resolução sobre a diversidade desses micro-organismos e uma melhor compreensão sobre sua dinâmica nesses produtos (COPPOLA et al.,2008).

Dentre os métodos biomoleculares, destaca-se a Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo (qPCR) ou PCR em tempo real, aplicada para estudos de classificação de

espécies de micro-organismos em uma determinada amostra de alimento, além de possibilitar sua quantificação independente da quantidade presente, sendo aplicada para estudos com bactérias e fungos em alimentos fermentados, como leite fermentado e vinhos (GIRAFFA; CARMINATI, 2008).

É importante ter em mente que o método qPCR, quando usado isoladamente, não é capaz de distinguir as células vivas de mortas. Portanto, pode levar a uma superestimação do número de células metabolicamente ativas intactas. Por conseguinte, os resultados de viabilidade dos probióticos obtidos por esse método devem ser interpretados com cautela. Com o intuito de detectar e quantificar somente as células viáveis através do método de qPCR, são utilizados agentes intercalantes ao DNA, impermeáveis à membrana celular. O PMA (Propidium Monoazide) e o EMA (Ethidium Monoazide) são agentes intercalantes ao DNA capazes de se ligarem ao DNA dos micro-organismos cuja membrana celular esteja rompida ou danificada (células mortas), omitindo a sua detecção pelo qPCR (NOCKER; CHEUNG; CAMPER, 2006; GARCÍA-CAYUELA et al., 2009; DAVIS, 2014).

O desempenho de PMA-qPCR pode ser influenciado por fatores tais como a concentração de PMA e tempo de foto ativação, como anteriormente descrito (NOCKER; CHEUNG; CAMPER, 2006). Em seu trabalho, os autores observaram que o método subestimou a detecção de células viáveis de *Escherichia coli*, mas não a de *Streptococcus sobrinus*, usando PMA a 240 uM durante 15 min de foto ativação. Além disso, de acordo com Wu, Liang e Kan (2015), vários estudos têm relatado diferenças espécie-específicas em PMA-qPCR. Outros estudos têm mostrado que os componentes celulares de bactérias probióticas, como o seu DNA genômico, ou as suas células inativadas ou mortas, promovem efeitos benéficos ao hospedeiro (GHADIMI et al, 2008; TAVERNITI; GUGLIELMETTI, 2011). No entanto, o consenso atual é que os probióticos devem estar vivos para exercer os seus efeitos benéficos (HILL et al., 2014).

As técnicas de PCR se baseiam na amplificação do DNA dos micro-organismos presentes na amostra, por meio do uso de sondas (*primers*) específicas para cada espécie probiótica a ser avaliada. Assim, com o intuito de atender as necessidades de aprimoramento de métodos mais sensíveis para a quantificação de micro-organismos, foi proposto neste trabalho a aplicação do qPCR como abordagem principal de quantificação, objetivando maior sensibilidade e restringindo as falhas presentes em métodos convencionais.

1.10 Metodologia de superfície de resposta e delineamento experimental do tipo *centroid simplex*

A metodologia de superfície de resposta (ou RSM, de *Response Surface Methodology*) é um conjunto de técnicas aplicadas, com grande sucesso, para a modelagem de processos industriais, com base no uso do planejamento fatorial. Para a construção de modelos empíricos simples (em geral lineares ou quadráticos) que descrevem o comportamento do sistema em estudo é utilizado o "método dos mínimos quadrados", ajustado com base nas respostas obtidas a partir de planejamentos fatoriais (BARROS NETO; SCARAMINIO; BRUNS, 2007). Ensaios envolvendo misturas, tais como os empregados neste trabalho de pesquisa são um exemplo de derivação da RSM. A RSM vem sendo utilizada por diversos pesquisadores na área de alimentos (BAHRAM-PARVAR et al., 2015; CASTRO et al., 2003; JUNQUEIRA et al., 2007; CARDARELLI et al., 2008; BURITI; CASTRO; SAAD, 2010 a, b). Em misturas, as propriedades são determinadas pelas proporções de seus ingredientes, que são considerados variáveis dependentes. Assim, as respostas para as misturas são determinadas pelas proporções mantidas entre variáveis e não pela quantidade total de cada uma.

O sistema de coordenadas usado para os valores de Xi (i= 1, 2, 3..., q) é chamado de sistema de coordenadas *simplex* e a descrição geométrica da representação espacial irá depender do número q de componentes, assumindo a forma de um triângulo equilátero para q=3. Para determinar os valores dos coeficientes do modelo cúbico especial, o delineamento experimental geralmente empregado é conhecido como *centroid simplex*, que acrescenta um ponto central, representando a mistura ternária em partes iguais.

Misturas ternárias são formadas por três componentes, ou seja, três fatores independentes. Os fatores são representados por X_1, X_2 e X_3, os quais devem somar 1 (ou 100%), correspondendo geometricamente a um triângulo equilátero. As diferentes composições possíveis são representadas pelos pontos pertencentes ao triângulo. Os vértices correspondem aos componentes puros e os lados às misturas binárias, enquanto os pontos no interior do triângulo representam as possíveis misturas dos três componentes (Figura 1).

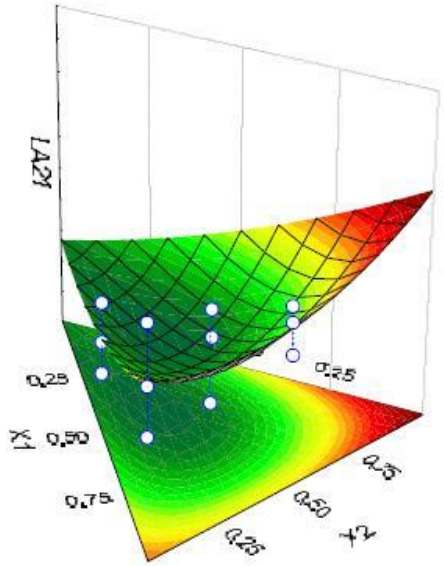

Figura 1. Superfície de resposta para as possíveis misturas.

Quando se desenvolve um produto ou fórmula trabalha-se essencialmente com um problema de otimização. Portanto, a otimização pode ser definida como a escolha da melhor alternativa dentre um grupo específico de possibilidades. Para se determinar os níveis ótimos dos componentes que devem ser otimizados (maximizados ou minimizados) é necessário o planejamento de ensaios (CASTRO et al., 2003). A otimização pela metodologia da superfície de resposta é a mais usada na ciência e tecnologia de alimentos, possivelmente porque a sua teoria é completa, eficiente e simples (BOX; DRAPER, 1987). Através deste conjunto de técnicas, é possível avaliar os efeitos dos principais fatores que fornecem a melhor multi-resposta.

2. JUSTIFICATIVA

A obtenção de sorvetes obtidos pela mistura de leite em pó, extrato de soja e/ou o isolado proteico de soro com suco natural concentrado de maçã, micro-organismos comprovadamente probióticos e ingredientes prebióticos poderá resultar em um produto com excelente potencial funcional e características sensoriais atrativas. Sendo assim, a ideia de substituir parcialmente ou totalmente o leite por outros ingredientes, como o extrato de soja e o isolado proteico de soro nos pareceu merecedora de investigação e poderá ampliar o leque de opções de produtos probióticos e simbióticos para indivíduos sem intolerância à lactose e para aqueles com diferentes graus de intolerância a esse açúcar. Adicionalmente, a maçã tem sido muito utilizada com sucesso em produtos de soja, mascarando o seu sabor residual e contribuindo para o aumento da aceitação dos produtos à base de soja.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver sorvetes de maçã simbióticos à base de leite, extrato de soja e/ou da mistura de isolado proteico de soro com inulina, em diferentes proporções, verificando a influência desses ingredientes na viabilidade dos probióticos e em suas características físico-químicas e sensoriais

3.2 Específicos

- avaliar a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* Bb-12 nas formulações de sorvete, empregando-se técnicas dependentes de cultivo, e a sobrevivência desses micro-organismos nos produtos submetidos ao estresse gastrintestinal *in vitro,* empregando-se técnicas independentes de cultivo, além de monitorar alterações morfológicas nas células durante as etapas de digestão simulada, com a aplicação de técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- avaliar os efeitos dos ingredientes sobre as características tecnológicas (*overrun*, taxa de derretimento e dureza instrumental) e aceitabilidade geral dos sorvetes simbióticos de maçã por até 84 dias de armazenamento a -18 ± 3 °C.

PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS

- Os sorvetes mostraram-se satisfatórios como veículos para La-5 e Bb-12 (mínimo de 7,5 log ufc/g) durante todo o período de 84 dias de armazenamento a -18 °C.
- A análise por PMA-qPCR evidenciou que os probióticos resistiram ao ensaio *in vitro*, com níveis significativos de sobrevivência, atingindo taxas de sobrevivência superiores a 50%.
- As imagens obtidas por MEV evidenciaram células com diferenças morfológicas, sugerindo alterações fisiológicas em resposta ao estresse induzido durante o ensaio *in vitro.*
- A partir do modelo linear obtido para o *overrun* verificou-se que não há interação entre os fatores avaliados. O modelo especial cúbico mostrou que a interação binária (SPI) e terciária (MSPI) resultou em valores maiores de dureza.
- Uma vez que não são desejados valores extremos para a dureza, com base na otimização dos resultados, é recomendada a combinação de 3,7 % M, 1,3% S e 5,0% PI.
- A avaliação sensorial dos sorvetes resultou em escores médios que variaram de 5,6 a 8,0 durante todo o armazenamento, no entanto mais de 50% das avaliações corresponderam na escala a opiniões entre "gostei ligeiramente" e "gostei muitíssimo".
- As características mais citadas pelos consumidores como atributos positivos foram o sabor e a textura.
- A substituição total do leite por PI afetou a aceitabilidade geral desse sorvete. No entanto, os sorvetes produzidos com as misturas de ingredientes (MS, MPI, SPI, MSPI e R) obtiveram bons escores médios na avaliação sensorial, mantendo-se em torno de 6,3 ou mais.

CONCLUSÕES

O presente trabalho mostrou que os sorvetes desenvolvidos são boas matrizes carreadoras de *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis*Bb-12, uma vez que esses micro-organismos mantiveram-se viáveis com populações médias superiores 7,5 log ufc/g, o que garante a viabilidade mínima recomendada atualmente pela legislação brasileira de 8 a 9 log ufc em uma porção diária do produto. Os resultados obtidos por PMA-qPCR demonstraram que as diferentes combinações dos ingredientes variáveis resultaram em uma matriz alimentar capaz proporcionar proteção às cepas sob condições de stress GI quando comparado ao seu homólogo à base de leite. Os resultados de MEV confirmaram que existem células em diferentes fases fisiológicas e morfológicas durante o ensaio *in vitro.* Apesar de todas as formulações terem conferido resistência às cepas sob estresse, a variação encontrada na sobrevivência de La-5 e Bb-12 sugere que a tolerância é, de fato, afetada pela escolha da matriz alimentar. Os fatores leite em pó, extrato de soja e proteína isolada de soro de leite + inulina influenciaram fortemente os parâmetros tecnológicos de *overrun* e dureza, mas pouco afetaram a taxa de derretimento. Com exceção do sorvete PI, os sorvetes receberam notas em torno de 6,3 ou mais, indicando que são atrativos ao paladar dos consumidores. Os resultados também mostraram que, além de ser um alimento nutritivo e com aceitabilidade global sem diferença significativa em relação ao homólogo à base de leite, as formulações de sorvete que tiveram a substituição do leite em pó por extrato de soja ou por WPI + inulina poderiam assegurar aos consumidores um alimento funcional sem lactose.

Perspectivas futuras: Em um próximo estudo seria de grande importância estender essa pesquisa a ensaios clínicos e avaliar a sobrevivência desses micro-organismos nas fezes de indivíduos saudáveis que consumam as formulações avaliadas, uma vez que todas as matrizes de sorvete mantiveram o nível mínimo recomendado de probióticos no produto.

4. REFERÊNCIAS[1]

ABGHARI, A.; SHEIKH-ZEINODDIN, M.; SOLEIMANIAN-ZAD, S. Nonfermented ice cream as a carrier for *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus*.**International Journal of Food Science and Technology**, v.46, n.1, p.84–92, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. Brasília, 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 16 mai. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n.266, de 22 de setembro de 2005**. Aprova o regulamento técnico para gelados comestíveis e preparados para gelados comestíveis. Disponível em:http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f5d552004a9bdc469832dc4600696f00/Resolucao_RDC_n_266_de_22_de_setembro_de_2005.pdf?MOD=AJPERES. Acessoem: 16 nov. 2010.

AHMAD, N.; LI, L.; YANG, X.-Q.; NING, Z.-X.; RANDHAWA, M.A. Improvements in the flavour of soy cheese. **Food Technology and Biotechnology**, v.46, n.3, p.252–261, 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.

ALAMPRESE, C.; FOSCHINO, R.; ROSSI, M.; POMPEI, C.; SAVANI, L. Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and the influence of its addition in retail-manufactured ice-cream produced with different sugar and fat concentration. **International Dairy Journal**, v.12, n.2/3, p.201–208, 2002.

ANEKELLA, K.; ORSAT, V. Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v.50, n.1, p.17-24, 2013.

BAHRAM-PARVAR, M.; TEHRANI, M. M.; RAZAVI, S. M. A.; KOOCHEKI, A. Application of simplex-centroid mixture design to optimize stabilizer combinations for ice cream manufacture. **Journal of Food Science and Technology**, v.52, p.1480-1488, 2015.

BALDISSERA, A.C.N.; DELLA BETTA, F.; PENNA, A.L.B.; LINDNER, J.D.D. Alimentos funcionais: uma nova fronteira para o desenvolvimento de bebidas proteicas à base de soro de leite. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, p.1497-1512, 2011.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos**: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 3.ed. Campinas: UNICAMP, 2007. 480p.

BEDANI, R.; CAMPOS, M.M.S.; CASTRO, I.A.; ROSSI, E.A.; SAAD, S.M.I. Incorporation of soybean by-product okara and inulin in a probiotic soy yoghurt: texture profile and sensory acceptance. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.94, n.1, p.119–125, 2014.

BEDANI, R.; ROSSI, E.A.; SAAD, S.M.I. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus*

acidophilus La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v.34, n.2, p.382-389, 2013.

BEHRENS, J.H.; ROIG, S.M.; SILVA, M.A.A.P. Fermentation of soymilk by commercial lactic cultures: development of a product with market potential. **Acta Alimentaria**, v.33, n.2, p.101-109, 2004.

BEHRENS, J.H.; SILVA, M.A.A.P. Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.3, p.431-439, 2004.

BIASUCCI, G.; RUBINI, M.; RIBONI, S.; MORELLI, L.; BESSI, E.; RETETANGOS, C. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. **Early Human Development**, v.86, suppl.1, p.S13-S15, 2010.

BOX, G.E.P.; DRAPER, N.R. **Empirical model-building and response surfaces**. New York: Wiley, 1987. 669p. (Wiley series in probability and mathematical statistics Applied probability and statistics).

BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Effects of refrigeration, freezing and replacement of milk fat by inulin and whey protein concentrate on texture profile and sensory acceptance of synbiotic guava mousses. **Food Chemistry**, v.123, n.4, p.1190-1197, 2010a.

BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.137, n.2/3, p.121-129, 2010b.

CANI, P.D.; DELZENNE, N.M.The gut microbiome as therapeutic target. **Pharmacology & Therapeutics**, v.130, n.2, p.202–212, 2011.

CARABIN, I.G.; FLAMM, W.G. Evaluation of Safety of Inulin and Oligofructose as Dietary Fiber.**Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.30, n.3, p.268-282, 1999.

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, 2008.

CASTRO, I.A.; SILVA, R.S.F.; TIRAPEGUI, J.; BORSATO, D.; BONA, E. Simultaneous optimization of response variables in protein mixture formulation constrained simplex method approach. **International Journal of Food Science and Technology**, v.38, n.2, p.103-110, 2003.

CHAMPAGNE, C.P.; RAYMOND, Y.; GUERTIN, N.; BÉLANGER, G. Effects of storage conditions, microencapsulation and inclusion in chocolate particles on the stability of probiotic bacteria in ice cream. **International Dairy Journal,** v.47, p.109-117, 2015.

CODRON, J.-M.; GRUNERT, K.; GIRAUD-HERAUD, E.; SOLER, L.-G.; REGMI, A. Retail sector responses to changing consumer preferences. In: REGMI, A.; GEHLHAR, M., eds. **New directions in global food markets**. Washington: United States. Departament of Agriculture, 2005.cap.3, p.32-46. (Agriculture Information Bulletin, n.794).

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra Brasileira:** grãos – safra 2014/2015 - Quarto Levantamento: Janeiro/2015. Brasília: CONAB, 2015. 90p. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_01_09_09_00_21_boletim_graos_janeiro_2015.pdf. Acessoem: 13 out. 2015

COPPOLA, S.; BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D. Dairy products. In: COCOLIN, L.; ERCOLINI, D., eds. **Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods**. New York: Springer, 2008. cap.2, p.31-90.(Food microbiology and food safety series).

COSTABILE, A.; KOLIDA, S.; KLINDER, A.; GIETL, E.; BAUERLEIN, M.; FROHBERG, C.; GIBSON, G. A double-blind, placebo-controlled, cross-over study to establish the bifidogenic effect of a very-long-chain inulin extracted from globe artichoke (*Cynara scolymus*) in healthy human subjects. **British Journal of Nutrition**, v.104, n.7, p. 1007-1017, 2010.

CRUZ, A.G.; ANTUNES, A.E.C.; HARAMI, J.B.; SOUSA, A.L.P.; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I. Sorvetes probióticos e prebióticos. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F., eds. **Probióticos e prebióticos em alimentos**: fundamentos e aplicações tecnológicas. São Paulo: Varela, 2011. cap.15, p.359-388.

CRUZ, A.G.; ANTUNES, A.E.C.; SOUSA, A.L.O.P.; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I. Ice-cream as a probiotic food carrier. **Food Research International**, v.42, n.9, p.1233-1239, 2009. [Review].

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

DE VRESE, M.; KRISTEN, H.; RAUTENBERG, P.; LAUE, C.; SCHREZENMEIR, J. Probiotic lactobacilli and bifidobacteria in a fermented milk product with added fruit preparation reduce antibiotic associated diarrhea and *Helicobacter pylori* activity. **Journal of Dairy Research**, v.78, n. 4, p.396-403, 2011.

DI MAURO, A.; NEU, J.; RIEZZO, G.; RAIMONDI, F.; MARTINELLI, D.; FRANCAVILLA, R.; INDRIO, F. Gastrointestinal function development and microbiota. **Italian Journal of Pediatrics**, v.39, n.15, p.2-7, 2013.

DOMINGUEZ-BELLO, M.G.; BLASER, M.J.; LEY, R.E.; KNIGHT, R. Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. **Gastroenterology**, v.140, n.6, p.1713-1719, 2011.

FARNWORTH, E.R.; MAINVILLE, I.; DESJARDINS, M.-P.; GARDNER, N.; FLISS, I.; CHAMPAGNE, C. Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. **International Journal of Food Microbiology**, v.116, n.1, p.174–181, 2007.

FOOKS, L.J.; FULLER, R.; GIBSON, G.R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **InternationalDairyJournal**, v.9, n.1, p.53-61, 1999.

FUCHS, R.H.B.; BORSATO, D.; BONA, E.; HAULY, M.C.O. “Iogurte” de soja suplementado com inulina e oligofrutose. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.1, p.175-181, 2005.

GARCÍA-CAYUELA, T.; TABASCO, R.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazideand real-time PCR. **International Dairy Journal**, v.19, n.6/7, p.405-409, 2009.

GEISER, M. The wonders of whey protein. **NSCA's Performance Training Journal**, v.2, n.5, p.13-15, 2003.

GHADIMI, D.; FOLSTER-HOLST, R.; DE VRESE, M.; WINKLER, P.; HELLER, K.J.; Schrezenmeir J. Effects of probiotic bacteria and their genomic DNA on TH1/TH2-cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy and allergic subjects. **Immunobiology**, v.213, n.8, p.677-692, 2008.

GIBSON, G.R.; ROBERT, H.M.; VAN LOO, J.V.; RASTALL, R.A.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v.17, n.2, p.259-275, 2004.

GIRAFFA, G.; CARMINATI, D. Molecular techniques in food fermentation: principles and applications. In: COCOLIN, L.; ERCOLINI, D., eds. **Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods**. New York: Springer, 2008. cap.1, p.1-30.(Food microbiology and food safety series).

GOFF, H.D.; HARTEL, R.W. **Ice Cream**. New York: Springer US, 2013. 462p.

HAMILTON-MILLER, J.M.T. Probiotics and prebiotics in the elderly. **Postgraduate Medical Journal**, v.80, n.946, p.447-451, 2004.

HÄNNINEN, O.; SEN, C.K. Nutritional supplements and functional foods: Functional significance and global regulations. In: BAGCHI, D., ed. **Nutraceutical and functional food regulations in the United States and around the world**. London: Elsevier; Academic Press, 2008. cap.2, p.11-35.(Food science and technology.International series).

HARAMI, J.B. **Desenvolvimento de cereal em barra com gelado comestível simbiótico**. São Paulo, 2008. 113p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

HASLER, C.M.; BROWN, A.C.; AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. Position of the American Dietetic Association: functional foods. **Journal of the American Dietetic Association**, v.109, n.4, p.735-746, 2009.

HEENAN, C.N.; ADAMS, M.C.; HOSKEN, 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, n.4, p.461–466, 2004.

HEKMAT, S.; SOLTANI, H.; REID, G. Growth and survival of *Lactobacillus reuteri* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 in yogurt for use as a functional food. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.10, n.2, p.293-296, 2009.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G.R.; MERENSTEIN, D.J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R.B.; FLINT, H.J.; SALMINEN, S.; CALDER, P.C.; SANDERS, M.E.. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature**

reviews Gastroenterology &Hepatology, v.11, n.8, p.506-514, 2014.

JUNGERSEN, M.; WIND, A.; JOHANSEN, E.; CHRISTENSEN, J.; STUER-LAURIDSEN, B.; ESKESEN, D.The Science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®.**Microorganisms**, v.2, n. 2, p.92, 2014.

JUNQUEIRA, R.M.; CASTRO, I.A.; ARÊAS, J.A.G.; SILVA, A.C.C.; SCHOLZ, M.B.S.; MENDES, S.; OLIVEIRA, K.C. Application of response surface methodology for the optimization of oxidants in wheat flour. **Food Chemistry**, v.101, n.1, p.131-139, 2007.

KAMALY, K.M. Bifidobacteria fermentation of soybean milk. **Food Research International**, v.30, n.9, p.675-682, 1998.

KAUR, H.; MISHRA, H.N.; KUMAR, P. Textural properties of mango soy fortified probiotic yoghurt: optimisation of inoculum level of yoghurt and probiotic culture. **International Journal of Food Science and Technology**, v.44, n.2, p.415–424, 2009.

KENT, R.M.; DOHERTY, S.B. Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. **Food Research International**, v.64, p.567-576, 2014. [Review].

KOLIDA, S.; GIBSON, G.R. Synbiotics in health and disease. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.2, p.377-393, 2011.

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].

KRISSANSEN, G.W. Emerginghealthpropertiesofwheyproteinsandtheirclinicalimplications. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 26, n. 6,p.713-723, 2007.

KUMAR, V.; RANI, A.; SOLANKI, S.; HUSSAIN, S.M. Influence of growing environment on the biochemical composition and physical characteristics of soybean seed. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, n.2/3, p.188-195, 2006.

KWAN, C.Y.; KIRJAVAINEN, P.; YAN, C.; EL-NEZAMI, H. Atherosclerosis and gut microbiota: a potential target for probiotics. In: LAHTINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. eds. **Lactic acid bacteria**: microbiological and functional aspects. 4.ed. Boca Raton: CRC Press, 2012. cap.16, p.331-342.

LAPARRA, J.M.; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. **Pharmacological Research**, v.61, n.3, p.219–225, 2010.

LIONG, M.-T.; EASA, A.M.; LIM, P.-T.; KANG, J.-Y. Survival, growth characteristic and bioactive potential of *Lactobacillus acidophilus* in soy-based cream cheese. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.89, n.8, p.1382-1391, 2009.

LIU, D.-M.; LI, L.; YANG, X.-Q.; LIANG, S.-Z.; WANG, J.-S.Survivability of *Lactobacillus rhamnosus* during the preparation of soy cheese. **Food Technology and Biotechnology**, v.44, n.3, p.417–422, 2006.

LYRA, A.; LAHTINEN, S.; OUWEHAND, A.C. Gastrointestinal benefits of probiotics –

clinical evidence. In: LAHTINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. eds. **Lactic acid bacteria**: microbiological and functional aspects. 4.ed. Boca Raton: CRC Press, 2012. cap.23, p.509-523.

MARTINEZ, R.C.; BEDANI, R. SAAD, S.M. Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: an update for current perspectives and future challenges. **British Journal of Nutrition**, v.15, 2015.

MATIAS, N.S.; BEDANI, R.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I.A probiotic soy-based innovative product as an alternative to *petit-suisse* cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v.59, n.1, p.411-417, 2014.

MEIRA, Q.G.S.; MAGNANI, M.; DE MEDEIROS JÚNIOR, F.C.; QUEIROGA, R.D.C.R.D.E.; MADRUGA, M.S.; GULLÓN, B.; GOMES, A.M.P.; PINTADO, M.M.E.; DE SOUZA, E.L. Effects of added Lactobacillus acidophilus and *Bifidobacterium lactis* probiotics on the quality characteristics of goat ricotta and their survival under simulated gastrointestinal conditions**. Food Research International**, v.73, n.3, p.828-838, 2015.

MENSINK, M. A.; FRIJLINK, H. W.; VAN DER VOORT MAARSCHALK, K.; HINRICHS, W. L. J. Inulin, a flexible oligosaccharide I: Review of its physicochemical characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v.130, p.405-419, 2015.

MEYER, D.; BAYARRI, S.; TÁRREGA, A.; COSTELL, E. Inulin as texture modifier in dairy products. **Food Hydrocolloids**, v.25, n.8, p.1881-1890, 2011. [Review]

NEISH, A.S. Microbes in gastrointestinal health and disease. **Gastroenterology**, v.136, n.1, p.65-80, 2009.

NOCKER, A.; CHEUNG, C.Y.; CAMPER, A.K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. **Journal of Microbiological Methods**, v.67, n.2, p.310-320, 2006.

NOCKER, A.; MAZZA, A.; MASSON, L.; CAMPER, A.K.; BROUSSEAU, R. Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. **Journal of Microbiological Methods**, v.76, p.253-261, 2009.

NORD, C. E., LIDBECK, A., ORRHAGE, K., SJÖSTEDT, S. Oral supplementation with lactic acid-producing bacteria during intake of clindamycin. **Clinical Microbiology and Infection**, v.3, n.1, p.124-132, 1997.

NOUSIA, F.G.; ANDROULAKIS, P.I.; FLETOURIS, D.J. Survival of *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 in probiotic ice cream and its influence on sensory acceptability. **International Journal of Dairy Technology**, v.64, n.1, p.130-136, 2011.

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

O'HARA, A.M.; SHANAHAN, F. Gut microbiota: mining for therapeutic potential. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v.5, n.3, p.274–284, 2007.

PRADO, F.C.; PARADA, J.L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Trends in non-dairy probiotic

beverages. **Food Research International**, v.41, n.2, p.111–123, 2008. [Review].

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMAN-CALDENTEY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, n.1, p.3-11, 2002. [Review].

QUIGLEY, E.M.M. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. **Pharmacological Research**, v.61, n.3, p.213-218, 2010.

RAMASAMY, K.; RAHMAN, N.Z.A.; CHIN, S.C.; ALITHEEN, N.J.; ABDULLAH, N.; WAN, H.Y. Probiotic potential of lactic acid bacteria from fermented Malaysian food or milk products. **International Journal of Food Science and Technology**, v.47, n.10, p.2175–2183, 2012.

RASTALL, R.A., GIBSON, G.R. Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. **Current Opinion in Biotechnology**, v.32, p.42-46, 2015.

REID, G. Probiotics and prebiotics: progress and challenges. **International Dairy Journal**, v.18, n.10/11, p.969–975, 2008. [Review].

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, v.27, n.1, p.1–11, 2010. [Review].

ROBERFROID, M.B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, n.6, suppl., p.1682S–1687S, 2000.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics: the concept revisited. **Journal of Nutrition**, v.137, n.3, suppl.2, p.830S-837S, 2007.

ROSS, R.P.; MILLS, S.; HILL, C.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Specific metabolite production by gut microbiota as a basis for probiotic function. **International Dairy Journal**, v.20, n.4, p.269–276, 2010. [Review].

ROSSI, E.A.; CAVALLINI, D.C.U.; MANZONI, M.S.J.; ROSSI, P.R. Produtos probióticos e prebióticos à base de soja. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F., eds. **Probióticos e prebióticos em alimentos**: fundamentos e aplicações tecnológicas. **São Paulo: Varela, 2011. cap.22, p.541-563.**

SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J.M.; BRESSOLLIER, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT - Food Science and Technology**, v.50, n.1, p.1-16, 2013.

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

SAAD, S.M.I.; BEDANI, R.; MAMIZUKA, E.M. Benefícios à saúde dos probióticos e prebióticos. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F., eds. **Probióticos e prebióticos em alimentos**: fundamentos e aplicações tecnológicas. São Paulo: Varela, 2011. cap.2, p.51-84.

SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Intestinal colonization, microbiota, and probiotics. Journal of Pediatrics, v.149, n.5, suppl., p.S115-S120, 2006.

SÁNCHEZ, B.; REYES-GAVILÁN, C.G.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M. Probiotic fermented milks: present and future. **International Journal of Dairy Technology**, v.62, n.4, p.472-483, 2009.

SANDERS, M.E., KLAENHAMMER, T.R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.2, p.319-331, 2001. [Review]

SANDERS, M.E.; DOUGLAS, L.C.; Probiotics and prebiotics in dietetics practice. **Journal of the American Dietetic Association**, v.108, n.3, p.510-521, 2008.

SETCHELL, K.D.; CASSIDY, A. Dietary soy isoflavones: biological effects and relevance to human health. **Journal of Nutrtion**, v.129, n.3, p.758S-767S, 1999.

SHARMA, M.; DEVI, M. Probiotics: a comprehensive approach toward Health foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.54, n.4, p.537-552, 2014.

SOETERS, P.B. Probiotics: did we go wrong, and if so, where? **Clinical Nutrition**, v.27, n.2, p.173-178, 2008.

STOLAKI, M.; DE VOS, W.M.; KLEEREBEZEM, M.; ZOETENDAL, E.G. Lactic acid bacteria in the gut. In: LAHTINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. eds. **Lactic acid bacteria**: microbiological and functional aspects. 4.ed. Boca Raton: CRC Press, 2012. cap.12, p.385-401.

SU, P.; HENRIKSSON, A.; MITCHELL, H. Prebiotics enhance survival and prolong the retention period of specific probiotic inocula in an *in vivo* murine model. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, n.6, p.2392-2400, 2007.

TAVARES, T.; MALCATA, F.X. Whey and Whey Powders: Protein Concentrates and Fractions. In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P.M.; TOLDRÁ, F., eds. **Encyclopedia of Food and Health**. Oxford: Academic Press, 2016.

TAVERNITI, V.; GUGLIELMETTI, S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). **Genes & Nutrition**, v.6, n.3, p.261-274, 2011.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. **Probiotic Market is expected to reach USD 96,046.8 million in 2020**. 2015. Disponível em: http://www.transparencymarketresearch.com/pressrelease/probiotics-market.htm. Acesso em: 26 ago. 2015.

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

TSENG, Y.-C.; XIONG, Y.L. Effect of inulin on the rheological properties of silken tofu coagulated with glucono-d-lactone. **Journal of Food Engineering**, v.90, n.4, p.511–516, 2009.

USDEC. Reference manual for US whey and lactose products. Arlington, VA: US Dairy Export Council. 2006. Disponível em: http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey_Lactose_Reference_Manual_Complete2_Optimized.pdf. Acesso em: 22 out. 2015

VAN DOKKUM, W.; WEZENDONK, B.; SRIKUMAR, T.S.; VAN DEN HEUVEL, E.G. Effect of nondigestible oligosaccharides on large-bowel functions, blood lipid concentrations and glucose absorption in young healthy male subjects. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.53, n.1, p.1-7, 1999.

VARGAS, L. A.; OLSON, D. W.; ARYANA, K. J. Whey protein isolate improves acid and bile tolerances of *Streptococcus thermophilus* ST-M5 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB-12. **Journal of Dairy Science**, v.98, n.4, p.2215-2221, 2015.

WANG, K.-Y.; LI, S.-N.; LIU, C.-S.; PERNG, D.-S.; SU, Y.-C.; WU, D.-C.; JAN, C.-M.; LAI, C.-H.; WANG, T.-N.; WANG, W.-M. Effects of ingesting *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.80, n.3, p.737-741, 2004.

WEI, Q.-K.; CHEN, T.-R.; CHEN, J.-T. Using of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* to product the isoflavone aglycones in fermented soymilk. **International Journal of Food Microbiology**, v.117, n.1, p.120-124, 2007.

WELLS, A.L.; SAULNIER, D.M.A.; GIBSON, G.R. Gastrointestinal microflora and interactions with gut flora. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B., eds. **Handbook of prebiotics**. Boca Raton: CRC Press, 2008. cap.2, p.14-38.

WU, B.; LIANG, W.; KAN, B. Enumeration of viable non-culturable *Vibrio cholerae* using propidium monoazide combined with quantitative PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v.115, p.147-152, 2015.

ZOETENDAL, E.G.; COLLIER, C.T.; KOIKE, S.; MACKIE, R.I.; GASKINS, H.R. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. **Journal of Nutrition**, v.134, n.2, p.465–472, 2004.

ZOETENDAL, E.G.; HEILIG, H.G.H.J.; KLAASSENS, E.S.; BOOIJINK, C.C.G.M.; KLEEREBEZEM, M.; SMIDT, H.; DE VOS, W.M. Isolation of DNA from bacterial samples of the human gastrointestinal tract. **Nature Protocols**, v.1, n.2, p.870-873, 2006.

ZULKURNAIN, M.; GOH, M.-H.; KARIM, A.A.; LIONG , M.-T. Development of a soy-based cream cheese. **Journal of Texture Studies**, v.39, n.6, p.635-654, 2008.

Anexos

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEPF/FCF/193/2011
Protocolo CEP/FCF/605
CAAE: 0065.0.018.000-11

I – Identificação:

Projeto de Pesquisa:	**Desenvolvimento de sorvete simbiótico de maçã e avaliação do efeito dos ingredientes na sobrevivência dos probióticos no produto e *in vitro*, utilizando técnicas independentes de cultivo.**
Pesquisador Responsável:	**Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad**
Pós-graduanda envolvida	**Natalia Silva Matias**
Instituição:	Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF-USP/SP

II - Sumário Geral do Protocolo:

A preocupação constante com a qualidade de vida faz com que haja especial atenção à alimentação, possibilitando a inclusão de alimentos com propriedades funcionais benéficas para a saúde, tais como os produtos lácteos com ação funcional, sejam alimentos simbióticos e/ou prebióticos. A adição de culturas probióticas e de ingrediente prebiótico, torna o alimento mais atrativo e potencialmente saudável, podendo ser apreciado pela maioria da população.

Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo desenvolver um sorvete simbiótico com polpa de fruta e de baixo teor de gordura, elaborado com a adição de culturas probióticas (*Bifidobacterium animalis* Bb-12 e *Lactobacillus acidophilus* La-5) e prebiótico oligofrutose (FOS). Será realizado delineamento experimental para misturas simples (*centroid simplex*), com um ponto central e três fatores e a metodologia de superfície de resposta para a obtenção de um modelo que represente o comportamento dos três fatores analisados (leite em pó, extrato de soja em pó e inulina + isolado protéico de soro), avaliando a influência dos ingredientes sobre viabilidade probiótica aos diferentes períodos de armazenamento, no produto e *in vitro*, incluindo também a avaliação da aceitabilidade sensorial do produto formulado.

Os objetivos do presente estudo são:

O projeto apresenta como objetivo geral, desenvolver um sorvete de maçã simbiótico à base de leite, soja e da mistura de isolado protéico de soro com inulina, em diferentes proporções, verificando a proporção mais adequada desses ingredientes no produto, tendo como objetivos específicos:

a) avaliar o efeito do leite em pó, extrato de soja em pó e da mistura isolado protéico de soro com inulina, sobre as características fisico-químicas e sensoriais de sorvetes elaborados com suco natural concentrado de maçã e suplementados com os micro-organismos comprovadamente probióticos *Bifidobacterium animalis* Bb-12 e *Lactobacillus acidophilus* La-5 e com o ingrediente prebiótico oligofrutose (FOS), durante o seu armazenamento a –18 ºC por até 12 semanas.

b) Verificar a sobrevivência dos probióticos incorporados às diferentes formulações de sorvete de maçã e a sua resistência *in vitro* frente às condições gástrica e entérica,

em diferentes períodos de armazenamento, utilizando métodos independentes de cultivo, paralelamente à metodologia convencional.

Descrição da Casuística:

Será realizada a análise sensorial das formulações constantes no projeto, em três períodos de armazenamento distintos (7, 42 e 84 dias). tendo a previsão entre 30 e 630 voluntários adultos saudáveis (provadores não treinados), podendo ser alunos de graduação e de pós- graduação, docentes e funcionários da Universidade de São Paulo ou outros voluntários que queiram participar do estudo.

Será aplicado um questionário sobre a aceitabilidade do produto elaborado, mencionando-se o nome do indivíduo que realizará o teste, data e especificação da amostra e o grau de aceitabilidade descrito em uma escala de 1 a 9, além da solicitação da descrição por extenso das qualidades do produto.

III – Situação do Protocolo: APROVADO em reunião de 28/11/11.

Cabe ao pesquisador responsável:

- Comunicar ao CEP:
  - A ocorrência de efeitos colaterais e ou de reações não esperadas;
  - Eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
  - A interrupção do projeto;
- Rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, apondo sua assinatura na última página do referido termo. Da mesma forma, o sujeito de pesquisa ou seu representante legal.
- Apresentar relatório parcial em dez/13 e relatório final em dez/14.(modelo do CEP)

São Paulo, 28 de Novembro de 2011.

Profa. Dra. Mariza Landgraf
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

Ficha para teste de aceitação – Sorvete probiótico de maçã

Nome: _____ Sexo: ( )M ( )F

Data: ___/___/_____ Amostra: _____

Você recebeu uma amostra de sorvete probiótico. 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: _____

Você compraria o produto? ( ) Sim ( )Não