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

Sobremesa aerada simbiótica: desenvolvimento do produto e resistência do probiótico *in vitro*

Flávia Carolina Alonso Buriti

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

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

São Paulo
2008

DEDALUS - Acervo - CQ

30100015059

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

Buriti, Flávia Carolina Alonso
B959s Sobremesa aerada simbiótica : desenvolvimento do produto e resistência do probiótico *in vitro* / Flávia Carolina Alonso Buriti. -- São Paulo, 2008.
144p.

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

1. Tecnologia de alimentos 2. Microbiologia de alimentos I. T. II. Saad, Susana Marta Isay, orientador.

664 CDD

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Flávia Carolina Alonso Buriti

Sobremesa aerada simbiótica: desenvolvimento do produto e resistência do probiótico *in vitro*

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, 05/03/09 de 2009.

À minha família, pelo amor, carinho e incentivo em todos os momentos de minha vida

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e direcionamento concedidos a mim para a preparação do projeto de Doutorado, execução e finalização deste trabalho.

A minha orientadora Prof^{a}. Dr^{a}. Susana Marta Isay Saad, pelos ensinamentos, paciência e confiança dedicados a mim ao longo de vários anos e pelas realizações alcançadas durante esse período.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e pela bolsa de Doutorado e pelo Auxílio à Pesquisa concedidos (processos 04/13597-6 e 05/51317-8).

A todos os colegas que fizeram e fazem parte do grupo de pesquisa da prof^{a}. Susana, em especial, à estagiária Tiemy Rosana Komatsu, pela importante colaboração com este trabalho e novamente à FAPESP pela concessão da bolsa de iniciação científica (proc. 06/51297-0).

Aos docentes, funcionários e colegas do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da FCF – USP.

À Dr^{a}. Alcina Maria Liserre pela importante colaboração e sugestões dedicadas à realização dos ensaios de resistência do probiótico *in vitro*.

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli e a Dr^{a}. Roberta Claro da Silva pelo auxílio na determinação de lipídios e de ácidos graxos.

À Prof^{a}. Dr^{a}. Inar Alves de Castro pela colaboração na análise estatística e pelas valiosas sugestões para a apresentação e discussão dos resultados obtidos.

À equipe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental – FCF – USP, em especial à técnica Kátia Leani Oliveira S. Silva, pela realização das análises de *Bacillus cereus* e *Salmonella*.

À Prof^{a}. Dr^{a}. Célia Colli e ao colega Alexandre Rodrigues Lobo pelo auxílio na complementação das análises do presente trabalho, cujos resultados pretendemos incluir em uma futura publicação.

Aos demais professores, pesquisadores, funcionários e colegas do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF – USP.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro através da verba PROAP.

À Coordenadoria de Assistência Social da Universidade de São Paulo (COSEAS) pela bolsa moradia.

Aos professores Hauke Smidt e Erwin G. Zoetendal pela cordial recepção e atenção durante as duas visitas à Wageningen University, Wageningen, Holanda, em 2008. Às pós-doutorandas Haíssa Roberta Cardarelli e Martha L. Villarreal Morales pela amizade e pelo tempo e atenção concedidos durante a visita à Wageningen University.

À Federation of European Microbiological Societies - FEMS pela concessão da FEMS Young Scientist Meeting Grant (YSMG), para a participação do IX Symposium on Lactic Acid Bacteria, Egmond aan Zee, Holanda, em 2008.

A todos os provadores participantes da análise sensorial.

Às empresas Christian Hansen, Clariant, Danisco, Kraki, Orafti, Novozymes e Purac Sínteses que colaboraram com parte dos recursos materiais aqui utilizados.

A meus familiares e amigos pelo incentivo.

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

RESUMO

Buriti, F.C.A. **Sobremesa aerada simbiótica: desenvolvimento do produto e resistência do probiótico *in vitro*.** 2008. 144p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O presente trabalho visou o desenvolvimento de uma sobremesa aerada simbiótica tipo musse, com baixo teor de gordura, processada com a adição da cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus* La-5, dos ingredientes prebióticos oligofrutose e inulina e de concentrado protéico de soro de leite (WPC), para ser armazenada sob refrigeração e congelamento, e a comparação do efeito desses ingredientes sobre as características do produto e a resistência *in vitro* do probiótico adicionado. Utilizando o delineamento experimental para misturas de três fatores e um ponto central, 7 formulações de musses de goiaba foram estudadas durante o armazenamento a 4°C, durante 28 dias, e a -18°C, durante 112 dias. As maiores populações de *L. acidophilus* foram alcançadas nas musses congeladas, com valores sempre superiores a 7 log UFC/g por até 12 semanas de armazenamento a -18°C. A viabilidade de *L. acidophilus* se mostrou satisfatória até o 28º dia nas musses refrigeradas adicionadas de WPC, com populações variando entre 7,7 e 6,2 log UFC/g. Para as demais musses, a população do probiótico chegou a reduzir, em média, até 2 log após 28 dias. *L. acidophilus* apresentou grande redução da viabilidade, tanto para as musses refrigeradas como para as congeladas, nos ensaios de sobrevivência às condições gastrintestinais simuladas *in vitro*. Nas musses refrigeradas, a substituição total ou parcial da gordura láctea por inulina resultou em melhor sobrevivência do probiótico durante o ensaio *in vitro* na primeira semana. Ao considerar o período completo de armazenamento, a menor redução da viabilidade de *L. acidophilus* ao longo dos ensaios *in vitro* foi observada para as musses congeladas. A substituição da gordura láctea por inulina e WPC e o congelamento resultaram em diferenças significativas nos parâmetros de textura das musses ($p<0,05$), não interferindo, porém, na sua aceitabilidade sensorial. Considerando as populações máximas do probiótico ao longo do armazenamento e a sua sobrevivência às condições gastrintestinais simuladas *in vitro*, observou-se os melhores resultados com a substituição parcial da gordura láctea adicionada no produto refrigerado por WPC, na proporção de 2 a 3% da formulação. A adição simultânea de WPC e inulina para musses armazenadas sob refrigeração e congelamento é recomendada desde que a proporção conjunta desses ingredientes não ultrapasse 2,6%, no sentido de não prejudicar a textura e as características sensoriais do produto. De modo especial para as musses congeladas, também é aconselhada a proporção de 2% de gordura láctea e 2% de inulina, para a qual foram obtidos os melhores resultados nos ensaios de sobrevivência *in vitro* do probiótico.

Palavras chaves: Musse. Probióticos. Oligofrutose. Inulina. WPC.

ABSTRACT

BURITI, F.C.A. **Synbiotic aerated dessert: product development and *in vitro* probiotic survival.** 2008. 144p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The aim of the present study was to develop a mousse-type synbiotic aerated dessert with low fat content, supplemented with the *Lactobacillus acidophilus* La-5 probiotic culture, the prebiotic ingredients oligofructose and inulin and whey protein concentrate (WPC), to be stored refrigerated and frozen, and to compare the effect of these ingredients on the product characteristics and the *in vitro* resistance of the added probiotic microorganism. Using a simplex centroid design, seven guava mousse-making trials were studied during storage at 4°C for 28 days and at -18°C for 112 days. The highest populations of *L. acidophilus* were achieved in frozen products, always above 7 log CFU/g at up to 12 weeks of storage at -18°C. *L. acidophilus* viability was satisfactory up to 28 days in the refrigerated mousses supplemented with WPC, with populations between 6.2 and 7.7 log CFU/g. For the other mousses, the populations decreased around 2 log cycles after 28 days of refrigerated storage. Reductions in *L. acidophilus* survival during the *in vitro* assays were high both for refrigerated and frozen mousses. For the refrigerated mousses, the total or partial substitution of milk fat by inulin increased the probiotic survival during the *in vitro* assays in the first week. In terms of the whole storage, *L. acidophilus* survival decreased less during the *in vitro* assays for the frozen mousses. The substitution of milk fat by inulin and WPC and the frozen storage lead to significant differences in the texture of mousses ($p<0.05$), without affecting their sensory acceptability. Considering the maximum probiotic populations during storage and the survival under the *in vitro* simulated gastrointestinal conditions, the best results for the refrigerated product were obtained with the partial substitution of milk fat by WPC at 2 to 3%. The simultaneous addition of inulin and WPC is recommended. However, the total proportion of both ingredients together should not exceed 2.6%, so as to obtain a texture profile and a sensory acceptance similar to the traditional product. Particularly for frozen mousses, the mixture of 2% milk fat and 2% inulin in the formulation is also suggested, for which the best results on probiotic survival in the *in vitro* assays were observed.

Keywords: Mousse. Probiotics. Oligofructose. Inulin. WPC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Principais etapas envolvidas na fabricação das musses. 24
Figura 2: Cromatograma da fração de lipídeos extraída da musse T1.....40
Figura 3: Diagrama triangular da viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* nas musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) aos 14 dias. 54
Figura 4: Sobrevivência *in vitro* de *L. acidophilus* nas musses após 1 dia de armazenamento a 4±1°C.....60
Figura 5: Sobrevivência *in vitro* de *L. acidophilus* nas musses após 7 dias de armazenamento a 4±1°C.....62
Figura 6: Sobrevivência *in vitro* de *L. acidophilus* nas musses após 14 dias de armazenamento a 4±1°C. 63
Figura 7: Sobrevivência *in vitro* de *L. acidophilus* nas musses após 21 dias de armazenamento a 4±1°C. 64
Figura 8: Sobrevivência *in vitro* de *L. acidophilus* nas musses após 28 dias de armazenamento a 4±1°C. 65
Figura 9: Sobrevivência *in vitro* de *L. acidophilus* nas musses após 7 dias de armazenamento a –18±3°C.....67
Figura 10: Sobrevivência *in vitro* de *L. acidophilus* nas musses após 35 dias de armazenamento a –18±3°C. 68
Figura 11: Sobrevivência *in vitro* de *L. acidophilus* nas musses após 56 dias de armazenamento a –18±3°C. 69
Figura 12: Sobrevivência *in vitro* de *L. acidophilus* nas musses após 84 dias de armazenamento a –18±3°C. 70
Figura 13: Sobrevivência *in vitro* de *L. acidophilus* nas musses após 112 dias de armazenamento a –18±3°C. 71
Figura 14: Diagrama triangular da variável firmeza nas musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) aos 14 dias 89
Figura 15: Diagrama triangular da variável firmeza nas musses T1 a T7, armazenadas sob congelamento (-18±3°C) aos 112 dias.....89
Figura 16: Diagrama triangular da variável coesividade nas musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) aos 14 dias. 90
Figura 17: Diagrama triangular da variável coesividade nas musses T1 a T7, armazenadas sob congelamento (-18±3°C) aos 112 dias.....90
Figura 18: Aparência geral das musses servidas na análise sensorial.....97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais ingredientes utilizados na elaboração das musses 21

Tabela 2: Proporção dos ingredientes utilizados na produção das musses 22

Tabela 3: Composição centesimal 37

Tabela 4: Distribuição de ácidos graxos em 100 g de amostra integral 41

Tabela 5: Distribuição de ácidos graxos segundo o grau de insaturação/ conformação em 100 g de amostra integral 43

Tabela 6: Proporção de ácidos graxos segundo o grau de insaturação/ conformação na fração lipídica 43

Tabela 7: Contribuição energética dos macronutrientes em 100 g de amostra integral e valor energético total (VET) 44

Tabela 8: Modificação no valor nutricional das musses T2 a T7 46

Tabela 9: Valores de pH 48

Tabela 10: Populações de *Lactobacillus acidophilus* 50

Tabela 11: Coeficientes, erros-padrão e intervalos de confiança (IC) de 95% obtidos para o modelo cúbico especial a partir dos resultados de populações de *L. acidophilus* nas musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) aos 14 dias 53

Tabela 12: Análise de variância obtida para o modelo cúbico especial para os resultados de populações de *L. acidophilus* nas musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) aos 14 dias. 53

Tabela 13: Populações de *Staphylococcus* DNAse-positivos 57

Tabela 14: Populações de bolores e leveduras 58

Tabela 15: Valores de firmeza 76

Tabela 16: Valores de coesividade 78

Tabela 17: Valores de adesividade 80

Tabela 18: Valores de elasticidade 81

Tabela 19: Valores de gomosidade 82

Tabela 20: Coeficientes, erros-padrão e intervalos de confiança (IC) de 95% obtidos para o modelo cúbico especial a partir dos resultados de firmeza e coesividade nas musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) aos 14 dias e sob congelamento (-18±3°C) aos 112 dias 85

Tabela 21: Análise de variância obtida para o modelo cúbico especial para os resultados de firmeza das musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) aos 14 dias 86

Tabela 22: Análise de variância obtida para o modelo cúbico especial para os resultados de firmeza das musses T1 a T7, armazenadas sob congelamento (-18±3°C) aos 112 dias 86

Tabela 23: Análise de variância obtida para o modelo cúbico especial para os resultados de coesividade das musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) aos 14 dias.....86

Tabela 24: Análise de variância obtida para o modelo cúbico especial para os resultados de coesividade das musses T1 a T7, armazenadas sob congelamento (-18±3°C) aos 112 dias.....87

Tabela 25: Aceitabilidade sensorial.....93

Tabela 26: Distribuição das citações relacionadas ao atributo sabor.....95

Tabela 27: Distribuição das citações relacionadas ao atributo textura.....96

Tabela 28: Distribuição das citações relacionadas ao atributo aparência.....98

Tabela 29: Distribuição das citações relacionadas ao atributo aroma 99

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1
1.1. Alimentos funcionais 1
1.2. Fisiologia e microbiologia gastrintestinal: o papel dos probióticos 3
1.3. O gênero *Lactobacillus* 6
1.4. Proteínas do soro de leite: ingrediente funcional em alimentos e agente protetor para os probióticos *in vivo* 8
1.5. Prebióticos – definição e efeitos fisiológicos 10
1.6. Frutanos - inulina e oligofrutose 12
1.7. Efeitos sinérgicos de pré e probióticos e os alimentos simbióticos 14
1.8. Musse como alimento funcional simbiótico 15
2. OBJETIVOS 20
3. MATERIAL E MÉTODOS 20
3.1. Delineamento experimental 20
3.2. Fabricação das musses T1 a T7 21
3.3. Períodos de amostragem durante o armazenamento 24
3.4. Determinação dos parâmetros microbiológicos 25
3.4.1. Determinação da população do microrganismo probiótico 26
3.4.2. Determinação dos parâmetros microbiológicos sanitários 26
3.5 Avaliação *in vitro* da resistência da cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus* às condições gástrica e entérica durante a vida de prateleira das musses mantidas sob refrigeração e congelamento 27
3.6. Determinação dos parâmetros físico-químicos das musses 29
3.7. Determinação do teor de lipídios da matéria prima utilizada para a produção das musses 31
3.8. Cálculo do valor energético total (VET) e apresentação dos nutrientes e porções para fins de rotulagem nutricional 31
3.9. Textura instrumental 32
3.10. Análise sensorial 33
3.11. Análise estatística 34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 37
4.1. Parâmetros físico-químicos 37
4.1.1. Composição centesimal 37
4.1.2. Quantificação de ácidos graxos 40

4.1.3. Apresentação do valor energético total (VET), nutrientes e porção para fins de rotulagem nutricional 44
4.1.4. Valores de pH 47
4.2. Viabilidade do microrganismo probiótico nas musses ao longo do armazenamento 49
4.3. Parâmetros microbiológicos sanitários 55
4.4. Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* nas diferentes musses frente às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*. 59
4.5. Perfil de textura instrumental 75
4.6. Avaliação sensorial 91
5. CONCLUSÕES 100
6. TRABALHOS RESULTANTES DA TESE DE DOUTORADO 102
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 106

ANEXOS

Anexo 1: Ofício de aprovação do Comitê de Ética. 123
Anexo 2: Modelo da ficha de avaliação sensorial. 125
Anexo 3: Informação nutricional da musse controle T1 126
Anexo 4: Informação nutricional da musse T2 127
Anexo 5: Informação nutricional da musse T3 128
Anexo 6: Informação nutricional da musse T4 129
Anexo 7: Informação nutricional da musse T5 130
Anexo 8: Informação nutricional da musse T6 131
Anexo 9: Informação nutricional da musse T7 132
Anexo 10: Controle do pH – testes *in vitro* nas musses refrigeradas 133
Anexo 11: Controle do pH – testes *in vitro* nas musses congeladas 134
Anexo 12: Trabalho publicado na forma de *Short Communication*. 135
Anexo 13: Ficha do aluno gerada pelo sistema Janus. 139
Anexo 14: Informações para os Membros das Bancas Julgadoras. 143

1. INTRODUÇÃO

1.1 Alimentos funcionais

Com base em evidências científicas demonstradas e em estudos epidemiológicos realizados nas últimas décadas, a alimentação tem sido considerada um dos principais fatores capazes de contribuir para um estilo de vida saudável, podendo reduzir, consideravelmente, os riscos de doenças e promover a saúde (BETORET *et al.*, 2003; NERSTEDT *et al.*, 2007; MILETIĆ *et al.*, 2008; STORY *et al.*, 2008). O papel principal de uma alimentação equilibrada é assegurar uma ingestão adequada de macro e micronutrientes, podendo compreender outros compostos não-nutrientes, permitindo uma atividade eficiente das funções e processos do metabolismo, o que contribuirá para a manutenção da saúde do indivíduo (SCHWAGER *et al.*, 2008).

Esses fatores colaboram para que o desenvolvimento de novos produtos alimentícios seja cada vez mais desafiador, à medida que procura atender aos interesses de setores industriais, de pesquisa e de agências reguladoras e à demanda dos consumidores que procuram por produtos não apenas saudáveis, mas igualmente saborosos e atrativos. Nesse processo, a alimentação de indivíduos com estilo de vida saudável tende a assumir uma atitude prazerosa e que visa a saúde e o bem estar. Todas essas informações permitiram avanços nas ciências dos alimentos e da nutrição, além de criarem um mercado lucrativo para uma série de novos produtos chamados "alimentos funcionais", uma das prioridades de pesquisa da indústria de alimentos (JANER *et al.*, 2004; JONES & JEW, 2007; KOMATSU *et al.*, 2008; SCHWAGER *et al.*, 2008).

A definição do "European Consensus on Scientific Concepts of Functional Foods" propõe que um alimento pode ser considerado funcional se for demonstrado o seu efeito em uma ou mais funções alvo do organismo, além de apresentar características nutricionais adequadas, de modo que seja relevante para a melhoria da saúde e do bem estar e/ou redução dos riscos de doenças (ROBERFROID, 2005a; HENSON *et al.*, 2008). Esse conceito tem recebido ampla aceitação por parte dos consumidores, os quais manifestam um grande interesse sobre as questões de saúde que incluem a alimentação (JONES & JEW, 2007).

De fato, alegações de nutrição e de saúde em alimentos são ferramentas potencialmente poderosas para a comunicação junto ao consumidor (LEATHWOOD *et al.*, 2007; WILLIAMS & GHOSH, 2008).

Para que um alimento seja considerado funcional, ou para que possa utilizar alegações de propriedades funcionais ou de saúde, é necessária uma avaliação detalhada, que garanta o pleno reconhecimento de suas propriedades funcionais pela comunidade científica. Adicionalmente, é necessário que ele se adéqüe à legislação vigente no país onde ele será comercializado (JONG *et al.*, 2007; STRINGHETA *et al.*, 2007). Ainda, os alimentos funcionais devem demonstrar seus efeitos quando consumidos em quantidades comumente encontradas na alimentação normal. Portanto, uma cápsula ou uma pílula não poderá ser considerada alimento funcional (ROBERFROID, 2005a). No Brasil, os alimentos com alegação de propriedade funcional ou de saúde são regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – através das Resoluções 16, 18 e 19 de abril de 1999, devendo ser obrigatoriamente registrados junto ao órgão competente e ser seguros para o consumo sem a supervisão médica (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1999b, 1999c, 1999d, 2008; STRINGHETA *et al.*, 2007; PRADO *et al.*, 2008).

De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação (2006), o mercado mundial de alimentos funcionais apresentou um aumento de US$ 32 bilhões para US$ 60 bilhões entre os anos de 1999 e 2005, com uma taxa de crescimento anual de 11%. No Brasil, segundo a mesma associação, o mercado de alimentos funcionais foi avaliado em US$ 600 milhões no ano de 2005, e junto com o segmento de produtos "diet & light" somaram 6,3% do volume de vendas da indústria brasileira de alimentação.

Dentre os principais fatores que levaram ao apoio e ao aumento do interesse em relação aos alimentos funcionais na última década, merecem destaque: o aumento da expectativa de vida em vários países (nos quais a população necessitará de cuidados hospitalares por maior período de tempo), o elevado custo dos serviços de saúde, os avanços na tecnologia de alimentos e ingredientes, a necessidade de que instituições públicas de pesquisa divulguem os resultados de suas investigações e a maior cobertura dos diferentes tipos de mídia dada a essas descobertas e às questões de saúde (ARVANITOYANNIS & VAN HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, 2005; SARKAR, 2007; VASILJEVIC & SHAH, 2008).

1.2 Fisiologia e microbiologia gastrintestinal: o papel dos probióticos

A manipulação da microbiota intestinal tem sido utilizada como uma estratégia de saúde no auxílio à prevenção de doenças (YAN *et al.*, 2007). O trato gastrintestinal (TGI) é equipado de um complexo sistema que modula a sua resposta aos estímulos dos ambientes interno e externo. Na saúde, os estímulos fisiológicos do intestino induzem reflexos motores que permanecem, na maior parte do tempo, imperceptíveis, exceto aqueles relacionados à ingestão e excreção. A motilidadade do TGI humano executa a propulsão do bolo alimentar ao longo do intestino, misturando este conteúdo às secreções digestivas e expondo-o à superfície absortiva (KELLOW *et al.*, 2006). No cólon, a fermentação do bolo alimentar toma lugar através da ação de enzimas específicas produzidas pela microbiota intestinal sobre determinados substratos, entre os quais os carboidratos são os mais importantes (LOBO *et al.*, 2006). A microbiota é variável nos diferentes segmentos do intestino e é determinada por fatores como a dieta, a genética e o estado fisiológico do hospedeiro (ARICI *et al.*, 2004).

A microbiota saudável é definida como a microbiota normal que conserva e promove o bem estar e a ausência de doenças, especialmente do TGI (ISOLAURI *et al.*, 2004). A microbiota gastrintestinal humana é um complexo ecossistema de, aproximadamente, 300 a 500 espécies bacterianas. No hospedeiro saudável, bactérias entéricas colonizam o TGI logo após o nascimento e a composição da microbiota permanece relativamente constante desde então. Devido à peristalse e aos efeitos do conteúdo gástrico ácido, o estômago e o intestino delgado proximal de indivíduos saudáveis contêm poucas bactérias em comparação a outras regiões do TGI. Bactérias presentes no conteúdo jejunal são geralmente lactobacilos, enterococos, estreptococos orais e outros aeróbios Gram-positivos ou anaeróbios facultativos que refletem a microbiota da orofaringe. Os coliformes excedem a 10^3 unidades formadoras de colônias (UFC)/mL no conteúdo jejunal. A microbiologia do íleo terminal representa a zona de transição entre as espécies aeróbias presentes no jejuno e a densa população de anaeróbios encontrada no cólon. Populações bacterianas podem ser superiores a 10^9 UFC/mL no íleo terminal, imediatamente próximo a válvula ileocecal, com a predominância de

microrganismos Gram-negativos e anaeróbios. Através do cólon, a concentração e a variedade da microbiota entérica se alteram dramaticamente. Concentrações de até 10^{12} UFC/mL podem ser encontradas; compreendendo principalmente anaeróbios como *Bacteroides, Porphyromonas, Bifidobacterium, Lactobacillus* e *Clostridium* (QUIGLEY & QUERA, 2006).

Evidências crescentes sugerem que algumas bactérias comensais aumentam a homeostase no epitelio intestinal e a integridade de barreira. Indubitavelmente, bactérias comensais regulam grande número de processos do hospedeiro, incluindo a nutrição, o desenvolvimento e as respostas imunes que são relevantes na saúde e na doença (YAN *et al.*, 2007). Importantes funções incluem a fermentação de carboidratos não digeríveis, a subseqüente absorção dos produtos fermentados e fornecimento de energia para as células da parede intestinal, provendo até 50% da energia diária requerida pelos colonócitos. Nutrientes e vitaminas como o folato e a vitamina K são produzidos por bactérias entéricas. A relação entre a microbiota não-patogênica e o sistema imune, especialmente o tecido linfóide associado ao intestino (GALT), é importante para a proteção do hospedeiro contra a colonização por patógenos (QUIGLEY & QUERA, 2006; ROBERFROID, 2008a; SOETERS, 2008). Dessa forma, o conhecimento da microbiota intestinal e suas interações levaram ao desenvolvimento de estratégias alimentares objetivando a manutenção e o estímulo das bactérias normais ali presentes (GIBSON & FULLER, 2000).

A microbiota intestinal pode ser modificada temporariamente com o consumo de probióticos ou prebióticos (HAARMAN & KNOL, 2005). Os probióticos têm emergido como o principal fator nutricional capaz de afetar primariamente a fisiologia e as funções do TGI (ARVANITOYANNIS & VAN HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, 2005).

No passado, os probióticos eram definidos como suplementos à base de microrganismos vivos que trazem benefícios a saúde do consumidor, através da manutenção ou melhoria do equilíbrio de sua microbiota intestinal (FULLER, 1989). Esse conceito tem evoluído ao longo dos anos (VASILJEVIC & SHAH, 2008). A definição atualmente aceita refere os probióticos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, afetam positivamente a saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001). Entretanto, microrganismos

administrados vivos têm sido considerados probióticos, independentemente de sua capacidade de sobrevivência ao trânsito intestinal e de sua adesão às células epiteliais, questão ainda bastante discutida pela comunidade científica (REID *et al.*, 2003; DOUGLAS & SANDERS, 2008). Esse debate se deve ao fato de que, em alguns casos, bactérias mortas ou componentes celulares bacterianos poderiam resultar em efeitos fisiológicos. DOUGLAS & SANDERS (2008) recomendam que uma outra definição seja criada e utilizada para esses produtos.

Os microrganismos utilizados como probióticos são geralmente bactérias que compõem a microbiota intestinal humana normal como, por exemplo, lactobacilos e bifidobactérias, que produzem como produtos finais do metabolismo lactato e ácidos graxos de cadeia curta, como acetato e butirato (HAMILTON-MILLER, 2004). O íleo terminal e o cólon parecem ser, respectivamente, o local de preferência para colonização intestinal dos lactobacilos e bifidobactérias (CHARTERIS *et al.*, 1998a; BIELECKA *et al.*, 2002). Outras bactérias, incluindo cepas de *Enterococcus, Bacillus* e *Escherichia* e a levedura *Saccharomyces cerevisae* (boulardii) são também empregadas como probióticos, embora sejam mais freqüentemente encontradas como suplementos e não em produtos alimentícios (DOUGLAS & SANDERS, 2008).

No Brasil, a Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, instituída junto à Câmara Técnica de Alimentos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1999a), tem avaliado os produtos com alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde aprovados no país e revisado as recomendações para tais produtos. A mais recente recomendação para alimentos probióticos foi estabelecida com base na porção diária de microrganismos viáveis que devem ser ingeridos, sendo o mínimo estipulado de 10^8 a 10^9 UFC/dia, podendo ser aceitas concentrações menores, desde que o fabricante comprove a sua eficácia (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008). Segundo a mesma norma, a documentação que comprova a eficácia deve incluir o laudo de análise do produto demonstrando a quantidade mínima viável do microrganismo até o final do prazo de validade, além da realização de teste de resistência da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e aos sais biliares. De fato, já é confirmado que as concentrações probióticas efetivas *in vivo* variam em função da cepa utilizada e do efeito desejado sobre a saúde (CHAMPAGNE *et al.*, 2005). Entretanto, é necessário destacar que

no período em que as recomendações para alimentos probióticos foram revistas pela Comissão, houve um aumento do número de produtos probióticos disponíveis no mercado brasileiro. Dessa forma, também é importante considerar a somatória dos microrganismos viáveis ingeridos nos diversos produtos probióticos consumidos ao longo do dia (KOMATSU *et al.*, 2008).

Aliado à manutenção da viabilidade ao longo do armazenamento e à sobrevivência às condições gastrintestinais, esses microrganismos devem apresentar boas propriedades tecnológicas (BURITI *et al.*, 2005a), sendo esse outro pré-requisito para seu emprego em alimentos, não devendo interferir nas características sensoriais desses produtos (KOMATSU *et al.*, 2008).

Os probióticos já são bastante familiares ao público geral como componentes dos "bioiogurtes" e de suplementos alimentares (HAMILTON-MILLER, 2004). O potencial efeito probiótico atribuído aos produtos lácteos que contém cepas comprovadamente probióticas de *Lactobacillus* tem estimulado importantes pesquisas nos últimos anos (BURITI *et al.*, 2005b; PHILLIPS *et al.*, 2006; ROCHET, *et al.*, 2006; BURITI *et al.*, 2007d; HICKSON *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2008, SMERUD *et al.*, 2008; SOUZA & SAAD, 2009).

1.3 O gênero *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* compreende um vasto grupo de bactérias Gram-positivas, na forma de bastonetes ou cocobacilos, não formadoras de esporos, desprovidas de citocromos, anaeróbias, mas aerotolerantes, ácido-tolerantes e catalase negativas (com algumas exceções). O ácido lático é o seu principal produto final da fermentação de açúcares. O gênero *Lactobacillus* é heterogêneo e contém espécies com 32 a 53% de G+C no conteúdo do DNA cromossomal. É dividido em três grupos, baseado nas diferenças no metabolismo de açúcares, conseqüente à presença ou ausência das enzimas frutose 1,6-difosfato aldolase e fosfocetolase (AXELSSON, 2004; BURITI & SAAD, 2007; VASILJEVIC & SHAH, 2008; WELLS *et al.*, 2008).

De acordo com essa divisão, os lactobacilos são classificados em: 1) obrigatoriamente homofermentativos; 2) facultativamente heterofermentativos; e 3) obrigatoriamente heterofermentativos (AXELSSON, 2004). Vários lactobacilos

obrigatoriamente homofermentativos e facultativamente heterofermentativos e alguns obrigatoriamente heterofermentativos são utilizados em alimentos fermentados. Porém, esse último grupo é comumente associado à deterioração de alimentos (VÁSQUEZ *et al.*, 2005).

Os lactobacilos obrigatoriamente homofermentativos incluem aqueles que fermentam glicose exclusivamente em ácido lático e não fermentam pentoses ou gliconato. Exemplos desse grupo são as espécies *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus delbruekii*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus salivarius*. Os obrigatoriamente heterofermentativos incluem os lactobacilos que fermentam hexoses em ácido lático, ácido acético e/ou etanol e dióxido de carbono, sendo que a produção de gás a partir da glicose é uma característica marcante dessas bactérias. São exemplos desse grupo as espécies *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus reuteri*. Os facultativamente heterofermentativos incluem os lactobacilos que fermentam hexoses em ácido-lático e podem produzir gás a partir de gliconato, mas não através da glicose. Esses microrganismos também fermentam pentoses, através de uma fosfocetolase induzida para produzir ácidos lático e acético. As espécies *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei* e do grupo *Lactobacillus casei* são importantes representantes dos lactobacilos facultativamente heterofermentativos (AXELSSON, 2004; BURITI & SAAD, 2007).

Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus brevis* têm sido as espécies mais comuns a serem isoladas do intestino humano. Cepas probióticas específicas têm sido analisadas e seus efeitos clínicos sobre o tratamento e prevenção de doenças de origem intestinal ou extra-intestinal têm tem sido extensivamente estudados e bem documentados (HAMILTON-MILLER, 2004; SHAH, 2007; VASILJEVIC & SHAH, 2008). Em especial, destaca-se a cepa La-5 de *Lactobacillus acidophilus*, que representa um microrganismo probiótico cujo efeito benéfico é reconhecido cientificamente (JUNTUNEN *et al.*, 2001; JAIN *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2004). Entretanto, deve ser salientado que o efeito de uma bactéria é específico para cada cepa, não podendo ser extrapolado, inclusive para outras cepas da mesma espécie (GUARNER & MALAGELADA, 2003; VASILJEVIC & SHAH, 2008).

1.4 Proteínas do soro de leite: ingrediente funcional em alimentos e agente protetor para os probióticos *in vivo*

De acordo com a sexta revisão da nomenclatura para as proteínas do leite (FARRELL *et al.*, 2004), as proteínas do soro são descritas como o grupo de proteínas do leite que permanece solúvel após a precipitação das caseínas em pH = 4,6 e a 20°C e somam, aproximadamente, 20% do total das proteínas lácteas (SINDAYIKENGERA & XIA, 2006; DUNKER *et al.*, 2008). As proteínas β-lactoglobulina (ca. 35-55% do total de proteínas do soro), α-lactoalbumina (ca. 12 a 24%), soroalbumina (ca. 5%), imunoglobulinas (ca. 8 a 15%) e frações proteose-peptona (ca. 12%) são os principais componentes do soro lácteo (FARRELL *et al.*, 2004; SURH *et al.*, 2006; KRISSANSEN, 2007). Em menor proporção, o soro lácteo ainda é composto das proteínas lactoferrina, lactoperoxidase, β-microglobulina, lisozima, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e γ-globulinas (LUHOVYY *et al.*, 2007).

Do ponto de vista nutricional, as proteínas do soro de leite têm sido consideradas superiores à caseína, devido ao perfil de aminoácidos ser similar ao do leite humano e à evidência de maior digestão e absorção das proteínas do soro, quando comparada às caseínas (SINDAYIKENGERA & XIA, 2006). De modo complementar, praticamente todas as proteínas do soro podem gerar efeitos funcionais por resultarem em peptídeos bioativos durante a digestão ao longo do TGI, pela ação de proteases digestivas ou microbianas, ou ainda, pela ação de proteases do próprio leite ou de enzimas de culturas *starter*. Esses peptídeos derivados do soro estão associados à modulação de várias funções fisiológicas, como pressão sanguínea, processos inflamatórios, respostas glicêmica e insulinêmica, fome e saciedade. Esses efeitos também são atribuídos a sinergismos entre as proteínas do soro e outros constituintes lácteos, como o cálcio, por exemplo (LUHOVYY *et al.*, 2007). As proteínas do soro de leite também estão associadas ao estímulo do sistema imunológico, pelo aumento da produção de anticorpos contra antígenos específicos e pela maturação de linfócitos envolvidos nas respostas imunes inata e de mucosa (RUTHERFURD-MARKWICK *et al.*, 2005; PÉREZ-CANO *et al.*, 2007).

Os ingredientes alimentícios derivados das proteínas do soro são comumente classificados como "concentrados", se o seu conteúdo protéico total estiver entre 25 e 80% de proteína, ou como "isolados", quando o teor protéico for superior a 90%. No entanto, existe uma variação inerente na composição protéica do leite empregado na produção de ingredientes protéicos derivados do soro. A proporção relativa de diferentes proteínas de soro isoladas do leite também depende dos processos de fracionamento e industrialização empregados. Conseqüentemente, a proporção entre as diferentes proteínas do soro pode variar nesses ingredientes (SURH *et al.*, 2006).

Além de apresentar elevado valor nutricional e funcional, os concentrados protéicos do soro de leite (WPCs) são empregados nas indústrias de alimentos devido a suas propriedades tecnológicas, atuando como agentes gelificantes, emulsificantes, estabilizantes, modificadores de textura, espessantes e/ou agentes de aeração (GOKAVI *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2005; HERCEG *et al.*, 2007). As proteínas do soro de leite facilitam a formação de pequenas gotículas lipídicas durante a homogeneização de alguns tipos de alimentos, como sobremesas geladas, sorvetes e outras emulsões de base láctea pela redução da tensão interfacial, aumentando, então, a estabilidade das gotículas formadas através do aumento das interações coloidais repulsivas entre elas (SURH *et al.*, 2006). As principais propriedades do WPC como ingrediente em alimentos são a solubilidade, a viscosidade e as capacidades de gelificação, adesão, emulsificação e aeração (EMAM-DJOME *et al.*, 2008). Dessa forma, os WPCs são empregados como substitutos de gordura e, por apresentarem alta capacidade de retenção de água, colaboram para a manutenção da umidade ao longo do armazenamento de produtos com teor lipídico reduzido (LOBATO-CALLEROS *et al.*, 2007).

Em alimentos contendo culturas probióticas, os WPCs contribuem para a manutenção da viabilidade desses microrganismos devido às proteínas e fosfatos presentes, que aumentam a capacidade tamponante do meio (ANTUNES *et al.*, 2005). Os WPCs também podem ser hidrolisados enzimaticamente pelos probióticos para o seu melhor aproveitamento. Nesse processo, são produzidos fatores de crescimento, peptídeos e aminoácidos necessários para a sobrevivência e multiplicação dessas bactérias (AKALIN *et al.*, 2007).

Tendo em vista o seu poder tamponante, os WPCs também podem funcionar como um agente protetor para os probióticos *in vivo*. KOS *et al.* (2000)

verificaram que a sobrevivência de *L. acidophilus* M92, exposto ao suco gástrico simulado (pH = 2) por 4 h, foi melhor na presença de WPC em comparação a outros ingredientes, como a caseína, o leite desnatado e a mucina, concluindo que o WPC exerceu um efeito protetor sobre o *L. acidophilus*. Os autores observaram, ainda, que o número de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* manteve-se entre 10^5 e 10^6 UFC/mL com a adição de WPC após 4 h de incubação no suco simulado do intestino delgado com 3,0 mg/mL de Oxgall. Adicionalmente, os autores verificaram que a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* durante a passagem seqüencial aos sucos gástrico e entérico simulados no controle foi de 15%, aumentando para 45% na presença de WPC, sugerindo que a adição WPC a um alimento com o microrganismo probiótico pode aumentar a tolerância deste às condições gastrintestinais.

1.5 Prebióticos – definição e efeitos fisiológicos

Complementarmente ao consumo de probióticos, uma outra maneira de se promover o aumento da população de bactérias benéficas da microbiota intestinal, como as bifidobactérias, é através da ingestão de prebióticos (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002; BURITI *et al.*, 2007a,b). Esse conceito foi introduzido por GIBSON & ROBERFROID (1995) e revisto posteriormente por GIBSON *et al.* (2004), os quais se referem a um prebiótico como um ingrediente seletivamente fermentado que permite alterações específicas, tanto na composição, como na atividade da microbiota gastrintestinal, que confere benefícios sobre a saúde e o bem-estar do hospedeiro. Tal definição é considerada a mais completa atualmente (ROBERFROID, 2008b).

Um prebiótico corresponde a um nutriente restrito ao cólon, contendo substâncias químicas resistentes aos processos digestivos no trato gastrintestinal superior, geralmente oligossacarídeos e polissacarídeos, que atuam como substratos específicos para as bactérias probióticas intrínsecas do hospedeiro e estimulam a sua multiplicação, modificando, conseqüentemente, a composição da microbiota intestinal (HAMILTON-MILLER, 2004; ROBERFOID, 2008a,b). Embora os prebióticos atuem especificamente no intestino grosso, também podem resultar em algum impacto nos microrganismos do intestino delgado (GILLILAND, 2001). Os

prebióticos não são metabolizados pela microbiota não-probiótica do intestino, não promovendo potenciais patógenos, como clostrídios produtores de toxinas, bacteróides proteolíticos e *Escherichia coli* toxigênica, por exemplo. Desse modo, a composição de uma microbiota saudável é obtida quando bifidobactérias e lactobacilos tornam-se predominantes no intestino, exercendo seus potenciais efeitos benéficos à saúde (HAMILTON-MILLER, 2004; MANNING & GIBSON, 2004).

Considerando todos os fatores já mencionados, foram estabelecidos os seguintes critérios para que um componente ou ingrediente alimentar seja classificado como prebiótico: resistir à acidez gástrica e à hidrólise pelas enzimas gastrintestinais de mamíferos, não ser absorvido no TGI superior; ser fermentado pela microbiota intestinal; estimular seletivamente a multiplicação e/ou atividade de bactérias intestinais potencialmente associadas à saúde e ao bem estar (MANNING & GIBSON, 2004; ROBERFOID, 2008b). Outros efeitos também estão associados à otimização da função e metabolismo do cólon: potencial para reprimir patógenos por processos como a atenuação da virulência e estimulação da microbiota benéfica que promove a resistência à colonização por patógenos; aumento da produção ou alteração da composição dos ácidos graxos de cadeia curta; aumento da massa fecal; ligeira redução do pH luminal do cólon; diminuição dos produtos finais do metabolismo do nitrogênio e de enzimas redutoras; aumento da expressão de proteínas ligantes ou carreadores ativos responsáveis pela absorção mineral; modulação do sistema imune (KLAENHAMMER, 2001; GIBSON *et al.*, 2004; DOUGLAS & SANDERS, 2008). Evidências da contribuição dos prebióticos na modulação do metabolismo lipídico e da ingestão alimentar, assim como na prevenção e/ou auxílio no tratamento de doenças inflamatórias intestinais e do câncer de cólon já foram demonstradas (ROBERFROID, 2005a; ASAD *et al.*, 2008; CANI *et al.*, 2008; DELZENNE & NEYRINCK, 2008; GUARNER, 2008; KLINDER *et al.*, 2008).

Até o presente momento, vários ingredientes alimentares têm sido propostos como potenciais prebióticos. Entretanto, evidências científicas para o cumprimento dos pré-requisitos necessários para atender a essa classificação só existem para quatro ingredientes e são eles: inulina e oligofrutose, lactulose e trans-galactooligossacarídeos (TOS) (ROBERFROID, 2008b). Dentre eles, os frutanos inulina e oligofrutose têm recebido grande atenção e a maior investigação ao longo dos anos (ROBERFROID *et al.*, 1998; FOOKS *et al.*, 1999; GILLILAND,

2001; KOLIDA *et al.*, 2002; ROBERFROID, 2005a; CARDARELLI *et al.*, 2007), sendo atualmente considerados como prebióticos modelo (ROBERFROID, 2008b).

1.6 Frutanos - inulina e oligofrutose

Frutanos são carboidratos de reserva formados por oligômeros e/ou polímeros de D-frutose, cujas moléculas estão unidas entre si através de ligações frutosil-frutose, geralmente ligados a uma unidade terminal de glicose. Esses carboidratos estão naturalmente presentes em várias espécies vegetais, como alho, cebola, banana, tomate, alcachofra de Jerusalém, alho-poró, raízes do aspargo e da chicória, tubérculo da dália e yacon (CÉRANTOLA *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2006; ITAYA *et al.*, 2007; KOLIDA & GIBSON, 2008). Frutanos tipo inulina e/ou inulina são termos genéricos utilizados para todos os frutanos lineares que apresentam ligação frutosil-frutose β-(1←2) entre suas moléculas (ROBERFROID, 2008b).

A inulina comercial é produzida, principalmente, a partir da chicória através de extração com água quente, e é composta, na sua forma nativa, por uma combinação de polímeros de frutose, cujo grau de polimerização (GP) varia entre 2 e 60, com GP médio de 12. A oligofrutose, frutano de cadeia curta com GP entre 2 e 10, pode ser produzida através de hidrólise enzimática parcial da inulina (MURPHY, 2001; KAUR & GUPTA, 2002; KOLIDA & GIBSON, 2008). Os termos oligofrutose e frutooligossacarídeos (FOS) são considerados sinônimos para todos os oligômeros lineares de frutanos unidos por ligações β-(1←2) com GP inferior a 10 (ROBERFROID, 2005b; 2007).

A inulina e a oligofrutose são denominadas prebióticos, uma vez que a resistência desses ingredientes à acidez do estômago e a hidrólise pelas enzimas do TGI humano, com a conseqüente multiplicação seletiva pela microbiota do cólon, resultando em uma série de efeitos benéficos ao hospedeiro, têm sido extensamente demonstrada em estudos ao longo de vários anos (DELZENNE & ROBERFROID, 1994; GIBSON, *et al.*, 1995; NINESS, 1999; ROBERFROID, 1999a; 2008b). As bifidobactérias podem hidrolisar esses frutanos e utilizá-los como fonte de energia para promover a sua multiplicação. Estudos têm demonstrado que os frutanos, através de seus efeitos gastrintestinais, podem

afetar indiretamente a função imunológica e o metabolismo de carboidratos, lipídios e minerais. Essas fibras solúveis são fermentadas pelas bactérias presentes no intestino grosso. A produção de lactato e de ácidos graxos de cadeia curta (ácidos acético, propiônico e butírico), que são importantes para o metabolismo lipídico do hospedeiro, são o resultado de um aumento da atividade metabólica da microbiota intestinal (GILLILAND, 2001; ROBERFROID, 2002; LOBO *et al.*, 2007). Esses ingredientes prebióticos podem ser utilizados em combinação com probióticos, adicionados à alimentação do hospedeiro para promover a saúde, aumentando a sobrevivência, multiplicação e implantação desses microrganismos (NINESS, 1999; SU *et al.*, 2007).

Alterações positivas na composição da microbiota intestinal, que incluem desde o aumento da população de bifidobactérias até a redução de bacteróides, fusobactérias e clostrídios, foram demonstradas em estudos em humanos com doses entre 4 e 20 g por dia de inulina e/ou oligofrutose, geralmente com a administração durante um período de, pelo menos, 2 semanas (ROBERFROID, 2005b). Considerando apenas o efeito bifidogênico, doses a partir de 4 a 5 g de frutanos por dia já seriam eficientes (RAO, 2001; ROBERFROID, 1999a; 2005b). No Brasil, a alegação de propriedade funcional para alimentos contendo frutanos é permitida desde que a porção do produto pronto para consumo forneça no mínimo 3 g de inulina e/ou FOS se o alimento for sólido ou 1,5 g se o alimento for líquido (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008).

Além da estimulação de bifidobactérias, a inulina e a oligofrutose estão associadas a um aumento da freqüência de evacuações e volume fecal em pacientes constipados, à diminuição dos níveis séricos de triglicérides e colesterol em pacientes hiperlipidêmicos e hipercolesterolêmicos, ao aumento da absorção de magnésio em mulheres pós-menopausa, ao aumento da absorção e deposição de cálcio em humanos e, conseqüentemente, à possível prevenção da osteoporose (NINESS, 1999; GREGER, 1999; ROBERFROID, 2005b; DELZENNE & NEYRINCK, 2008; HAWTHORNE & ABRAMS, 2008).

Por serem solúveis em água e não digeríveis pelas enzimas dos mamíferos, a inulina e a oligofrutose podem causar também um ligeiro aumento no volume e algum aumento no peso seco do conteúdo do intestino delgado. Por sua dispersibilidade em água, a inulina e a oligofrutose podem ser prontamente degradadas pelas bifidobactérias presentes no intestino

grosso (SCHNEEMAN, 1999). Decorrente da degradação microbiana, a inulina e a oligofrutose, assim como todos os oligossacarídeos não digeríveis que são parcialmente ou completamente fermentados no cólon, oferecem o valor calórico de 1,5 kcal/g, ou 6,3 kJ/g (ROBERFROID, 1999b; 2005b).

Em razão do acúmulo das evidências científicas sobre as propriedades fisiológicas dos frutanos, tanto a inulina como a oligofrutose têm sido comercializadas e utilizadas nos mais diversos produtos alimentícios pelas indústrias de alimentos (ROBERFROID, 2005b).

A oligofrutose é uma fibra bastante solúvel, sendo comercializada tanto na forma de xaropes viscosos (contendo 75% de sólidos totais) como em pó (com até 95% de pureza). Na sua forma pura, a oligofrutose apresenta um dulçor de 30 a 35% comparado à sacarose, combinando-se muito bem com aromas delicados e edulcorantes, podendo reduzir o sabor residual destes últimos (FRANCK, 2008).

A inulina da chicória é disponível comercialmente em pó inodoro, incolor e de sabor neutro, com alto grau de pureza (superior a 90%). Este produto apresenta moderada solubilidade em água, máxima de 10% em temperatura ambiente para inulina com GP próximo de 10. Devido ao seu maior tamanho de cadeia em comparação à oligofrutose, a inulina liga-se fortemente a água, formando um gel que oferece uma estrutura cremosa, sendo bastante utilizada como agente estabilizante e de textura em alimentos (GOKAVI *et al.*, 2005; FRANCK, 2008).

1.7 Efeitos sinérgicos de prebióticos e probióticos e os alimentos simbióticos

Uma outra possibilidade de manipulação da microbiota intestinal é a administração simultânea de um probiótico e um prebiótico (LIONG, 2008). Dessa forma, prebióticos podem ser adicionados a alimentos industrializados e serem combinados com probióticos para a produção de um alimento simbiótico (HAMILTON-MILLER, 2004). Estas combinações podem apresentar efeitos sinérgicos, em que os benefícios são maiores comparados ao consumo apenas do probiótico (NINESS, 1999; GEIER *et al.*, 2007). Assim, a ingestão de probióticos e prebióticos selecionados apropriadamente em um alimento simbiótico pode ampliar os efeitos benéficos que cada um deles apresentaria de forma isolada e direcioná-los às diferentes regiões "alvo" do TGI, os intestinos

delgado e grosso (BIELECKA *et al.*, 2002; HOLZAPFEL & SCHILLINGER, 2002; VASILJEVIC & SHAH, 2008).

Recentes evidências têm sugerido que os prebióticos podem auxiliar a sobrevivência das cepas probióticas durante o consumo, aumentando assim a sua eficácia *in vivo* (SU *et al.*, 2007). O prebiótico também pode aumentar a multiplicação, a colonização ou a atividade das espécies probióticas ingeridas (GEIER *et al.*, 2007). A interação entre o probiótico e o prebiótico *in vivo* pode, inclusive, ser favorecida por uma adaptação do probiótico ao substrato prebiótico na matriz alimentícia anterior ao consumo. Isto pode, em alguns casos, resultar em uma vantagem competitiva para o probiótico sobre as espécies endógenas do hospedeiro, se ele for consumido juntamente com o prebiótico (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002; MACFARLANE *et al.*, 2008). Dessa forma, a identificação de um prebiótico que confere estes efeitos sinérgicos com um probiótico é, portanto, de elevado interesse comercial para a indústria de alimentos (SU *et al.*, 2007).

1.8 Musse como alimento funcional simbiótico

A musse destaca-se como um alimento produzido em escala industrial que tem conquistado e aumentado o mercado de sobremesas, particularmente em função dos consumidores interessados em alimentos mais saudáveis (VILLAROEL *et al.*, 2006; ARAGON-ALEGRO *et al.*, 2007; BURITI *et al.*, 2007c). Paralelamente, o mercado de alimentos congelados inovadores encontra-se em estado de expansão contínua, como demonstrado pela enorme variedade de novos produtos lançados a cada ano (EL-NAGAR *et al.*, 2002; GOFF & GRIFFITHS, 2006). Devido ao processo envolvido, uma grande quantidade de musse industrial tem sido fabricada pelos produtores de sorvete que, dessa forma, alcançam uma excelente oportunidade de utilizar sua planta de processamento com maior intensidade, particularmente fora da estação de alta do consumo de sorvete. Assim sendo, a musse supre a indústria de sorvete com uma maior diversidade de produtos (ANDREASEN & NIELSEN, 1998).

Musse é um termo derivado da palavra *mousse*, de origem francesa, que significa aerado ou espumoso (IMRAM, 1999). Dentre os diferentes tipos de

musse existentes no mercado, destaca-se a musse láctea. A musse láctea é definida como uma sobremesa aerada com uma estrutura de espuma estabilizada (ANDREASEN & NIELSEN, 1998). A incorporação de ar pode ser obtida por vários métodos e a espuma varia de aberta a fechada, dependendo do teor lipídico da formulação, com um equilíbrio da distribuição das células de ar nesse produto (ANDREASEN & NIELSEN, 1998; IMRAM, 1999; ARAGON-ALEGRO *et al.*, 2007). Quanto maior o teor de gordura da formulação, mais aberta será a estrutura da espuma formada (IMRAM, 1999). A produção industrial de musse láctea é delicada e requer um conhecimento sobre a formação e a estabilização da espuma, o emprego adequado de estabilizantes e emulsificantes, além da interação e interferência de parâmetros de processamento nas propriedades do produto resultante (ARAGON-ALEGRO *et al.*, 2007; CARDARELLI *et al.*, 2008a). As propriedades sensoriais dessa sobremesa, bem como a sua estabilidade durante o armazenamento, dependem dessa estrutura de espuma formada e da distribuição e tamanho das células de ar (MÜLLER-FISCHER & WINDHAB, 2005).

Cremes aerados tipo musse também podem ser empregados como cobertura de outras sobremesas, como massas e bolos e, em alguns casos, podem ser comercializados na forma congelada (IMRAM, 1999; CAMACHO *et al.*, 2001). O congelamento conserva os alimentos pela paralisação da atividade metabólica de microrganismos deteriorantes. Os alimentos congelados possuem excelente histórico de segurança, sendo raras as doenças associadas a esses produtos (ARCHER, 2004). No entanto, o congelamento em cremes aerados provoca uma diminuição da lamela entre as bolhas de ar, devido à crioconcentração durante a formação do gelo, que afeta diretamente a estabilidade da emulsão. Danos mecânicos provocados pelos cristais de gelo, especialmente nos filmes das bolhas de ar, podem ser consideráveis, assim como aqueles promovidos pelo aumento do grau de cristalização do leite, especialmente na membrana do glóbulo de gordura (CAMACHO *et al.*, 2001).

Em complementação aos benefícios à saúde atribuídos ao consumo de produtos contendo prebióticos, a inulina tem sido empregada como substituto de gordura, uma vez que está relacionada à melhoria na estrutura e textura de produtos alimentícios, além de exercer efeito crioprotetor em produtos congelados, como os sorvetes, por exemplo, reduzindo a formação de cristais de gelo conseqüente do abuso térmico durante o armazenamento (SCHALLER-

POVOLNY & SMITH, 1999; EL-NAGAR et al., 2002; FRANCK, 2008). Resultados semelhantes também foram obtidos com a utilização de WPC nos mesmos tipos de produtos, além da melhoria da capacidade de aeração (RUGER *et al.*, 2002). Sobremesas lácteas congeladas, em particular, possuem potencial para o desenvolvimento de produtos com baixo teor de gordura e, conseqüentemente, podem resultar em um aumento nas vendas desse segmento do mercado (OLSON *et al.*, 2003).

Estudos realizados com sorvete têm apontado a possibilidade de emprego de culturas probióticas em produtos congelados, nos quais os níveis mínimos exigidos de bactérias viáveis para efeito benéfico *in vivo* foram assegurados (HEKMAT & McMAHON, 1992; DAVIDSON *et al.*, 2000; ALAMPRESE *et al.*, 2002; AKIN *et al.*, 2007; MAGARIÑOS *et al.*, 2007).

No entanto, além da morte do microrganismo, outros danos às células microbianas podem ser causados através do congelamento e o descongelamento, que incluem a inibição do seu desenvolvimento e a redução ou inibição da sua atividade metabólica (ALAMPRESE *et al.*, 2002). Alterações da permeabilidade de membrana e desidratação celular provocada pela formação de gelo são possíveis causas de inativação microbiana durante o congelamento (HONG & MARSHALL, 2001). Durante o armazenamento, as mortes celulares ocorrem porque o teor de água do produto não foi completamente congelado e soluções residuais altamente concentradas ainda estão presentes. A composição e a concentração desta solução podem alterar ao longo do armazenamento e os cristais de gelo podem aumentar em tamanho, especialmente devido às flutuações de temperatura. Os microrganismos que são melhor preparados para sobreviver ao congelamento e a essas variações são aqueles que podem se desidratar mais rapidamente. Essas células são aptas a reduzir o número de cristais de gelo intracelular, o que evita o rompimento de suas membranas citoplasmáticas (MAGARIÑOS *et al.*, 2007).

No Brasil, a denominação "gelados comestíveis" é utilizada para definir os "produtos congelados obtidos a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas; ou de uma mistura de água e açúcar(es). Podem ser de adicionados de outro(s) ingrediente(s) desde que não descaracterize(m) o produto" (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2005).

Alguns estudos foram conduzidos no Brasil, visando o desenvolvimento de sobremesas lácteas aeradas contendo ingredientes funcionais e/ou para fins

dietéticos. DYMINSKI *et al.* (2000) desenvolveram musse de maracujá com teor reduzido de gordura, empregando diferentes combinações de polidextrose (Litesse®), proteína láctea (Dairy Lo™) e proteína microparticulada (Simplesse®). No referido trabalho, a formulação elaborada com a proteína microparticulada obteve resultados mais próximos ao da formulação controle, no qual a gordura não foi substituída. Em outro trabalho também conduzido no Brasil, PINTO *et al.* (2003) verificaram boa aceitação sensorial de sobremesas lácteas tipo musse nas versões tradicional e *light*, com a adição de açúcar e sucralose, respectivamente. Um estudo conduzido no Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, FCF-USP, realizado por ARAGON-ALEGRO *et al.* (2007) e que foi divulgado pela imprensa especializada em ingredientes funcionais para a indústria de alimentos (DANIELLS, 2007), mostrou que a cepa potencialmente probiótica de *Lactobacillus paracasei* apresentou excelente viabilidade em musse de chocolate com ou sem a adição da fibra prebiótica inulina. Também foi verificado que, embora o microrganismo probiótico e a fibra inulina tenham resultado em modificações nos parâmetros de textura instrumental (firmeza e adesividade) e nas características sensoriais (cor, aroma, sabor, textura e firmeza), esses resultados não interferiram na preferência sensorial do produto, quando comparado à musse controle, sem a adição daqueles componentes (ARAGON-ALEGRO *et al.*, 2007; CARDARELLI *et al.*, 2008a).

Assim sendo, com o intuito de se verificar a viabilidade de obtenção de uma sobremesa aerada simbiótica, para fins de refrigeração e congelamento, é necessário que se observe a sobrevivência do probiótico, bem como as características do produto nas duas condições de armazenamento. Complementarmente, a fim de verificar o potencial probiótico e prebiótico do produto nas diferentes condições de armazenamento, é necessário avaliar se essas bactérias ainda são capazes de resistir às diferentes condições do TGI, para obter boas perspectivas quanto ao potencial probiótico desse produto *in vivo*. O emprego dos prebióticos oligofrutose e inulina, esta última atuando como substituto de gordura e podendo conferir efeito crioprotetor aos produtos congelados, poderá resultar em uma musse simbiótica em potencial. O emprego de WPC auxiliaria na manutenção das quantidades adequadas do microrganismo ao longo do armazenamento e durante a sua passagem pelo TGI, aumentando sua tolerância às condições adversas do estômago e do intestino delgado, além

de também atuar como substituto de gordura e possibilitar a melhoria da capacidade de aeração das musses. Dessa maneira, haveria a possibilidade de obtenção de um alimento funcional com baixo teor de gordura, que também pudesse ser armazenado sob congelamento, com a probabilidade de favorecer a administração de uma população razoável de bactérias probióticas para atuarem no intestino delgado do indivíduo e, ao mesmo tempo, o estímulo da multiplicação de bifidobactérias endógenas no cólon.

Nos ensaios preliminares no presente trabalho, a sobremesa aerada foi preparada com suco concentrado de maracujá (*Passiflora edulis* forma *flavicarpa*). Entretanto, a musse produzida a partir de suco concentrado de maracujá não mostrou bons resultados nos experimentos iniciais realizados, uma vez que a viabilidade da bactéria probiótica manteve-se reduzida no produto refrigerado. Diante deste fato, a produção da musse passou a ser realizada com polpa congelada pasteurizada de goiaba (*Psidium guajava*), ingrediente este isento de conservantes e com pH ligeiramente mais elevado que o do suco concentrado de maracujá, o que diminui algumas das condições desfavoráveis à viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* na musse.

A goiaba, dentre as frutas tropicais brasileiras, ocupa lugar de destaque, não só pelo seu aroma e sabor, como também pelo seu valor nutricional, colocando o Brasil na posição de maior produtor mundial de goiabas-vermelhas (ZIETEMANN & ROBERTO, 2007). A goiaba *in natura* apresenta elevado teor de vitamina C, carotenóides (dentre eles o licopeno), fibra alimentar e compostos fenólicos (MERCADANTE *et al.*, 1999; JIMÉNEZ-ESCRIG *et al.*, 2001; QUEIROZ *et al.*, 2008). O potencial antioxidante deste fruto *in natura* e na forma de polpas comerciais congeladas tem sido estudado por vários autores (JIMÉNEZ-ESCRIG *et al.*, 2001; HASSIMOTTO *et al.* 2005; KUSKOSKI *et al.*, 2006; MAHATTANATAWEE, *et al.*, 2006).

Os resultados preliminares deste trabalho, comparando as musses inicialmente produzidas com suco concentrado e polpa de maracujá e posteriormente com polpa de goiaba, foram publicados na forma de *Short Communication* (BURITI *et al.*, 2007c), que se encontra em anexo ao final da tese.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

- Desenvolver uma musse simbiótica com baixo teor de gordura, processada com a adição da cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus* La-5 e dos ingredientes prebióticos oligofrutose (FOS) e inulina;
- Comparar os efeitos da refrigeração e do congelamento sobre as características tecnológicas do produto obtido com a adição de diferentes concentrações de inulina, concentrado protéico de soro (WPC) e gordura láctea, ao longo de seu armazenamento e estabelecer a proporção mais adequada desses ingredientes nas duas temperaturas de armazenamento;
- Verificar a resistência *in vitro* do probiótico nos produtos mantidos refrigerados e congelados frente às condições gástrica e entérica simuladas e avaliar os efeitos da adição de inulina e WPC sobre essa resistência.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

O presente trabalho compreendeu ensaios distintos, no sentido de avaliar os fatores inulina, WPC e gordura láctea, adicionados durante a fabricação das musses, em diferentes proporções, mas sempre totalizando 4% do total das formulações, utilizando-se o delineamento experimental para misturas de três fatores e um ponto central (BARROS NETO *et al.*, 2007), conforme apresentado na **tabela 1**. O tratamento 1 (T1) representa a musse controle (sem a adição de inulina e/ou WPC).

Tabela 1: Principais ingredientes utilizados na elaboração das musses, incluindo o delineamento para mistura para três fatores e um ponto central.

Musses	Proporção de cada ingrediente na mistura	Quantidades de cada ingrediente (g) em 100 g de musse				
	(x_1, x_2, x_3)	Gordura láctea[1] (x_1)	Inulina[2] (x_2)	WPC[3] (x_3)	FOS[4]	*Lactobacillus acidophilus*[5]
T1 - controle	(1, 0, 0)	4	0	0	6	0,05
T2	(0, 1, 0)	0	4	0	6	0,05
T3	(0, 0, 1)	0	0	4	6	0,05
T4	(½,½, 0)	2	2	0	6	0,05
T5	(½, 0, ½)	2	0	2	6	0,05
T6	(0, ½, ½)	0	2	2	6	0,05
T7	(⅓, ⅓, ⅓)	1,33	1,33	1,33	6	0,05

[1] Gordura láctea presente em creme de leite integral Nestlé (25% de lipídeos); [2] Inulina Beneo® HP-Gel (Orafti); [3] Concentrado protéico de soro de leite WPC 80 (Kienast & Kratschmer), 80% de proteína; [4] Oligofrutose Beneo® P95 (Orafti); [5] Cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus* La-5 (Christian Hansen).

3.2 Fabricação das musses T1 a T7

As proporções de ingredientes utilizadas para a produção dos 7 tratamentos realizados estão descritas na **tabela 2**.

A cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus* (cepa La-5, Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca) consiste de uma cultura liofilizada do tipo DVS ('direct vat set' - para a adição direta ao leite durante a elaboração do produto), tendo sido armazenada sob congelamento. O leite desnatado UHT comercial (Paulista – Divisão de Beneficiamento da Danone, Guaratinguetá, Brasil) foi utilizado para padronizar a quantidade final da mistura de ingredientes para a produção das musses, totalizando 4 kg (exceto para as produções das análises sensoriais em que foram preparados 6 kg), e também para compensar o conteúdo não lipídico fornecido pelo creme de leite nas musses em que esse ingrediente foi substituído (**tabela 2**). O teor de sólidos da mistura utilizada em todos os tratamentos de musse foi padronizado, utilizando-se leite em pó desnatado (Molico, Nestlé Brasil, Araçatuba, Brasil). O leite em pó desnatado, o prebiótico FOS (Beneo® P95, Orafti, Oreye, Bélgica) e o WPC (WPC 80, Kienast & Kratschmer, Santo André, Brasil) foram previamente dissolvidos no leite desnatado no dia anterior à elaboração do produto, no sentido de viabilizar uma melhor dissolução desses ingredientes. Essa pré-mistura resultante foi mantida sob refrigeração a 4°C até o momento da mistura com os demais ingredientes. Uma porção de 40 mL da pré-mistura foi esterilizada e utilizada para a

fermentação da cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus*. A quantidade de cultura probiótica foi de 0,5g /kg de musse; o tempo e a temperatura de reativação da cultura foram de 150 minutos a 37°C.

Tabela 2: Proporção dos ingredientes utilizados na produção das musses estudadas e teor de sólidos dos diferentes produtos obtidos calculados a partir da rotulagem nutricional de cada um dos ingredientes.

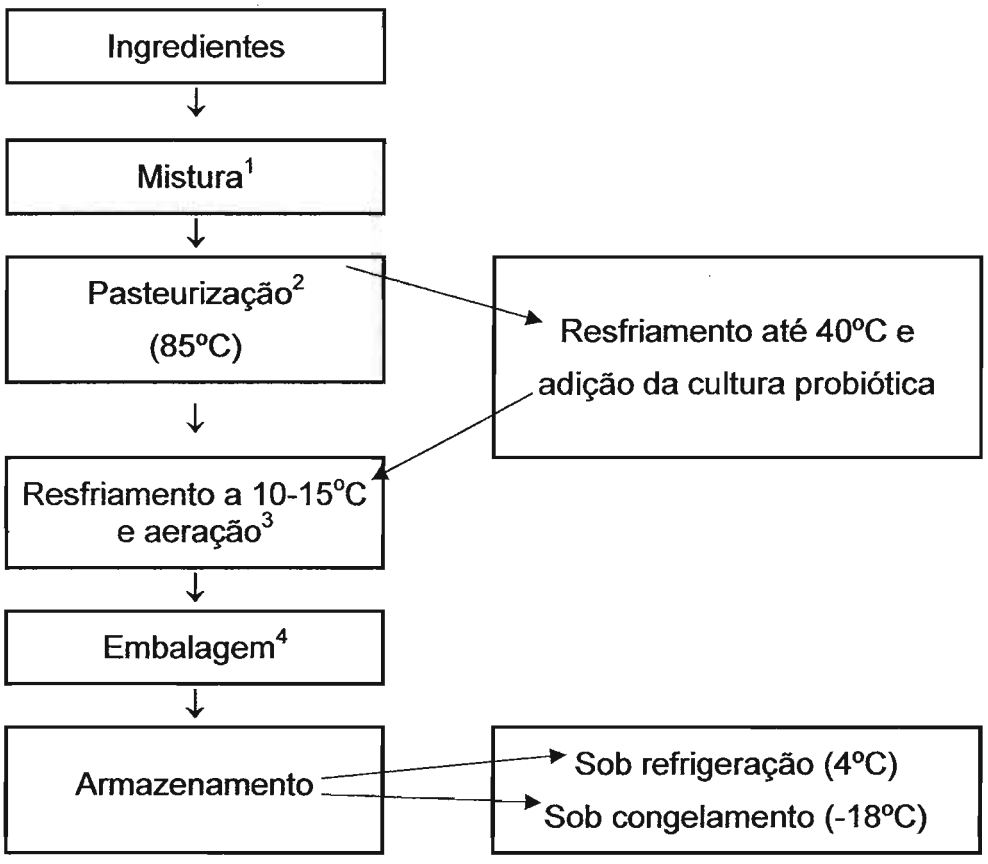
	Musses						
Ingredientes (%)	**T1***	**T2**	**T3**	**T4**	**T5**	**T6**	**T7**
Leite desnatado[1]	47,25	59,25	59,25	53,25	53,25	59,25	55,25
Creme de leite (25% de gordura)[2]	16,0	0	0	8,0	8,0	0	5,33
Inulina[3]	0	4,0	0	2,0	0	2,0	1,33
WPC[4]	0	0	4,0	0	2,0	2,0	1,33
FOS[5]	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Leite em pó desnatado[6]	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Polpa congelada de goiaba pasteurizada[7]	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Sacarose[8]	11,0	11,0	11,0	11,0	11,0	11,0	11,0
Emulsificante/ Estabilizante[9]	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8
Ácido lático alimentício[10]	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Lactobacillus acidophilus[11]	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Teor de sólidos	35,1	35,1	35,1	35,1	35,1	35,1	35,1
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

* Musse controle.
[1] Leite desnatado UHT Paulista (Danone); [2] Nestlé (Nestlé Brasil); [3] Beneo® HP-Gel (Orafti); [4] WPC 80 (Kienast & Kratschmer); [5] Beneo® P95 (Orafti); [6] Molico (Nestlé Brasil); [7] Icefruit-Maisa (Ibisa Agroindustrial); [8] Açúcar União (Coopersucar União); [9] Composto a base de gelatina, açúcar, mono e diglicerídeos de ácidos graxos Cremodan® Mousse (Danisco); [10] Purac (Purac Sínteses); [11] Cultura liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* do tipo DVS (La-5, Christian Hansen).

Os ingredientes listados na **tabela 2**, exceto a porção de leite fermentado com a cultura probiótica, foram misturados até completa uniformização da massa em misturador Geiger UMMSK-12 (Geiger, Pinhais, Brasil). A massa obtida foi aquecida durante aproximadamente 10 minutos, até atingir a temperatura de 85°C, finalizando a etapa de pasteurização. Na próxima etapa, a temperatura da massa foi reduzida a 40°C, em banho com gelo, para mistura, quando foi adicionada a porção de leite fermentado com o cultivo da cultura probiótica. A seguir, a massa foi mantida em banho com gelo para a etapa de aeração

(temperatura da mistura entre 10 e 15°C) em batedeira planetária Amadio Modelo 20 (Irmãos Amadio Ltda., São Paulo, Brasil), na qual a massa alcançou 80-85% do volume inicial, fixado nos ensaios pilotos do presente trabalho (BURITI *et al.*, 2007c), volume este considerado adequado para sobremesa láctea aerada segundo ANDREASEN & NIELSEN (1998). Posteriormente, a musse foi transferida para a envasadora manual Intelimaq Modelo IQ81-A (Intelimaq Máquinas Inteligentes, São Paulo, Brasil) para, a seguir, ser embalada em potes plásticos de polipropileno próprios para alimentos (diâmetro de 68 mm, altura de 32 mm, volume útil de 55 mL; Tries Aditivos Plásticos, São Paulo, Brasil) e selados com tampa de alumínio com verniz, em seladora Delgo Nº. 1968 (Delgo Metalúrgica, Cotia, Brasil). O volume de musse dosado nos potes foi de 40 mL (ca. 25 g), exceto para as amostras da análise sensorial, quando o volume foi reduzido para 30 mL (ca. 20 g). Os equipamentos batedeira planetária Amadio Modelo 20 (Irmãos Amadio Ltda.), envasadora manual Intelimaq Modelo IQ81-A (Intelimaq Máquinas Inteligentes Ltda.) e seladora Delgo Nº. 1968 (Delgo Metalúrgica) foram todos adquiridos com os recursos do projeto de Auxílio à Pesquisa relativo ao presente trabalho – processo FAPESP nº. 05/51317-8.

A **figura 1** ilustra, resumidamente, as principais etapas de fabricação das musses empregadas neste trabalho.



[1,2] em misturador Geiger UMMSK-12 (Geiger).
[3] em batedeira planetária Amadio Modelo 20 (Irmãos Amadio).
[4] em potes plásticos selados com tampa metálica - envasadora manual Intelimaq Modelo IQ81-A (Intelimaq Máquinas Inteligentes) e seladora Delgo Nº 1968 (Delgo Metalúrgica).

Figura 1: Principais etapas envolvidas na tecnologia de fabricação das musses.

Em cada tratamento, os lotes de musse embalados foram divididos em duas partes iguais: uma parte foi armazenada sob refrigeração a 4°C e a outra parte foi armazenada sob congelamento a -18°C.

3.3 Períodos de amostragem durante o armazenamento

Nas amostras de musse armazenadas sob refrigeração a 4°C, as determinações dos parâmetros microbiológicos *Lactobacillus acidophilus*, coliformes e *Escherichia coli*, *Staphylococcus* DNA-se positivos e bolores e leveduras, de textura, de pH e da resistência do probiótico às condições

gastrintestinais simuladas *in vitro* foram realizadas no dia seguinte à fabricação (1 dia) e após 7, 14, 21 e 28 dias. Nas amostras mantidas sob congelamento a -18°C, essas análises foram conduzidas após 7, 35, 56, 84 e 112 dias de fabricação, após o descongelamento a 4°C dessas amostras, 2h antes do início das análises. A investigação de *Bacillus cereus* e *Salmonella* spp foi determinada em um único período de amostragem, a partir de amostras mantidas a -18°C.

A determinação do teor de sólidos de cada uma das musses estudadas foi realizada no dia seguinte após a fabricação (1º dia) das amostras armazenadas sob refrigeração. As determinações de cinzas, lipídios, ácidos graxos e proteínas foram conduzidas em amostras inicialmente mantidas a -18°C e posteriormente liofilizadas, após o seu congelamento a -60°C. A liofilização das amostras foi conduzida em liofilizador Edwards L4KR Modelo 118 (BOC Edwards, São Paulo, Brasil), com o sistema de vácuo operando com pressão de 10^{-1} mbar e com a temperatura do condensador mantida em -40°C. A temperatura final do processo de secagem manteve-se entre 10 e 15°C.

A avaliação sensorial do produto refrigerado foi realizada a partir do 7º dia de armazenamento (tempo necessário para o equilíbrio dos ingredientes da formulação do produto refrigerado para a estabilização do sabor) e após 14 e 21 dias de fabricação, períodos em que as condições microbiológicas foram comprovadamente favoráveis. Para as amostras congeladas, a avaliação sensorial foi conduzida após 7, 35, 56, 84 e 112 dias de fabricação, com o descongelamento prévio dessas amostras a 4°C, duas horas antes do início das análises.

3.4 Determinação dos parâmetros microbiológicos

Durante a produção dos diversos tipos de musse, foram determinadas as populações de *Lactobacillus acidophilus*, de coliformes e *Escherichia coli*, de *Staphylococcus* DNAse positivos e de bolores e leveduras durante o processamento da musse (etapa de aeração) e no produto final ao longo de seu armazenamento (refrigerado ou congelado), além da investigação de *Bacillus cereus* e *Salmonella* spp em um único período de amostragem, a partir de amostras mantidas a -18°C, conforme descrito no item **3.3**. Para esse fim e exceto

para a pesquisa de *Salmonella* spp, porções de 25 g de musse (retiradas em condições de assepsia) foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}), utilizando-se um "Bag Mixer" (Interscience, St. Nom, França). Diluições decimais subseqüentes foram preparadas, utilizando o mesmo diluente.

3.4.1 Determinação da população do microrganismo probiótico

Para a enumeração de *Lactobacillus acidophilus*, alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas, em triplicata, para placas de Petri estéreis. Em seguida, foi adicionado ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS) modificado, preparado com triptona (Oxoid Ltd., Basingstoke, Reino Unido, 10 g), extrato de levedura (Oxoid, 5 g), Tween 80 (Merck-Schuchardt, Hohenbrun, Alemanha, 1 g), dipotássio hidrogenofosfato (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha, 2,6 g), sódio acetato trihidrato (Merck, 5 g), di-amônio hidrogeno citrato (Merck, 2 g), magnésio sulfato heptahidrato (Merck, 0,2 g), manganês II sulfato monohidrato (Merck, 0,05 g), ágar bacteriológico (Oxoid, 13 g) e água destilada (1 L), adicionado de maltose (Difco, Sparks, MD, EUA, 18,2 g,), fundido e resfriado a cerca de 45°C, adaptado de INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1995). Após a homogeneização e o endurecimento do ágar, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, em aerobiose.

3.4.2 Determinação dos parâmetros microbiológicos sanitários

Alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas, em triplicata, para placas Petrifilm™EC (3M Microbiology, St. Paul, MN, EUA), para a determinação de coliformes e de *Escherichia coli*, para placas Petrifilm™ Staph Express (3M Microbiology), para a determinação de *Staphylococcus* DNAse positivos e para placas Petrifilm™YM (3M Microbiology), para a determinação de bolores e leveduras. As placas Petrifilm™EC e Petrifilm™ Staph Express foram incubadas a 35-37°C por 24 horas e as placas Petrifilm™YM foram incubadas a 20-25°C por 3 a 5 dias – métodos AOAC 991.14, AOAC 997.02 e AOAC 2003.08 (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 2003a; SILBERNAGEL, *et al.*, 2003).

A investigação de *Bacillus cereus e Salmonella* spp. nas musses do presente trabalho foi realizada com a consultoria do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP.

Para a pesquisa de colônias suspeitas de *Bacillus cereus*, alíquotas de 0,1 mL de cada diluição das amostras foram semeadas na superfície de placas contendo base para ágar *Bacillus cereus* (Oxoid) adicionado de emulsão 1:1 de gema de ovo em solução de NaCl 0,85% (50 mL de emulsão/ 1L de meio) e polimixina (Polymyxin B supplement, Oxoid, 4 mL/ 1L de meio) e incubadas a 30°C por 24 horas (COMPENDIUM..., 2001).

Para a pesquisa de colônias suspeitas de *Salmonella* spp., porções de 25 g de musse, retiradas em condições de assepsia, foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada tamponada 2% (pH 7,2±0,2 a 25°C) e incubadas a 35-37°C durante 24 horas para a etapa de pré-enriquecimento. Alíquotas de 1 mL e 0,1 mL das diluições pré-enriquecidas foram transferidas para tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis – RV (Oxoid) e incubadas a 35°C (alíquotas de 1 mL) e a 42°C (alíquotas de 0,1 mL) por 24 horas para a etapa de enriquecimento. Alçadas de cada cultura do enriquecimento foram semeadas em placas contendo ágar sulfito de bismuto – SB (Oxoid), ágar Hektoen-Enteric – HE (Oxoid) e ágar Rambach® – RAM (Merck) a 35-37°C por 24 horas (COMPENDIUM..., 2001).

3.5 Avaliação *in vitro* da resistência da cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus* às condições gástrica e entérica durante a vida de prateleira das musses mantidas sob refrigeração e congelamento

A análise foi conduzida empregando-se um modelo *in vitro*, utilizando-se sucos gástricos e entéricos simulados e enzimas do TGI, adaptado de LISERRE *et al.* (2007) com alterações, conforme descrito a seguir.

Decorridos os tempos e condições de armazenamento descritos no item **3.3**, porções de 25 g de musse contendo a cultura probiótica foram misturadas a 225 mL de uma solução de NaCl 0,5% utilizando-se um "Bag Mixer" (Interscience) e submetidas à análise de resistência às condições gástrica e entérica simuladas,

durante o armazenamento refrigerado e congelado. Para esse fim, uma alíquota de 10 mL da diluição de musse em NaCl 0,5% foi adicionada de 0,5 mL de HCl 1N e de soluções das enzimas pepsina (Pepsin from porcine stomach mucosa, Sigma-Aldrich CO. St. Louis, MO, EUA, 0,1 mL) e lipase (Amano lipase F-AP15, from Rhizopus oryzae, Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, EUA, 0,01 mL), também dissolvidas em NaCl 0,5%, totalizando um conteúdo de 10,61 mL (2,98 g/L pepsina; 0,9 mg/L lipase) com pH entre 1,4 – 1,9, que foi incubado a 37°C por 2h, com agitação de aproximadamente 150 r.p.m. (Banho Metabólico Dubnoff MA-095, Marconi, Piracicaba, Brasil, equipamento adquirido com os recursos do Auxílio à Pesquisa relativo ao presente trabalho – processo FAPESP nº. 05/51317-8). A seguir, foram adicionados 0,17 mL de NaCl 0,5% e 2,92 mL de solução de fosfato de sódio pH 12 (NaH_2PO_4 $2H_20$, 14 g; NaOH 1N, 150 mL; H_20 destilada q.s.p. 1 L) contendo bile (Bile bovine, Sigma-Aldrich, 0,1334g) e pancreatina (Pancreatin from porcine pancreas, Sigma-Aldrich, 0,0133g), totalizando um conteúdo de 13,7 mL (9,74 g/L bile; 0,971 g/L pancreatina) com pH entre 4,3 – 5,2, que foi reincubado a 37°C por 2h, com agitação de aproximadamente 150 r.p.m. Após 4h do início do ensaio, uma alíquota de 3,5 mL de solução de fosfato de sódio pH 12, contendo bile (0,035g) e pancreatina (0,0035g) foi adicionada, totalizando um volume final de 17,2 mL (9,79 g/L bile; 0,977 g/L pancreatina), com pH entre 6,7 – 7,5, que foi novamente incubado a 37oC por 2h, com agitação de aproximadamente 150 r.p.m., totalizando 6 horas de ensaio. A retirada das alíquotas da diluição de musse contendo os sucos gástrico e entérico simulados ocorreu após 30 min, 2h, 4h e 6h do início do ensaio *in vitro*. Cada ensaio foi realizado em triplicata. Os valores de pH das amostras em cada etapa do ensaio foram monitorados, utilizando-se Medidor de pH-Analyser Modelo 300M (Analyser, São Paulo, Brasil), com o Eletrodo modelo DME-CF (Digimed, São Paulo, Brasil).

Para a contagem de *Lactobacillus acidophilus* sobreviventes ao ensaio *in vitro*, alíquotas de 1 mL tratadas com sucos gástrico e entérico simulados foram semeadas em superfície de placas contendo ágar MRS modificado, preparado como descrito no item **3.4.1** e, após a sua secagem, incubadas em anaerobiose (Sistema de Anaerobiose Anaerogen, Oxoid) a 37°C por 48 horas. A semeadura das alíquotas de 1 mL em superfície ocorreu para facilitar a posterior contagem das colônias, evitando que fragmentos de musse, sempre presentes nessa

diluição, pudessem ser confundidos com as colônias de *Lactobacillus acidophilus*, o que ocorria quando a mesma diluição era semeada em profundidade. O volume de 1 mL semeado nessa placa foi mantido para preservar os mesmos limites mínimos de UFCs detectados na semeadura em profundidade. A incubação em anaerobiose das placas com semeadura em superfície foi necessária para garantir a multiplicação de *Lactobacillus acidophilus* nessa condição e inibir uma possível multiplicação de outros tipos de bactérias láticas no ágar MRS modificado, que também pudessem ser confundidas com as colônias do microrganismo probiótico. Alíquotas de 0,1 mL (diluição 10^{-2}) e de 0,01 mL (diluição 10^{-3}), tratadas com os sucos gástrico e entérico foram semeadas em placas contendo ágar MRS modificado, em profundidade, e incubadas em aerobiose a 37°C por 48 horas.

3.6 Determinação dos parâmetros físico-químicos das musses

Decorridos os tempos e as condições de armazenamento das musses descritos no item **3.3**, foram realizadas as determinações de:

- teor de sólidos (extrato seco) a 70°C, em estufa a vácuo modelo 440/D (Nova Ética, Vargem Grande Paulista, Brasil), a partir de amostras com 5 g, de acordo com as normas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2005);
- fração cinza ou resíduo mineral fixo, determinada gravimetricamente pela incineração de 2 g de amostra seca a 550°C, até eliminação completa de carvão (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005);
- lipídeos, determinado através do método de Folch (CHRISTIE, 1982);
- perfil de ácidos graxos, obtido por cromatografia de fase gasosa, segundo normas da AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY (1990), método Ce 1-62. Para esse fim, foram obtidos ésteres metílicos de ácidos graxos pela saponificação de 25 a 50 mg de lipídios extraídos de cada amostra com 2 mL de solução metanólica 0,5N de hidróxido de potássio, fervendo-se por 3 a 5 min em banho de água a 75-80°C. À solução quente foram adicionados 6 mL do reagente de esterificação. Para a preparação do reagente de esterificação, adicionaram-se 2 g de cloreto de amônio a 60 mL de metanol

e, a seguir, 3 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi refluxada em balão de fundo redondo por 15 min, usando um condensador de água. Os metil-ésteres formados foram extraídos com 3 porções sucessivas de 2 mL de hexano. Ao final da segunda extração, foram adicionados 5 mL de solução saturada de NaCl. O sobrenadante foi coletado e evaporou-se o solvente, utilizando gás nitrogênio. Adicionou-se 1 mL de n-hexano P.A. aos metil-ésteres extraídos para a injeção no cromatógrafo (HARTMAN & LAGO, 1973). Neste trabalho, foi utilizado um cromatógrafo a gás Varian GC, modelo 3400CX (Varian Ind. Com. Ltda., São Paulo, Brasil), equipado com detector de ionização de chama "Workstation Star Chromatography". Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida CP WAX 52CB (Chrompack, Minnesota, MN, EUA), com 30 m de comprimento × 0,25 mm de diâmetro interno e contendo 0,25µm de espessura de polietilenoglicol dentro da coluna. As condições foram: injeção *split*, razão de 50:1; temperatura da coluna: 75°C por 3 min, programada até 150°C numa razão de 37,5°C/min e novamente programada até 215°C, numa razão de 3°C/min; gás de arraste: hélio, numa vazão de 1,5 mL/min; gás make-up: hélio, a 30 mL/min; temperatura do injetor: 250°C; temperatura do detector: 280°C. O volume de injeção foi de 1 µl. A composição qualitativa foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos com os dos respectivos padrões de ácidos graxos. A composição quantitativa foi realizada por normalização de área em relação ao total de ácidos graxos na fração lipídica das amostras. Para a composição quantitativa na amostra integral, a proporção de ácidos graxos foi estimada pelo teor lipídico total, utilizando o fator de conversão de 0,933 (GLASSER *et al.*, 2007);

- proteínas, através de análise do conteúdo de nitrogênio pelo método micro-Kjeldahl, utilizando o fator de conversão 6,38, adaptado de ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (2003a,b);
- fibra alimentar (FA) para alimentos contendo frutanos, adaptado do método AOAC 985.29 para fibra alimentar total (FAT) (PROSKY *et al.*, 1988). A modificação consistiu na hidrólise adicional das amostras de musse com inulinase Fructozyme® L (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca) para a eliminação completa dos frutanos (FA ausente de frutanos), uma vez que

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

essas fibras são quantificadas apenas parcialmente pelo método original (PROSKY & HOEBREGS, 1999; FILISETTI, 2006; PAK, 2006; PASCOAL, 2007), levando a uma subestimação do real teor de FAT de alimentos com alto teor de frutanos. A quantidade de frutanos adicionada a cada formulação de musse (oligofrutose Beneo® P95, Orafti, e inulina Beneo® HP Gel, Orafti) foi acrescida a essa fração de fibras determinada pelo método AOAC 985.29-modificado, para compor o valor real de FAT dessas musses. Esta análise foi realizada, em duplicata, nas musses T1, T2 e T3 e a média dos resultados obtidos para estas amostras foi calculada para estimar o teor de FAT das musses dos demais tratamentos;

- carboidratos (excluindo FAT), calculado pela diferença para se obter 100% da composição total (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003b);
- pH, em Medidor de pH-Analyser Modelo 300M (Analyser), empregando-se um Eletrodo tipo Penetração modelo DME-CF (Digimed);

Todas as análises, exceto FAT, foram realizadas em triplicata.

3.7 Determinação do teor de lipídios da matéria prima utilizada para a produção das musses

O teor lipídico do leite desnatado utilizado para a produção das musses foi determinado através do método de lactobutirômetro de Gerber (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005). O teor lipídico e o perfil de ácidos graxos do estabilizante Cremodan® Mousse (Danisco Brasil Ltda., Cotia, Brasil) foram determinados, respectivamente, através dos métodos de Folch (CHRISTIE, 1982) e de cromatografia de fase gasosa, segundo normas da AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY (1990), conforme detalhado no item **3.6**.

3.8 Cálculo do valor energético total (VET) e apresentação dos nutrientes e porções para fins de rotulagem nutricional

Os teores de macronutrientes foram convertidos em quilocalorias por meio dos fatores de Atwater e da energia oriunda da inulina e oligofrutose [(4 × g

proteínas) + (4 × g carboidratos) + (9 × g lipídios totais) + (1,5 × g frutanos totais)] para determinar o valor energético total (VET) médio de cada uma das 7 formulações de musse (ROBERFROID, 1999b; 2005b; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003b).

Os valores energéticos e de nutrientes obtidos foram expressos segundo a legislação nacional vigente (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003b). O cálculo do teor de sódio para compor a informação nutricional das amostras, apresentada nos **anexos 3** a **9**, foi obtido a partir das informações contidas nos rótulos das embalagens e em laudos fornecidos pelos fabricantes das matérias primas utilizadas no preparo das musses. As porções para fins de rotulagem nutricional de cada um dos tratamentos foram apresentadas segundo as normas da AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2003a,b).

A informação nutricional complementar relativa ao conteúdo absoluto de nutrientes foi apresentada para as musses que atenderam as especificações da legislação vigente para gordura total, gordura saturada, gordura trans e fibra alimentar (BRASIL, 1998). Adicionalmente, a informação nutricional complementar comparativa foi utilizada para confrontar as formulações modificadas quanto à adição de gordura, inulina e WPC em relação ao tratamento controle T1, e as alegações e termos permitidos foram apresentados quando tais modificações atenderam os requisitos exigidos pela legislação vigente (BRASIL, 1998).

3.9 Textura instrumental

Decorridos os tempos e as condições de armazenamento das musses descritos no item **3.3,** foi determinado o perfil de textura, através de teste de dupla compressão de amostras contidas nas embalagens plásticas, à temperatura de 4°C, em quintuplicata. Em cada período de amostragem, as musses armazenadas sob congelamento foram mantidas a 4°C por duas horas antes do início dos testes instrumentais de textura. Foi utilizado cilindro de alumínio de 25 mm de diâmetro (P25), em analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems, Haslemere, Reino Unido). Foram determinados os parâmetros firmeza, coesividade, adesividade, elasticidade e gomosidade. Os dados foram coletados

através do programa "Texture Expert for Windows" – versão 1.20 (Stable Micro Systems). Foram empregadas distância e velocidade de compressão de 10 mm e 1 mm/s, respectivamente.

3.10 Análise sensorial

A avaliação sensorial do presente trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, conforme consta no Ofício CEP 055/2005 (**anexo 1**).

A avaliação sensorial dos diferentes tipos de musse estudados foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, de acordo com os tempos e as condições de armazenamento descritos no item **3.3,** através de teste de aceitabilidade, utilizando escala hedônica híbrida de 11 pontos (0 = desgostei muitíssimo, 5 = não gostei nem desgostei, 10 = gostei muitíssimo) (LAWLESS & HEYMANN, 1999; VILLANUEVA *et al.*, 2000; VILLANUEVA, 2003). O modelo da ficha de avaliação sensorial usada nas análises encontra-se no **anexo 2**. Cada sessão contou com a presença de 25 provadores não treinados, sobretudo alunos, professores e funcionários da USP, em um total de 56 sessões. Cada provador analisou uma amostra por sessão, sendo que a maioria dos provadores esteve presente em duas ou mais sessões. As amostras (ca. 20 g), codificadas com 3 dígitos aleatórios, foram servidas à temperatura de 4°C. As musses armazenadas sob congelamento foram mantidas a 4°C durante duas horas antes do início das análises. Com a finalidade de se obter maiores informações sobre as características sensoriais das musses, os provadores foram instruídos a relatar os atributos sensoriais que mais apreciaram e que menos gostaram naquelas amostras, atributos estes relacionados ao sabor, textura, aparência e aroma. Quando tais citações não constavam na ficha de análise, considerou-se que o provador foi "indiferente" ao atributo em questão.

3.11 Análise estatística

A análise estatística foi realizada conforme o delineamento estatístico proposto no item **3.1**, utilizando o pacote estatístico Statistica, versão 6.1 para Windows (Statsoft Inc.).

Os resultados de composição centesimal, teor de ácidos graxos, pH, população de *Lactobacillus acidophilus*, resistência da cultura probiótica às formulações de sucos gástrico e entérico, textura instrumental e avaliação sensorial foram comparados e as variáveis-respostas foram expressas como média ± desvio padrão. A normalidade desses resultados foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilks, adotando-se um valor de α de 0,05. A homogeneidade de variâncias entre os tratamentos e ao longo do tempo para cada condição de armazenamento foi analisada através dos testes de Hartley, Cochran e Bartlett com α de 0,05, exceto para a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* durante o armazenamento e nos testes de sobrevivência no ensaio *in vitro*, em que foi considerado α de 0,01, uma vez que variações microbiológicas podem não ser importantes quando adotado valores de α mais altos. Para a comparação entre os resultados dos armazenamentos refrigerado e congelado, a homogeneidade de variâncias foi analisada através do teste de Levene, com α de 0,05.

Exceto para os resultados de composição centesimal e ácidos graxos, os testes estatísticos foram aplicados nas seguintes condições:

- quando houve a homogeneidade de variâncias em todos os períodos de amostragens para uma determinada variável, procedeu-se a análise de variância para medidas repetidas e aplicação do teste de Tukey para detectar as diferenças significativas ($p<0,05$) entre as médias dos 7 tratamentos e ao longo de sua vida de prateleira em uma condição de armazenamento específica (refrigeração ou congelamento) e entre os tempos (horas) de coleta do ensaio *in vitro* em um tempo (dia) e condição de armazenamento específicos (BOWER, 1998a);
- os casos onde a homogeneidade de variância não foi observada em um ou mais períodos de amostragem de uma condição específica de armazenamento foram tratados da seguinte maneira:

a) quando pelo menos um dos períodos de amostragens de uma condição de armazenamento específica apresentou homogeneidade de variâncias, procedeu-se a análise de variância paramétrica e aplicação do teste de Tukey para detectar as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos para esse período específico ($p<0,05$) (BOWER, 1998a);

b) os períodos de amostragens de cada condição de armazenamento onde a homogeneidade de variância não foi observada foram tratados pela análise de variância não-paramétrica, com aplicação do teste de Kruskal Wallis e do teste de Mann Whitney U para a identificação dos contrastes entre os tratamentos ($p<0,05$) (BOWER, 1997; BOWER, 1998b);

c) as comparações entre os diferentes períodos de armazenamento para uma mesma formulação de musse em uma mesma condição de armazenamento foi realizada através de análise de variância não-paramétrica, com aplicação do teste de Friedman e do teste de postos sinalizados de Wilcoxon para a identificação dos contrastes ($p<0,05$), sendo realizados ajustes no nível de significância dessa comparação, quando necessário (BOWER, 1998b).

- Comparações entre as diferentes condições de armazenamento para uma mesma formulação de musse, considerando todo o período analisado:

a) os casos onde a homogeneidade de variância não foi observada foram comparados através do teste de Mann Whitney U (BOWER, 1997).

b) quando houve a homogeneidade de variâncias, o teste t não pareado foi empregado para detectar as diferenças significativas entre as médias ($p<0,05$) (BOWER, 1997).

Para os resultados de composição centesimal e ácidos graxos, quando estes apresentaram homogeneidade de variâncias, procedeu-se a análise de variância paramétrica e aplicação do teste de Tukey para detectar as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos ($p<0,05$) (BOWER, 1998a). Quando a homogeneidade de variância não foi observada, os dados foram

tratados pela análise de variância não-paramétrica, com aplicação do teste de Kruskal Wallis e do teste de Mann Whitney U para a identificação dos contrastes entre os tratamentos ($p<0,05$) (BOWER, 1997; BOWER, 1998b).

As populações de *Staphylococcus* DNA-se positivos e de bolores e leveduras foram expressas como valores mínimos – máximos. A comparação desses resultados (proporções de amostras positivas obtidas ao longo dos armazenamentos refrigerado ou congelado) entre as diferentes musses para uma mesma condição de armazenamento e entre as diferentes condições de armazenamento para uma mesma formulação de musse, considerando todo o período analisado, foi realizada através do teste binomial exato (CONOVER, 2001).

As variáveis-dependentes *Lactobacillus acidophilus*, firmeza e coesividade aos 14 dias de armazenamento refrigerado e firmeza e coesividade aos 112 dias de armazenamento congelado para as musses T1 a T7, cujos resultados apresentaram homogeneidade de variâncias ($p>0,01$ para *Lactobacillus acidophilus* e $p>0,05$ para as demais) e diferenças significativas ($p<0,05$) entre as formulações nos períodos de armazenamento citados, foram selecionadas para a obtenção de modelos estatísticos ajustados, capazes de explicar o comportamento de tais variáveis em função das interações entre os fatores gordura láctea (x_1), inulina (x_2) e WPC (x_3).

Para esse fim, foi aplicado um modelo de regressão múltipla do tipo cúbico especial, representado pela equação a seguir:

$\hat{y} = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3$, onde $\hat{y}$ = estimativa da resposta da variável de interesse no produto, b_1, b_2, b_3 = coeficientes da regressão, x_1, x_2, x_3 = proporção dos fatores gordura láctea, inulina e WPC presentes na formulação.

Os coeficientes da regressão foram calculados e avaliados a partir de intervalos de confiança de 95%, utilizando-se a distribuição *t* de *Student*. A qualidade dos modelos obtidos para cada variável, em cada condição de armazenamento, foi avaliada através de análise de variância ($p<0,05$) e do coeficiente de determinação R^2.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros físico-químicos

4.1.1 Composição centesimal

A composição centesimal obtida para as diferentes musses estudadas é apresentada na **tabela 3**.

Tabela 3: Composição centesimal na amostra integral (média ± desvio padrão) obtida para as diferentes musses estudadas (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7).

	Musses#						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Sólidos (%)	36,58 ± 0,37^{AB}	35,58 ± 0,02^{C}	35,98 ± 0,29^{B}	36,17 ± 0,10^{B}	36,75 ± 0,03^{A}	35,97 ± 0,39^{BC}	36,56 ± 0,35^{AB}
Cinzas (%)	0,825 ± 0,003^{D}	0,838 ± 0,005^{CD}	0,956 ± 0,001^{A}	0,844 ± 0,009^{C}	0,900 ± 0,003^{B}	0,901 ± 0,010^{B}	0,891 ± 0,002^{B}
Proteínas (%)	4,78 ± 0,09^{E}	4,48 ± 0,12^{EF}	7,97 ± 0,12^{A}	4,40 ± 0,02^{F}	6,62 ± 0,03^{B}	6,23 ± 0,21^{C}	5,69 ± 0,11^{D}
Lipídeos (%)	4,63 ± 0,39^{A}	0,798 ± 0,058^{E}	1,38 ± 0,39^{D}	2,52 ± 0,18^{C}	3,34 ± 0,01^{B}	0,839 ± 0,165^{E}	1,47 ± 0,13^{D}
Carboidratos* (%)	20,13 ± 0,32^{AB}	19,22 ± 0,24^{C}	19,42 ± 0,54^{BC}	20,17 ± 0,29^{AB}	19,65 ± 0,06^{BC}	19,76 ± 0,33^{BC}	20,93 ± 0,28^{A}
Fibra alimentar (FA) ausente de frutanos** (%)	0,219 ± 0,129^{A}	0,248 ± 0,144^{A}	0,256 ± 0,189^{A}	0,242 ± 0,143	0,242 ± 0,143	0,242 ± 0,143	0,242 ± 0,143
Fibra alimentar total (FAT)***	6,219	10,248	6,256	8,242	6,242	8,242	7,575

\# Resultados com variâncias homogêneas (p>0,05), exceto teores de sólidos e de lipídios.
A,B letras maiúsculas sobrescritas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05) entre as diferentes formulações de musse.
* Calculado por diferença para se obter 100% de sólidos.
** Analisado para T1, T2 e T3. Para T4 a T7, considerou-se os valores médios obtidos de T1 a T3.
*** FAT = FA ausente de frutanos somada às quantidades de FOS e inulina adicionadas a cada formulação de musse.

Embora os teores de sólidos das diferentes musses estivessem bastante próximos, ao redor de 36%, foram observadas diferenças significativas (p<0,05) entre tais valores, o que reflete a variabilidade da etapa de fabricação entre os tratamentos, normal para esse tipo de produto. As musses T2 e T5 apresentaram, respectivamente, o menor e o maior teor de sólidos dentre as formulações.

Os valores obtidos para cinzas foram inferiores a 1% para todas as formulações e, embora com pequena variação entre as formulações de musses, foram observadas diferenças significativas ($p<0,05$). As musses controle T1 (4% de gordura láctea adicionada) e T3 (4% de WPC) apresentaram, respectivamente, o menor e o maior teor de cinzas. O ingrediente WPC parece ter contribuído para um pequeno, porém significativo, aumento do teor de cinzas do produto, uma vez que as musses T5, T6 e T7 (nas quais a gordura láctea foi parcialmente substituída por WPC) também apresentaram valores de cinza significativamente mais altos em relação às demais formulações ($p<0,05$). Independentemente da formulação estudada, a maior parte das cinzas presentes nas musses é, provavelmente, de origem láctea. Dentre os principais minerais encontrados na fração cinza de produtos lácteos, destacam-se o cálcio e o fósforo, como também o potássio e o sódio (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO, 2006; DUNKER *et al.*, 2008).

Quanto ao teor protéico, observa-se que os valores encontrados através da análise estão coerentes com o valor teórico, tomando-se como referência a concentração desse nutriente nos ingredientes adicionados às diferentes musses, conforme apresentado anteriormente na **tabela 2,** em **Material e Métodos**. As diferenças significativas ($p<0,05$) obtidas refletem o teor de WPC adicionado, em diferentes proporções, às musses T3, T5, T6 e T7.

No presente trabalho, todas as formulações são adicionadas de oligofrutose em igual proporção. Além disso, a quantidade de inulina adicionada às formulações T2, T4, T6 e T7 é conhecida. Em estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa, verificou-se que o teor de frutanos presente nas amostras comerciais de inulina Raftiline® HP-Gel está de acordo com o valor especificado pelo fabricante (Orafti) (BURITI *et al.*, 2007a). Do mesmo modo, as cepas *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BL 04, *Lactobacillus acidophilus* Lac 4, *Lactobacillus paracasei* LBC 82 e *Streptococcus thermophilus* TA 040 não foram aptas a degradar inulina e/ou oligofrutose em temperaturas de refrigeração quando presentes em produtos lácteos (queijo fresco cremoso e queijo *petit suisse*) mantidos a 4±1°C por até 28 dias (BURITI *et al.*, 2007a, CARDARELLI *et al.*, 2008b). Assim, optou-se por verificar o teor de FA das formulações que apresentaram 100% de cada um dos ingredientes cujas concentrações variaram

nas demais formulações. Neste caso, se partiu do pressuposto que o teor de FA ausente de frutanos seria bastante semelhante entre as formulações, uma vez que a base é constituída dos mesmos ingredientes para todas, sendo que o principal contribuinte para o teor de FA ausente de frutanos é a polpa de goiaba. De fato, as análises de FA ausente de frutanos para T1, T2 e T3 apresentaram resultados muito próximos, como pode ser observado na **tabela 3**. Os resultados obtidos a partir dessa análise e as quantidades de FOS e inulina foram acrescentados às diferentes formulações de musse para compor o valor real de FAT, necessário para se calcular a quantidade de carboidratos obtidos por diferença. O teor de carboidratos, embora com variações significativas ($p<0,05$) entre as diferentes musses, esteve próximo a 20% para todas as formulações.

Em relação ao teor lipídico, as amostras apresentaram variações significativas ($p<0,05$) de acordo com o esperado, tomando-se como referência os ingredientes presentes nessas amostras e a proporção de creme de leite adicionada (**tabela 2**). Assim, a musse controle T1, contendo uma maior quantidade de creme de leite (o que resultou em um acréscimo de 4% de gordura láctea à formulação), apresentou a maior recuperação média do teor lipídico pelo método de Folch, 4,63%, enquanto que as musses T2, T3 e T6, sem a adição daquele ingrediente, apresentaram médias de 0,798%, 1,38% e 0,839% de lipídeos, respectivamente. A presença de lipídios nessas últimas três formulações pode ser atribuída a um residual de gordura encontrando nos ingredientes leite desnatado, estabilizante e WPC. O leite desnatado utilizado para as produções apresentou um teor lipídico residual de até 0,5%, obtido pelo método de lactobutirômetro de Gerber. O estabilizante utilizado nas produções continha um teor de gordura médio de 21%, verificado através do método de Folch. Dessa forma, o leite desnatado e o estabilizante juntos contribuem com até 0,9% dos lipídios presentes nas musses. Segundo dados obtidos junto à Kienast & Kratschmer, distribuidora do WPC 80, esse ingrediente também pode conter um residual lipídico máximo de 6%, resultando em um acréscimo de 0,2% de gordura na formulação T3 e de 0,1% em T5, T6 e T7.

4.1.2 Quantificação de ácidos graxos

A **figura 2** representa um cromatograma típico obtido em uma corrida de lipídeos extraídos e purificados a partir de amostras de musse liofilizadas, em cromatógrafo a gás. Os picos se referem à presença de ácidos graxos específicos, enquanto a área delimitada pela curva até a linha de base corresponde à sua percentagem em massa em relação ao total de ácidos graxos presente na musse. O primeiro pico corresponde ao solvente utilizado, o hexano.

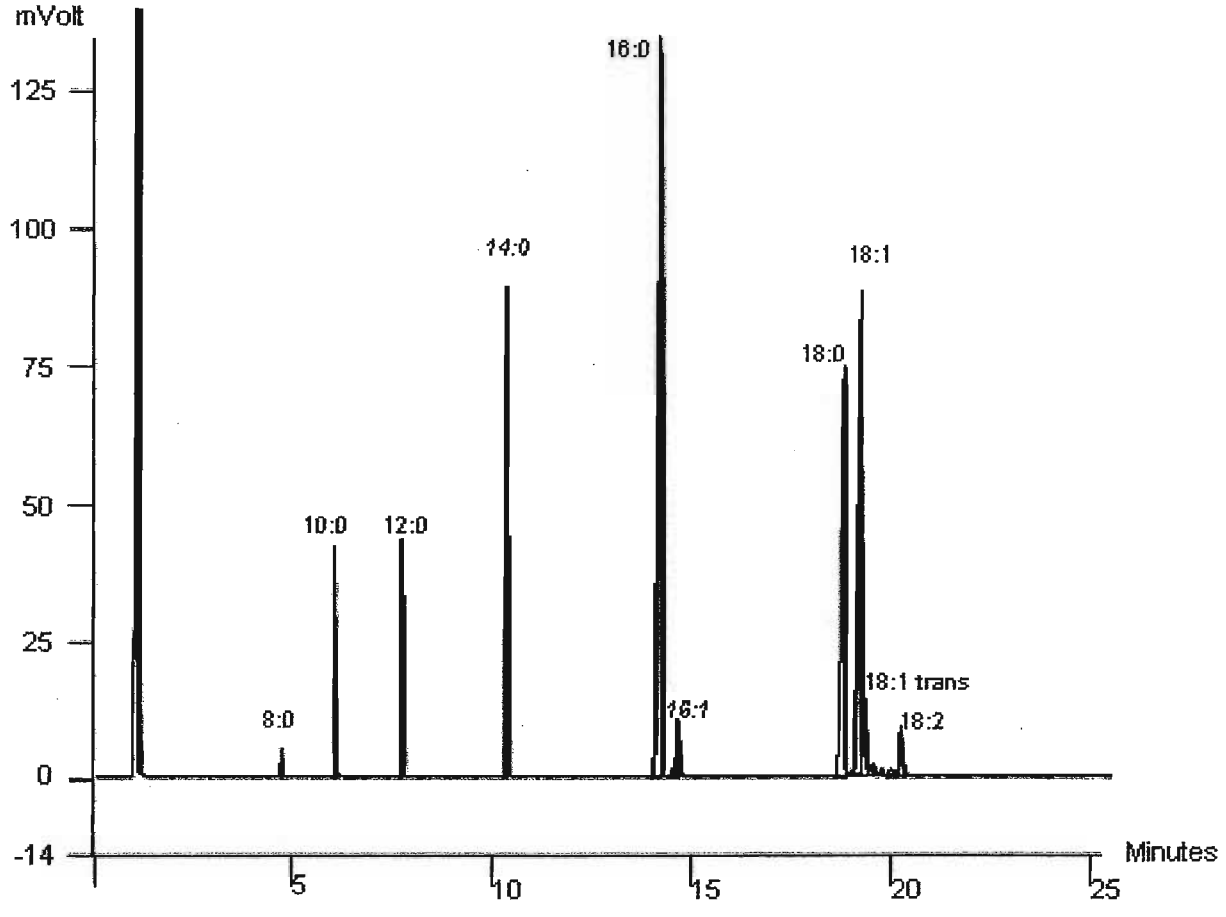


Figura 2: Cromatograma da fração de lipídeos extraída da musse T1.

Na **tabela 4** estão descriminados os diferentes ácidos graxos encontrados nas musses T1 a T7 e suas respectivas proporções, em porcentagem na base integral.

Tabela 4: Distribuição de ácidos graxos presentes em 100 g de amostra integral (média ± desvio padrão) obtida para as diferentes musses estudadas (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7).

Ácido graxo		Musses#						
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Butírico	**4:0**	$0,000^{Ac}$	$0,000^{Ae}$	$0,000^{Ad}$	$0,017 \pm 0,029^{Ae}$	$0,000^{Af}$	$0,000^{Ae}$	$0,000^{Ac}$
Capróico	**6:0**	$0,000^{Ac}$	$0,000^{Ae}$	$0,000^{Ad}$	$0,016 \pm 0,028^{Ae}$	$0,000^{Af}$	$0,000^{Ae}$	$0,000^{Ac}$
Caprílico	**8:0**	$0,000^{Bc}$	$0,000^{Be}$	$0,000^{Bd}$	$0,053 \pm 0,016^{Ade}$	$0,040 \pm 0,035^{ABf}$	$0,000^{Be}$	$0,000^{Bc}$
Cáprico	**10:0**	$0,193 \pm 0,112^{Ac}$	$0,004 \pm 0,003^{Ce}$	$0,038 \pm 0,023^{Bcd}$	$0,140 \pm 0,027^{Ad}$	$0,149 \pm 0,058^{Ade}$	$0,006 \pm 0,007^{Ce}$	$0,026 \pm 0,045^{BCc}$
Láurico	**12:0**	$0,245 \pm 0,110^{ABc}$	$0,011 \pm 0,003^{Ed}$	$0,047 \pm 0,020^{Ccd}$	$0,140 \pm 0,018^{Bd}$	$0,186 \pm 0,030^{Ad}$	$0,024 \pm 0,006^{Dd}$	$0,083 \pm 0,035^{Cc}$
Mirístico	**14:0**	$0,671 \pm 0,180^{Ab}$	$0,042 \pm 0,015^{Ec}$	$0,124 \pm 0,048^{CDcd}$	$0,333 \pm 0,032^{Bc}$	$0,473 \pm 0,049^{Ac}$	$0,083 \pm 0,029^{Dc}$	$0,232 \pm 0,080^{Cb}$
Palmítico	**16:0**	$1,455 \pm 0,182^{Aa}$	$0,173 \pm 0,023^{Db}$	$0,339 \pm 0,109^{Db}$	$0,687 \pm 0,065^{Ca}$	$0,951 \pm 0,036^{Ba}$	$0,204 \pm 0,059^{Db}$	$0,421 \pm 0,063^{Da}$
Palmitoléico	**16:1**	$0,072 \pm 0,012^{Ac}$	$0,007 \pm 0,007^{Bde}$	$0,000^{Bd}$	$0,024 \pm 0,021^{Bde}$	$0,015 \pm 0,026^{Bf}$	$0,028 \pm 0,010^{ABd}$	$0,013 \pm 0,022^{Bc}$
Esteárico	**18:0**	$0,715 \pm 0,195^{Ab}$	$0,428 \pm 0,071^{ABa}$	$0,548 \pm 0,110^{ABa}$	$0,529 \pm 0,085^{ABb}$	$0,698 \pm 0,059^{Ab}$	$0,378 \pm 0,107^{Ba}$	$0,359 \pm 0,042^{Ba}$
Oléico	**18:1**	$0,794 \pm 0,182^{Ab}$	$0,061 \pm 0,006^{Ec}$	$0,147 \pm 0,044^{Dc}$	$0,334 \pm 0,076^{Cc}$	$0,488 \pm 0,033^{Bc}$	$0,046 \pm 0,041^{Ecde}$	$0,212 \pm 0,020^{Db}$
Elaídico	**18:1t**	$0,091 \pm 0,029^{Ac}$	$0,007 \pm 0,001^{Dd}$	$0,019 \pm 0,004^{Ccd}$	$0,041 \pm 0,009^{Bde}$	$0,065 \pm 0,012^{Aef}$	$0,006 \pm 0,005^{De}$	$0,019 \pm 0,016^{CDc}$
Linoléico	**18:2**	$0,081 \pm 0,013^{Ac}$	$0,010 \pm 0,001^{Dd}$	$0,027 \pm 0,011^{CDcd}$	$0,035 \pm 0,004^{BCde}$	$0,052 \pm 0,005^{Bef}$	$0,007 \pm 0,006^{De}$	$0,006 \pm 0,011^{Dc}$
Linolênico	**18:3**	$0,000^{Ac}$	$0,002 \pm 0,003^{Ae}$	$0,000^{Ad}$	$0,000^{Ae}$	$0,000^{Af}$	$0,000^{Ae}$	$0,000^{Ac}$

\# Resultados com variâncias homogêneas (p>0,05), exceto para a composição de ácidos graxos nas musses T2 e T6 e para os ácidos cáprico, láurico, mirístico, oléico e elaídico entre as diferentes musses.

A,B letras maiúsculas sobrescritas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05) entre as diferentes formulações de musse para um mesmo ácido graxo.

a,b letras minúsculas sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes ácidos graxos para uma mesma formulação de musse.

A gordura presente no leite e nos produtos lácteos é composta, principalmente, dos ácidos palmítico (C 16:0), esteárico (C 18:0), oléico (C 18:1) e mirístico (C14:0) (RODRIGUES *et al.*, 2007; SANTOS & AQUINO, 2008). Esses ácidos graxos foram predominantes em todas as formulações de musse estudadas. No entanto, o ácido graxo palmítico é o que aparece em maior proporção no leite e seus derivados (RODRIGUES & GIOIELLI, 2003), o que não foi verificado para as musses T2, T3 e T6, sem a adição de creme de leite, nas quais o teor de ácido esteárico foi significativamente maior (p<0,05). A análise de

ácidos graxos do emulsificante indicou a presença de 14% de ácido palmítico e 86% de ácido esteárico em sua composição, o que pode justificar, portanto, o predomínio deste último ácido graxo nas musses T2, T3 e T6.

A gordura do leite é a única gordura de origem animal que apresenta um conteúdo significativo de ácidos graxos de cadeia curta: o ácido butírico (C 4:0) e capróico (C 6:0). Quando livres, esses ácidos graxos são voláteis e conferem aroma característico aos produtos lácteos (SANTOS & AQUINO, 2008). No presente trabalho, a musse T4 foi a única para a qual foi detectada a presença dos ácidos graxos de cadeia curta butírico e capróico. No entanto, estes ácidos graxos estavam, provavelmente, presentes nos demais tratamentos. Os ácidos graxos butírico e capróico são muito voláteis e a etapa de preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos para a cromatografia pode ter contribuído para essa perda. RODRIGUES *et al.* (2007) também encontraram dificuldades para recuperar ácidos graxos de cadeia curta em misturas de gordura láctea e ésteres de fitosteróis analisadas pela mesma metodologia utilizada no presente trabalho.

De modo geral, observa-se uma predominância de ácidos graxos saturados em relação aos mono e diinsaturados, o que é esperado para um produto de base láctea. Os ácidos graxos insaturados palmitoléico, oléico e linoléico foram encontrados em maior quantidade na formulação controle T1. A distribuição dos ácidos graxos segundo o grau de insaturação pode ser observada na **tabela 5**.

Quando se verifica a proporção de ácidos graxos em relação ao teor de gordura da formulação, na **tabela 6**, observa-se que T1 (controle), com a maior quantidade de creme de leite adicionada, apresentou menor proporção de ácidos graxos saturados, maior proporção de ácidos graxos insaturados e de gordura trans. A musse T4 apresentou uma proporção de gordura saturada próxima de T5 e T7. As musses T2 e T6 apresentaram maior proporção de ácidos graxos saturados e menor proporção de ácidos graxos trans.

O leite desnatado pode conter ao redor de 70% de ácidos graxos saturados e 30% de ácidos graxos insaturados (SHILS *et al.*, 1999; RODRIGUES, 2002). Comparando-se os resultados da proporção de ácidos graxos em relação ao teor de gordura total presente nas amostras de musses, percebe-se que os dados obtidos se assemelham aos resultados encontrados na literatura para leite

desnatado. Em pesquisa realizada pelo Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação da Universidade Estadual de Campinas (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS..., 2006), a porcentagem de lipídios insaturados da gordura do leite integral foi ligeiramente maior em comparação à gordura remanescente do leite desnatado, assim como ocorreu para T1 no presente trabalho - a amostra controle, contendo a maior quantidade de gordura em relação às demais.

Tabela 5: Distribuição de ácidos graxos, agrupados segundo o grau de insaturação/ conformação (média ± desvio padrão) obtida em 100 g de amostra integral para as diferentes musses estudadas (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7).

Insaturação/ conformação	Musses#						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Saturados (%)	3,279 ± 0,362^{Aa}	0,658 ± 0,056^{Ca}	1,096 ± 0,309^{Ca}	1,915 ± 0,201^{Ba}	2,497 ± 0,053^{Ba}	0,695 ± 0,190^{Ca}	1,122 ± 0,150^{Ca}
Insaturados (%)	0,946 ± 0,199^{Ab}	0,079 ± 0,006^{Eb}	0,174 ± 0,055^{Db}	0,393 ± 0,097^{Cb}	0,555 ± 0,049^{Bb}	0,081 ± 0,037^{Eb}	0,231 ± 0,025^{Db}
Trans (%)	0,091 ± 0,029^{Ac}	0,007 ± 0,001^{Dc}	0,019 ± 0,004^{Cc}	0,041 ± 0,009^{Bc}	0,065 ± 0,012^{Ac}	0,006 ± 0,005^{Dc}	0,019 ± 0,016^{CDc}

Variâncias homogêneas (p>0,05) apenas entre os tratamentos para os ácidos graxos saturados e entre as frações da musse T5.

A,B letras maiúsculas sobrescritas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05) entre as diferentes formulações de musse para um mesmo grupo de ácidos graxos.

a,b letras minúsculas sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes grupos de ácidos graxos para uma mesma formulação de musse.

Tabela 6: Proporção de ácidos graxos segundo o grau de insaturação/ conformação em relação ao total de ácidos graxos presente nas diferentes musses estudadas (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7).

Insaturação/ Conformação	Musses						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Saturados (%)	75,97	88,33	85,07	81,44	80,10	88,85	81,76
Insaturados (%)	21,92	10,67	13,48	16,79	10,55	10,38	16,86
Trans (%)	2,11	1,00	1,45	1,79	2,10	1,17	2,07

Os ácidos graxos trans não são predominantemente oriundos do leite. Entretanto, uma pequena proporção de ácidos trans é formada, devido à presença de hidrolases no rúmen da vaca (JENSEN, 2002; SANTOS & AQUINO,

2008). No presente trabalho, uma pequena quantidade de gordura trans (ácido elaídico) aparece no perfil lipídico das amostras de musse (**tabelas 4 a 6**).

4.1.3 Apresentação do valor energético total (VET), nutrientes e porção para fins de rotulagem nutricional

A contribuição energética dos macronutrientes e o valor energético total (VET) das 7 formulações de musse estudadas são apresentados na **tabela 7**.

Tabela 7: Contribuição energética dos macronutrientes em 100 g de amostra integral e valor energético total (VET) das musses T1 a T7 (vide tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7).

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Carboidratos* (kcal)	80,53	76,87	77,66	80,67	78,58	79,03	83,72
Proteínas (kcal)	19,11	17,94	31,90	17,59	26,46	24,92	22,76
Lipídios totais (kcal)	41,63	7,18	12,43	22,66	30,10	7,55	13,23
saturados (kcal)	29,51	5,92	9,86	17,24	22,48	6,26	10,09
trans (kcal)	0,81	0,07	0,17	0,37	0,59	0,05	0,17
Frutanos (kcal)	9,00	15,00	9,00	12,00	9,00	12,00	11,00
VET (kcal)	**150,27**	**116,99**	**130,99**	**132,92**	**144,14**	**123,50**	**130,71**
Redução calórica em relação a T1 (%)		**22,15**	**12,83**	**11,54**	**4,09**	**17,82**	**13,01**

*excluindo fibras

Quando se compara o valor calórico das musses T2 a T7 com a formulação controle T1, nota-se que a redução do VET foi mais evidente para T2, com 4% de inulina, ou seja, com a maior contribuição de frutanos, que apresentou 22% de redução calórica. Para T3 e T6, formulações que também apresentaram redução máxima do teor de gordura láctea adicionada, a redução do VET foi menor quando comparada a T2, uma vez que a proteína adicionada na forma de WPC fornece uma quantidade de energia superior à da inulina. A musse T6 apresentou a segunda maior redução calórica, 17,8% em relação ao controle T1. No caso de T3, as musses apresentaram um teor lipídico residual superior ao observado em T2 e T6 e próximo ao de T7, conforme mostrado anteriormente na **tabela 1**. Dessa

forma, as musses T3, T4 e T7 apresentaram valores intermediários de redução calórica, 12,8%, 11,5% e 13,01% respectivamente. T5, contendo 2% de gordura láctea adicionada e de 2% WPC, foi a formulação que apresentou a menor redução calórica quando comparada ao controle T1, apenas 4,09%, pela maior contribuição energética do WPC, quando comparada à inulina, e também por apresentar um residual lipídico de outros ingredientes da formulação, além do creme de leite.

Segundo a AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2003b), porção é a quantidade média do alimento que deveria ser consumida por pessoas sadias, maiores de 36 meses de idade, em cada ocasião de consumo, com a finalidade de promover uma alimentação saudável. Para sobremesas lácteas, como é o caso das musses desenvolvidas no presente trabalho, a AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2003a) propõe a porção de 120 g, sendo a medida caseira associada igual a ½ xícara de chá. A quantidade mínima diária recomendada de inulina ou oligofrutose na porção do produto para a alegação de efeito prebiótico é de 3g (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008). Dessa forma, todas as formulações preenchem os requisitos mínimos necessários quanto ao teor prebiótico segundo a legislação nacional e a alegação "Os frutooligossacarídeos – FOS contribuem para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis" poderia ser utilizada nesses produtos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008).

A informação nutricional comparativa é apresentada para confrontar as formulações modificadas quanto à adição de gordura láctea, inulina e WPC, em relação à formulação controle T1 (**tabela 8**), no sentido de verificar se tais modificações atendem os requisitos exigidos pela legislação vigente (BRASIL, 1998). O termo "teor reduzido" ou "light" para lipídeos pode ser utilizado se houver uma redução mínima de 25% e uma diferença maior que 3 g de gordura. Para VET, os mesmos termos serão usados se houver uma redução em 40 kcal em alimento sólidos com a substituição de ingrediente, quando comparado ao produto original. Para proteínas e fibras, o termo "aumentado" pode ser utilizado quando houver um aumento mínimo de 25% e uma diferença maior que 10% da ingestão diária recomendada (IDR) para proteínas (o que corresponderia a pelo menos 7,5 g, considerando o valor de referência de 75 g/dia) e de 3 g para fibras no produto

modificado, quando comparado ao original (BRASIL, 1998; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003b).

Tabela 8: Modificação no valor nutricional das musses T2 a T7, quando comparadas à musse controle T1 (vide tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7).

	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Diferença em massa do teor de gordura (g) em relação a T1	3,83	3,24	2,11	1,28	3,79	3,15
Redução de gordura (%) em relação a T1	82,75	70,14	45,55	27,69	81,87	68,21
Aumento em massa (g) do teor de proteínas em relação a T1	-0,29	3,20	-0,38	1,84	1,45	0,91
Aumento de proteínas (%) em relação a T1	-6,12	66,94	-7,93	38,51	30,43	19,14
Aumento em massa (g) do teor de fibras em relação a T1	4,03	0,04	2,02	0,02	2,02	1,36
Aumento de fibras (%) em relação a T1	64,80	0,60	32,53	0,37	32,53	21,81

Analisando a **tabela 8**, observa-se que apesar de várias formulações estarem adequadas em relação ao item de redução ou aumento em 25%, elas não se encaixam no segundo item (diferença de nutriente em massa ou energia em relação ao controle T1, ou aumento do nutriente superior a 10% da IDR), com exceção das musses T2, T3, T6 e T7 para gorduras totais e da musse T2 em relação a fibras. Assim, as musses T2, T3, T6 e T7 podem receber a alegação "teor reduzido de gordura" como informação complementar comparativa em relação ao controle T1. Por outro lado, a musse T2 é a única formulação na qual poderia constar o atributo "aumentado" para fibras como informação nutricional complementar, se comparada ao controle T1. No entanto, em todas as formulações de musse poderia constar a alegação "alto teor de fibras", referente ao conteúdo absoluto de FAT (**tabela 3**), pois todas apresentam teor deste nutriente superior a 6 g em 100 g de musse (BRASIL, 1998).

Com relação à informação nutricional complementar referente ao conteúdo absoluto de gorduras totais, com exceção de T1 e T5, as musses apresentaram teor lipídico inferior a 3g/ 100g (**tabela 3**) e a alegação "baixo teor de gordura" poderia constar no seu rótulo (BRASIL, 1998). As musses T2, T3, T6 e T7, que apresentaram teor absoluto de lipídios saturados inferior a 1,5g /100 g, sendo que

a energia fornecida por esses lipídios foi inferior a 10% do seu VET (**tabelas 5 e 7**), poderiam apresentar no rótulo a alegação "baixo teor de gordura saturada" (BRASIL, 1998). A informação "não contém" seria expressa para o teor absoluto de gordura trans em todas as formulações, pois o conteúdo deste nutriente foi inferior a 0,2 g por porção de musse (**tabelas 4 e 5**) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003b).

A informação nutricional de cada uma das formulações de musse estudadas no presente trabalho, segundo as normas da AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2003b, 2008) está disponível no final deste relatório, nos **anexos 3 a 9**. Para esse fim, foi estabelecida para cada formulação a porção de 120 g para sobremesas lácteas, equivalente à quantidade de ½ xícara de chá, para compor a informação nutricional para fins de rotulagem desses produtos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003a).

4.1.4 Valores de pH

Os valores de pH obtidos ao longo do armazenamento das musses armazenadas sob refrigeração e congelamento são apresentados na **tabela 9**. Ao longo de todo o período estudado, os valores médios de pH foram significativamente mais elevados para a musse T3, contendo 4% de WPC ($p<0,05$) em ambas as formas de armazenamento. De modo geral, as musses T1 (4% de gordura láctea adicionada) e T4 (2% de gordura láctea adicionada + 2% de inulina) apresentaram os valores de pH mais baixos nas diferentes temperaturas de armazenamento. Uma pequena, porém significativa redução do pH foi observada com o congelamento das musses T3, T4 e T5, quando comparado ao produto armazenado sob refrigeração ($p<0,05$).

Possivelmente, as variações no pH entre os tratamentos são decorrentes do teor de sólidos de origem não-lipídica das diferentes musses, com destaque para as musses adicionadas de WPC. Segundo ANTUNES *et al.* (2005), o WPC resulta em um aumento da capacidade tamponante do meio no qual é adicionado, devido às proteínas e fosfatos presentes. Esse fato pode explicar os valores de pH mais elevados nas musses contendo esse ingrediente.

Tabela 9: Valores de pH (média ± desvio padrão) obtidos para as musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) por até 28 dias e sob congelamento (–18±3°C) por até 112 dias (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7).

Temperatura de armazenamento	Tempo (dias)	pH						
		Musses#						
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
4±1°C	1	4,88±0,01^{Ec}	5,02±0,03^{Dc}	5,34±0,01^{Ad}	4,98±0,04^{Da}	5,27±0,07^{ABa}	5,20±0,02^{Bc}	5,11±0,01^{Cd}
	7	4,99±0,02^{Eb}	5,28±0,02^{Ca}	5,45±0,03^{Aab}	5,05±0,03^{DEa}	5,08±0,03^{Dc}	5,09±0,01^{De}	5,37±0,05^{Ba}
	14	5,04±0,03^{Da}	5,22±0,01^{Bb}	5,42±0,01^{Ab}	5,07±0,01^{Da}	5,15±0,01^{Cb}	5,16±0,02^{Cd}	5,06±0,01^{De}
	21	5,01±0,02^{Db}	4,99±0,02^{Dc}	5,37±0,01^{Ac}	4,99±0,03^{Da}	5,28±0,08^{Ba}	5,25±0,01^{Ba}	5,17±0,01^{Cc}
	28	4,99±0,03^{Db}	4,99±0,01^{Dc}	5,46±0,01^{Aa}	5,02±0,03^{Da}	5,30±0,02^{Ba}	5,23±0,01^{Cb}	5,24±0,00^{Cb}
	Média geral (tratamentos)	4,98±0,06	5,10±0,13	5,41±0,05	5,02±0,04	5,21±0,10	5,18±0,06	5,19±0,11
–18±3°C	7	4,87±0,01^{Fd}	5,26±0,03^{Ba}	5,45±0,02^{Aa}	5,04±0,05^{Ea}	5,13±0,01^{CDab}	5,08±0,02^{DEc}	5,15±0,01^{Ca}
	35	4,84±0,01^{Fd}	5,13±0,04^{CDb}	5,33±0,00^{Ab}	5,00±0,03^{Eac}	5,07±0,03^{Dbc}	5,16±0,03^{BCb}	5,21±0,01^{Ba}
	56	5,00±0,01^{Db}	5,09±0,01^{Cbc}	5,31±0,02^{Ab}	5,00±0,02^{Dab}	5,18±0,01^{Ba}	5,29±0,00^{Aa}	5,19±0,00^{Ba}
	84	5,09±0,01^{Ca}	5,04±0,02^{CDc}	5,31±0,01^{Ab}	4,94±0,01^{Ec}	5,02±0,01^{Dc}	5,16±0,02^{Bb}	5,18±0,00^{Ba}
	112	4,94±0,02^{Ec}	5,04±0,01^{Dc}	5,32±0,02^{Ab}	4,97±0,01^{Ebc}	5,12±0,02^{Cb}	5,18±0,01^{Bb}	5,16±0,01^{BCa}
	Média geral (tratamentos)	4,95±0,09	5,11±0,09	5,34±0,06*	4,99±0,04*	5,10±0,06*	5,17±0,07	5,18±0,02

Resultados com variâncias homogêneas entre os tratamentos para cada tempo e ao longo do armazenamento para cada tratamento ($p>0,05$), exceto para as amostras refrigeradas no 1º e ao 21º dia.

A,B letras maiúsculas sobrescritas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as diferentes formulações de musse para um mesmo dia e temperatura de armazenamento.

a,b letras minúsculas sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre os diferentes dias para uma mesma formulação de musse em uma mesma temperatura de armazenamento.

* na mesma coluna, para a média geral de uma mesma formulação de musse, indica diferença significativa entre o armazenamento refrigerado e o congelado ($p<0,05$).

4.2 Viabilidade do microrganismo probiótico nas musses ao longo do armazenamento

A viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La-5 nas musses armazenadas sob refrigeração iniciou-se superior a 7,5 log UFC/g ao 1º dia de armazenamento para todas as musses. Até o 7º dia de armazenamento, as musses refrigeradas ainda não apresentavam diferenças significativas entre si ($p>0,05$) nesse período de amostragem (**tabela 10**). No entanto, a musse controle T1 aos 7 dias já apresentava redução significativa ($p<0,05$), na viabilidade do probiótico em relação ao dia de sua produção (dia 0), embora seja uma redução pequena em termos microbiológicos (inferior a 0,3 log).

Aos 14 dias de armazenamento, todas as musses armazenadas sob refrigeração apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$) nas populações de *Lactobacillus acidophilus* em relação ao dia 0, sendo superior a 1 log para as musses T1, T2 e T4. Para as musses T3, T5, T6 e T7, todas contendo WPC em sua composição, essa diminuição foi um pouco menor, não alcançando 1 log aos 14 dias.

Para as musses T1, T2 e T4, a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* já era inferior a 6 log UFC/g aos 21 dias de armazenamento. Ao contrário, para as musses T3, T5, T6 e T7, todas contendo WPC, a população do probiótico foi sempre superior a 6 log UFC/g, valor mínimo requerido para efeito probiótico *in vivo* (TALWALKAR *et al.*, 2004; MORENO *et al.*, 2006), diferindo significativamente das demais musses aos 28 dias de armazenamento ($p<0,05$). As musses refrigeradas contendo WPC até o 28º dia e as demais até o 14º dia estão de acordo com a legislação nacional vigente para alimentos probióticos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008), se considerarmos o consumo diário de 120 g, porção proposta pela AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2003a) para sobremesas lácteas, o que resultará em populações de *Lactobacillus acidophilus* superiores a 8 log UFC/ porção de musse.

Tabela 10: Populações de *Lactobacillus acidophilus* (média ± desvio padrão) obtidas para as musses T1 a T7, armazenados sob refrigeração (4±1°C) por até 28 dias e sob congelamento (–18±3°C) por até 112 dias (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7).

Temperatura de armazenamento	Tempo (dias)	Populações de *Lactobacillus acidophilus* (log UFC/g)[#]						
		Musses						
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
4±1°C	0	7,77±0,11^{Aa}	7,77±0,05^{Aa}	7,62±0,11^{Aa}	7,63±0,05^{Aa}	7,61±0,04^{Aa}	7,77±0,06^{Aa}	7,72±0,09^{Aa}
	1	7,69±0,12^{Aab}	7,73±0,01^{Aa}	7,61±0,08^{Aa}	7,61±0,07^{Aa}	7,72±0,09^{Aa}	7,77±0,04^{Aa}	7,67±0,05^{Aa}
	7	7,41±0,18^{Ab}	7,50±0,03^{Aa}	7,57±0,07^{Aa}	7,48±0,16^{Aa}	7,48±0,14^{Aa}	7,53±0,05^{Aa}	7,44±0,12^{Aa}
	14	6,30±0,09^{Cc}	6,68±0,04^{Bb}	6,93±0,01^{ABb}	6,48±0,04^{BCb}	7,00±0,08^{ABb}	7,10±0,04^{Ab}	7,06±0,05^{Ab}
	21	5,72±0,08^{Bd}	5,91±0,09^{Bc}	6,83±0,18^{Abc}	5,26±0,24^{Cc}	6,74±0,01^{Abc}	6,86±0,02^{Abc}	6,71±0,07^{Ac}
	28	5,06±0,03^{Be}	5,25±0,04^{Bd}	6,47±0,10^{Ac}	4,62±0,25^{Cd}	6,25±0,10^{Ac}	6,24±0,05^{Ac}	6,47±0,10^{Ac}
	Média geral (tratamentos)	6,66±1,07	6,81±0,99	7,17±0,47	6,51±1,24	7,13±0,54	7,21±0,56	7,18±0,49
–18±3°C	0	7,77±0,11^{Aa}	7,77±0,05^{Aa}	7,62±0,11^{Aab}	7,63±0,05^{Aa}	7,61±0,04^{Aa}	7,77±0,06^{Aa}	7,72±0,09^{Aa}
	7	7,84±0,07^{Aa}	7,85±0,07^{Aa}	7,86±0,04^{Aa}	7,68±0,03^{ABa}	7,73±0,07^{ABa}	7,54±0,13^{Ba}	7,65±0,08^{ABa}
	35	7,63±0,06^{Aa}	7,77±0,09^{Aa}	7,72±0,12^{Aab}	7,61±0,09^{Aa}	7,52±0,15^{Aa}	7,67±0,02^{Aa}	7,58±0,10^{Aa}
	56	7,63±0,11^{Aa}	7,66±0,02^{Aa}	7,69±0,01^{Aab}	7,64±0,16^{Aa}	7,62±0,11^{Aa}	7,76±0,07^{Aa}	7,66±0,07^{Aa}
	84	7,68±0,05^{Aa}	7,72±0,09^{Aa}	7,64±0,14^{Aab}	7,60±0,06^{Aa}	7,52±0,12^{Aa}	7,60±0,05^{Aa}	7,50±0,04^{Aa}
	112	7,66±0,05^{Aa}	7,67±0,05^{Aa}	7,59±0,04^{Ab}	7,60±0,06^{Aa}	7,48±0,04^{Aa}	7,57±0,10^{Aa}	7,51±0,11^{Aa}
	Média geral (tratamentos)	7,70±0,10*	7,74±0,09*	7,69±0,12*	7,63±0,08*	7,58±0,12*	7,65±0,11*	7,61±0,11*

[#] Resultados com variâncias homogêneas entre os tratamentos para cada tempo e ao longo do armazenamento para cada tratamento ($p>0,01$).

[A,B] letras maiúsculas sobrescritas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as diferentes formulações de musse para um mesmo dia e temperatura de armazenamento.

[a,b] letras minúsculas sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre os diferentes dias para uma mesma formulação de musse em uma mesma temperatura de armazenamento.

* na mesma coluna, para a média geral de uma mesma formulação de musse, indica diferença significativa entre o armazenamento refrigerado e o congelado ($p<0,05$).

É possível que a maior viabilidade do probiótico ao final do armazenamento refrigerado das musses T3, T5, T6 e T7 decorreu do maior conteúdo de nitrogênio disponível nessas formulações, resultante da adição do WPC (MARTÍN-DIANA *et al.*, 2003; JANER *et al.*, 2004). Provavelmente, esse ingrediente foi utilizado como fonte nutricional preferivelmente à inulina ao longo do armazenamento, o que teria impedido a morte de um número maior de células de *Lactobacillus acidophilus*. Os valores de pH mais elevados nas musses contendo WPC podem, também, ter contribuído para a maior viabilidade do probiótico ao final do armazenamento.

Embora seja conhecido que algumas cepas de lactobacilos são aptas a degradar inulina e oligofrutose (KAPLAN & HUTIKINS, 2000; MAKRAS *et al.*, 2005), o armazenamento em baixas temperaturas teria impedido a utilização dos frutanos como fonte nutricional pelo probiótico *Lactobacillus acidophilus* La-5 no presente trabalho, do mesmo modo como ocorreu em trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa também com cepas de lactobacilos (*Lactobacillus acidophilus* Lac 4 e *Lactobacillus paracasei* LBC 82) que não foram aptas a degradar inulina e/ou oligofrutose em condições aeróbicas (atmosfera normal) e em temperatura de refrigeração a 4±1°C (BURITI *et al.*, 2007a; CARDARELLI *et al.*, 2008b). Do mesmo modo, o elevado grau de polimerização da inulina, que pode chegar a 60, dificulta ainda mais a sua fermentação pelas cepas de lactobacilos (MURPHY, 2001; BURITI *et al.*, 2007a). Por outro lado, o WPC é um ingrediente constituído de peptídeos e aminoácidos, que podem ser mais bem aproveitados por parte do microrganismo probiótico, em comparação aos demais ingredientes adicionados à musse. Dessa forma, os nutrientes do WPC podem aumentar ainda mais a sobrevivência de bactérias probióticas de baixa atividade proteolítica, como é o caso de cepas de *Lactobacillus acidophilus* (McCOMAS JR & GILLILAND, 2003; LISERRE *et al.*, 2007).

Para as musses armazenadas sob congelamento, a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* foi superior a 7,5 log UFC/g no início do armazenamento de todas as musses estudadas, havendo a manutenção dessas populações de probiótico até 112 dias de armazenamento. Dessa forma, as musses congeladas estão de acordo com a legislação nacional vigente (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008) ao longo de todo o seu armazenamento, considerando a porção de 120 g para sobremesas lácteas (AGÊNCIA NACIONAL

DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003a). De acordo com CONRAD *et al.* (2000), o congelamento representa uma situação mais estável para a conservação de biomoléculas e microrganismos, quando comparado à refrigeração. Em baixas temperaturas, como a –20°C, por exemplo, a mortalidade dos microrganismos ocorre em uma velocidade menor, comparada à manutenção do produto a 0°C. Os microrganismos sobreviventes ao processo de congelamento tendem a se manter estáveis ao longo do armazenamento do produto (MAGARIÑOS *et al.*, 2007). Esse fato poderia, no presente trabalho, ter favorecido a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* nas musses congeladas. De modo geral, a substituição da gordura láctea por inulina ou WPC não resultou em alteração da viabilidade do probiótico nos produtos congelados, uma vez que diferenças significativas somente foram observadas entre a musse T6 (2% de inulina + 2% de WPC) e as musses T1, T2 e T3 aos 7 dias de armazenamento ($p<0,05$).

Para uma explicação mais detalhada das interações entre as variáveis gordura láctea (x_1), inulina (x_2) e WPC (x_3) nas musses estudadas sobre a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* no produto refrigerado, foram testados os modelos de regressão linear, quadrático e cúbico especial para essa variável, considerando $p<0,05$, para os resultados obtidos aos 14 dias de armazenamento, no qual todos os tratamentos ainda mantinham populações aceitáveis do probiótico para obtenção de efeitos benéficos *in vivo* e por apresentar variâncias homogêneas e diferenças significativas entre os tratamentos ($p<0,05$). Os modelos linear e quadrático (com a eliminação da interação x_1x_2 não significativa, $p>0,05$) testados foram estatisticamente significativos ($p<0,01$, em ambos os casos). No entanto, apresentaram falta de ajuste significativa ($p<0,01$ e $p=0,018$, respectivamente), não sendo, portanto, suficientes para explicar os resultados obtidos. Assim, o modelo cúbico especial, com a eliminação da interação x_1x_2 não significativa ($p>0,05$), foi selecionado por ser significativo ($p<0,01$), possuir falta de ajuste não significativa ($p=0,667$) e coeficiente de determinação (R^2) elevado, sendo capaz de explicar 97,63% da variação observada. Os coeficientes do modelo cúbico especial obtido, calculado por regressão múltipla, a partir dos resultados da viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* nas musses refrigeradas aos 14 dias de armazenamento e a análise de variância detalhada do mesmo modelo são apresentados, respectivamente nas **tabelas 11 e 12**.

Tabela 11: Coeficientes calculados por regressão múltipla e respectivos erros-padrão e intervalos de confiança (IC) de 95% obtidos para o modelo cúbico especial a partir dos resultados de populações de *Lactobacillus acidophilus* nas musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) aos 14 dias (x_1 = gordura láctea, x_2 = inulina e x_3 = WPC).

	x_1	x_2	x_3	x_1x_3	x_2x_3	$x_1x_2x_3$
Coeficientes	6,29	6,68	6,93	1,55	1,16	3,30
Erro-padrão	0,03	0,03	0,03	0,15	0,15	0,99
IC 95%	[6,24; 6,36]	[6,62; 6,74]	[6,87; 7,00]	[1,24; 1,87]	[0,87; 1,48]	[1,20; 5,41]
p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Tabela 12: Análise de variância obtida para o modelo cúbico especial para os resultados de populações de *Lactobacillus acidophilus* nas musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) aos 14 dias.

Causas de Variação	**Soma Quadrática**	**Graus de Liberdade**	**Quadrado Médio**	**F calculado**	**p**
Regressão	1,738671	5	0,347734	123,3829	<0,01
Resíduo	0,042275	15	0,002818		
Falta de ajuste	0,000575	1	0,000575	0,1930	0,667156
Erro puro	0,041700	14	0,002979		
Total	1,780946	20	0,089047		
R^2	0,976263				
R^2 ajustado	0,968350				

Dessa forma, o modelo de regressão múltipla do tipo cúbico especial obtido para a variável população de *Lactobacillus acidophilus* nas musses aos 14 dias de armazenamento refrigerado é representado pela equação a seguir:

$$\hat{y}_{(1)} = 6{,}29x_1 + 6{,}68x_2 + 6{,}93x_3 + 1{,}55x_1x_3 + 1{,}16x_2x_3 + 3{,}30x_1x_2x_3$$

onde, $\hat{y}_{(1)}$ é o valor estimado da variável *Lactobacillus acidophilus* do produto refrigerado.

O modelo indica que a resposta população de *Lactobacillus acidophilus* aos 14 dias de armazenamento refrigerado foi dependente da presença de WPC nas formulações de musse, uma vez que as interações binárias x_1x_3 e x_2x_3 e a interação ternária $x_1x_2x_3$ foram significativas. Tais coeficientes foram positivos,

mostrando que a interação do WPC com a gordura láctea e/ou inulina pode resultar em aumento das populações de *Lactobacillus acidophilus*.

O modelo estatístico da viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* nas musses refrigeradas aos 14 dias de armazenamento está representado na **figura 3**, em diagrama triangular, no qual são indicadas as curvas de nível.

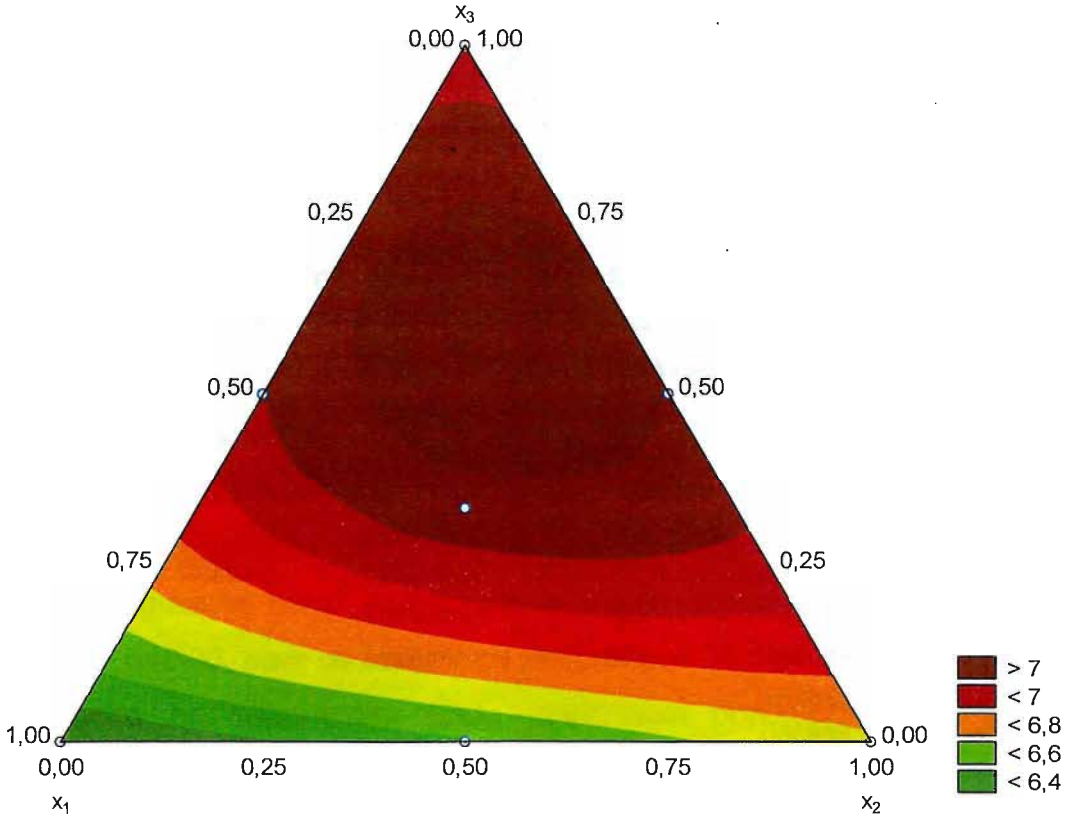


Figura 3: Diagrama triangular da viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* nas musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) aos 14 dias (x_1 = gordura láctea, x_2 = inulina e x_3 = WPC).

De acordo com esse modelo, as populações mais elevadas de *Lactobacillus acidophilus*, no produto refrigerado aos 14 dias, são obtidas quando a proporção de WPC está entre 2% e 3% nas formulações, região em que este ingrediente encontra-se entre os pontos 0,50 e 0,75 do diagrama (**figura 3**).

Para fins de divulgação das propriedades funcionais nos rótulos das musses estudadas, a alegação "O *Lactobacillus acidophilus* (probiótico) contribui para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma

alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis" (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008) poderia ser utilizada para os produtos refrigerados sem a adição de WPC com vida de prateleira de 14 dias. Para as musses refrigeradas contendo WPC e para todas as musses congeladas, essa alegação poderia ser utilizada, considerando a vida de prateleira de 28 e 112 dias, respectivamente. Para todos esses produtos, é obrigatória a declaração da quantidade do probiótico em unidades formadoras de colônias presente na porção diária do produto pronto para consumo (>10^8 UFC/ 120g) junto à referida alegação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008).

4.3 Parâmetros microbiológicos sanitários

Os microrganismos indicadores de contaminação coliformes totais e *Escherichia coli* não foram detectados durante os armazenamentos refrigerado e congelado das musses T1 a T7. Do mesmo modo, não foram encontradas colônias suspeitas de *Bacillus cereus* e *Salmonella* spp. nas musses analisadas. Por outro lado, *Staphylococcos* DNA-se positivos foram detectados em amostragens das musses refrigeradas e congelados (**tabela 13**), porém, nunca ultrapassando 2,7 log UFC/g, valor máximo permitido pela legislação nacional vigente tanto para sobremesas lácteas pasteurizadas refrigeradas como para sobremesas congeladas de base láctea (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001).

Para a análise estatística, considerou-se o fato de as contagens observadas para os microrganismos contaminantes estarem ou não abaixo do limite de sensibilidade do método utilizado para a determinação daqueles microrganismos (<1 log UFC/g para *Staphylococcus* DNAse positivos e bolores e leveduras). Para efeito de comparação entre os tratamentos e entre as diferentes condições de armazenamento, considerando $p<0,05$, o teste estatístico utilizou um valor de proporção menor ou igual à proporção de contagens superiores ao limite de sensibilidade dos testes microbiológicos (SOLER & YAMAGUCHI, 2004). No presente trabalho, essa proporção foi fixada em 50% para *Staphylococcus* DNAse positivos (pelo fato de a maior parte dos tratamentos apresentar mais de 50% de

amostras positivas para essa variável) e 30% para bolores e leveduras (uma vez que a proporção de amostras positivas não foi tão elevada para essa variável).

Para as amostras refrigeradas, as musses T3 e T6 apresentaram a menor contaminação para *Staphylococcus* DNAse positivos, diferindo significativamente das demais ($p<0,05$). Já para as amostras congeladas, as populações de *Staphylococcus* DNAse positivos foram significativamente menores para as musses T3, T6 e T7 ($p<0,05$). Observou-se, também, que o congelamento reduziu significativamente a contaminação para esse microrganismo na musse T7 ($p<0,05$).

Bolores e leveduras foram detectados em amostragens das musses refrigeradas e congeladas (**tabela 14**), porém as maiores populações (superiores a 2,7 log UFC/g) somente foram observadas aos 28 dias de armazenamento de algumas amostras das musses refrigeradas (nesses casos, já eram observadas colônias visíveis nas amostras). Por esse motivo, a análise sensorial dos produtos refrigerados foi limitada ao 21º dia para todos os tratamentos. Por outro lado, o congelamento reduziu significativamente ($p<0,05$) a contaminação por bolores e leveduras nas musses T2, T3 e T5.

Tabela 13: Populações de *Staphylococcus* DNAse-positivos* obtidas para as musses T1 a T7 armazenados sob refrigeração (4±1°C) por até 28 dias e sob congelamento (–18±3°C) por até 112 dias (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7).

Temperatura de armazenamento	Tempo (dias)		Populações de *Staphylococcus* DNAse positivos (log UFC/g)						
			Musses						
			T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
	0		<1 – 1,60	1,90 – 2,32	1,30 – 1,70	<1 – 1,48	2,23 – 2,40	<1 – 1,00	<1 – 1,00
		% amostras positivas (n.° amostras positivas/ n.° total de amostras × 100)	67 (2/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	33 (1/3)	100 (2/2)	33 (1/3)	33 (1/3)
	1		1,30 – 1,60	1,90 – 2,18	1,00 – 1,85	<1 – 1,60	1,00 – 2,32	<1	1,00
	7		<1 – 1,00	1,70 – 2,18	<1	<1 – 1,78	2,48 – 2,59	<1	<1
4±1°C	14		<1 – 2,26	2,20 – 2,32	<1	1,00 – 1,48	1,70 – 2,08	<1	<1 – 1,30
	21		1,00 – 2,30	1,85 – 2,23	<1 – 1,30	1,60 – 2,04	2,00 – 2,15	<1	<1 – 1,48
	28		1,00 – 1,78	2,08 – 2,41	<1	<1 – 1,30	<1 – 1,95	<1	<1 – 1,00
		% amostras positivas (n.° amostras positivas/ n.° total de amostras × 100)	80 (12/15)^{Aa}	100 (15/15)^{Aa}	33 (5/15)^{Bb}	67 (10/15)^{Aa}	93 (14/15)^{Aa}	0 (0/15)^{Ba}	53 (8/15)^{Aa}
	7		<1 – 2,23	<1 – 1,85	<1	<1 – 1,00	2,08 – 2,57	<1	<1 –1,30
	35		1,30 – 1,48	2,04 – 2,43	<1 – 1,30	<1 – 1,70	2,26 – 2,30	<1	<1
–18±3°C	56		1,70 – 1,78	1,85 – 2,40	<1	1,00 – 2,00	1,00 – 2,04	<1	<1 – 1,30
	84		<1 – 1,78	2,00 – 2,34	<1	1,78 – 2,04	1,30 – 2,04	<1	<1
	112		<1	1,30 – 1,70	<1 – 1,30	1,00 – 1,90	1,00 – 2,28	<1	<1 – 1,48
		% amostras positivas (n.° amostras positivas/ n.° total de amostras × 100)	67 (10/15)^{Aa}	93 (14/15)^{Aa}	20 (3/15)^{Bb}	80 (12/15)^{Aa}	100 (15/15)^{Aa}	0 (0/15)^{Ba}	20 (3/15)^{Bb}

* Valores mínimos – máximos das contagens obtidas para todas as amostras analisadas

A,B letras maiúsculas sobrescritas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as diferentes formulações de musse para uma mesma temperatura de armazenamento considerando todos os períodos de amostragens.

a,b letras minúsculas sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre os armazenamentos refrigerado e congelado para uma mesma formulação de musse.

Tabela 14: Populações de bolores e leveduras* obtidas para as musses T1 a T7, armazenados sob refrigeração (4±1°C) por até 28 dias e sob congelamento (–18±3°C) por até 112 dias (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7).

Temperatura de armazenamento	Tempo (dias)		Populações de bolores e leveduras (log UFC/g)						
			Musses						
			T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
	0		<1	<1 – 1,00	<1 – 1,00	<1	<1	<1	<1
		% amostras positivas (n.° amostras positivas/ n.° total de amostras × 100)	0 (0/5)	33 (1/3)	50 (1/2)	0 (0/3)	0 (0/2)	0 (0/3)	0 (0/3)
	1		<1	<1 – 1,00	<1	<1	<1	<1	<1
	7		<1	<1	<1	<1	<1 – 1,00	<1	<1
4±1°C	14		<1 – 1,00	<1	<1	<1	<1 – 1,00	<1	<1
	21		<1 – 1,00	2,20 – 2,28	1,00 – 2,04	<1	<1 – 1,00	<1	<1 – 2,08
	28		<1 – 2,45	1,00 – 2,28	2,59 – 4,10	<1 – 3,74	1,60 – 2,45	<1 – 1,95	2,56 – 3,11
		% amostras positivas (n.° amostras positivas/ n.° total de amostras × 100)	17 (5/30)^{Ba}	47 (7/15)^{Aa}	40 (6/15)^{Aa}	13 (2/15)^{Ba}	47 (7/15)^{Aa}	13 (2/15)^{Ba}	27 (4/15)^{Ba}
	7		<1 – 1,00	<1 – 1,00	<1	<1	<1	<1	<1
	35		<1	<1	<1 – 1,00	<1	<1	<1	<1
–18±3°C	56		<1	<1	<1 – 1,00	<1	<1	<1	<1
	84		<1	<1 – 1,00	<1 – 1,00	<1	<1	<1	<1 – 1,00
	112		<1	<1 – 1,00	<1	<1	<1	<1	<1
		% amostras positivas (n.° amostras positivas/ n.° total de amostras × 100)	4 (1/27)^{Ba}	27 (4/15)^{Bb}	27 (4/15)^{Bb}	0 (0/15)^{Ba}	0 (0/15)^{Bb}	0 (0/15)^{Ba}	7 (1/15)^{Ba}

* Valores mínimos – máximos das contagens obtidas para todas as amostras analisadas

^{A,B} letras maiúsculas sobrescritas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as diferentes formulações de musse para uma mesma temperatura de armazenamento considerando todos os períodos de amostragens.

^{a,b} letras minúsculas sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre os armazenamentos refrigerado e congelado para uma mesma formulação de musse.

4.4 Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* nas diferentes musses frente às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*.

A sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* nas musses T1 a T7 submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, ao longo dos armazenamentos refrigerado e congelado é apresentada nas **figuras 4 a 13**.

Ao primeiro dia de armazenamento refrigerado (**figura 4**), observa-se, para todas as musses, que a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* diminuiu em pelo menos 3 log na primeira meia hora de simulação das condições gastrintestinais *in vitro*. Ao longo da etapa ácida do ensaio, não houve alterações significativas ($p>0,05$) na sobrevivência do probiótico. Com exceção da musse T4, contendo 2% gordura láctea adicionada e 2% de inulina, houve uma redução significativa na sobrevivência do probiótico ($p<0,05$) entre o final da etapa ácida (2h) e as primeiras 2 horas da etapa entérica (4h) em pelo menos 1 log nas musses estudadas. A musse T4 apresentou manutenção da viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* superior a 3,5 log UFC/g entre 30 minutos e 6 horas de ensaio *in vitro*, sem alterações significativas nesse período ($p>0,05$). A musse controle T1 foi a formulação na qual o microrganismo probiótico apresentou o pior desempenho ao longo do ensaio *in vitro* no 1º dia de armazenamento sob refrigeração, não sendo mais detectado (<1,24 log UFC/g) ao final de 6h de ensaio. As musses T2, T4 e T7, todas contendo inulina em sua composição, apresentaram a maior sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* ao final de 6 h de simulação das condições gastrintestinais no 1º dia de armazenamento, 3,74 log UFC/g, 3,63 log UFC/g e 2,94 log UFC/g, respectivamente, não apresentando diferenças significativas entre si ($p>0,05$).

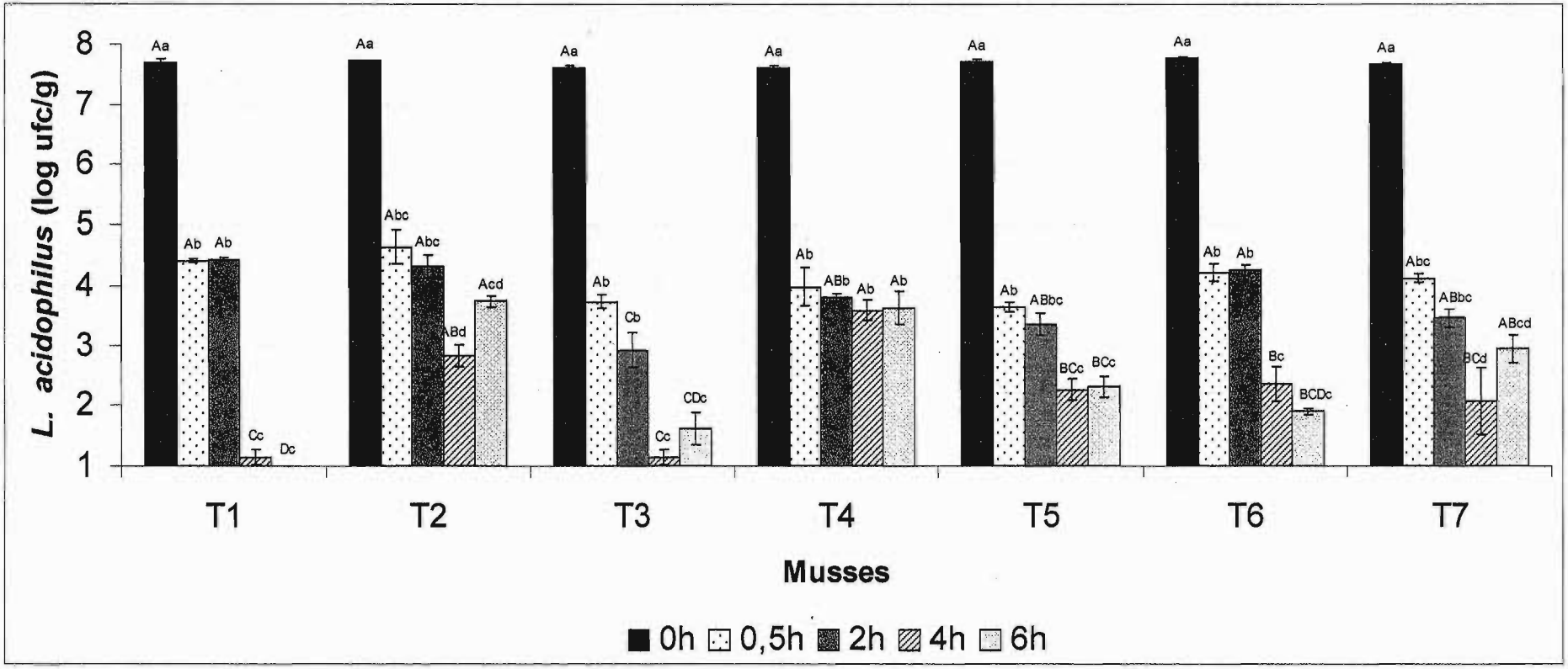


Figura 4: Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* nas musses T1 a T7 submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, após 1 dia de armazenamento sob refrigeração (4±1°C) (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7). Resultados com variâncias homogêneas entre os tratamentos para cada tempo e ao longo do armazenamento para cada tratamento ($p>0,01$). ^{A,B} letras maiúsculas sobrescritas distintas indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as diferentes formulações de musse para o 1º dia de armazenamento. ^{a,b} letras minúsculas sobrescritas distintas indicam diferenças significativas ($p<0,05$) em cada tempo de coleta ao longo do ensaio *in vitro* para uma mesma formulação.

A musse T7 (contendo 1,33% de gordura láctea adicionada, 1,33% de inulina e 1,33% de WPC) apresentou a maior sobrevivência do probiótico às condições gastrintestinais simuladas, com média de 3,52 log UFC/g, após 6 horas de ensaio *in vitro* aos 7 dias de armazenamento em comparação ao controle T1 e às musses T3 e T5 (**figura 5**), não diferindo significativamente das musses T2, T4 e T6 ($p>0,05$), todas preparadas com a adição de inulina. Ao contrário do observado no 1º dia de armazenamento, foi possível verificar uma tênue sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* após 4h e 6h de ensaio na musse controle T1 aos 7 dias de armazenamento, com populações médias de 1,47 log UFC/g e 1,80 log UFC/g, respectivamente.

Aos 14 dias após a fabricação das musses, as populações iniciais de *Lactobacillus acidophilus* já apresentavam diferenças significativas entre os vários tratamentos ($p<0,05$) e eram bastante reduzidas em relação às populações encontradas nas semanas anteriores, conforme foi discutido anteriormente no **item 4.2** (**tabela 10**). Dessa forma, a sobrevivência do probiótico ao longo do ensaio de simulação das condições gastrintestinais *in vitro* reduziu consideravelmente para todas as musses estudadas a partir do 14º dia, não sendo mais possível observar o efeito protetor dos ingredientes adicionados (inulina ou WPC), uma vez que não foram mais observadas diferenças significativas entre os tratamentos ao final de 6h de ensaio até o 28º dia ($p>0,05$). No entanto, sempre foi possível recuperar populações do probiótico ao final de 6 h ensaio até o último dia de armazenamento refrigerado nas musses T2 e T7, ambas suplementadas com inulina (**figuras 6 a 8**).

De modo geral, a adição de inulina em substituição à gordura do creme de leite nas musses refrigeradas foi significativamente mais favorável ($p<0,05$) à sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* frente às condições gástricas e entéricas simuladas em comparação à presença de WPC, principalmente até o 7º dia de armazenamento.

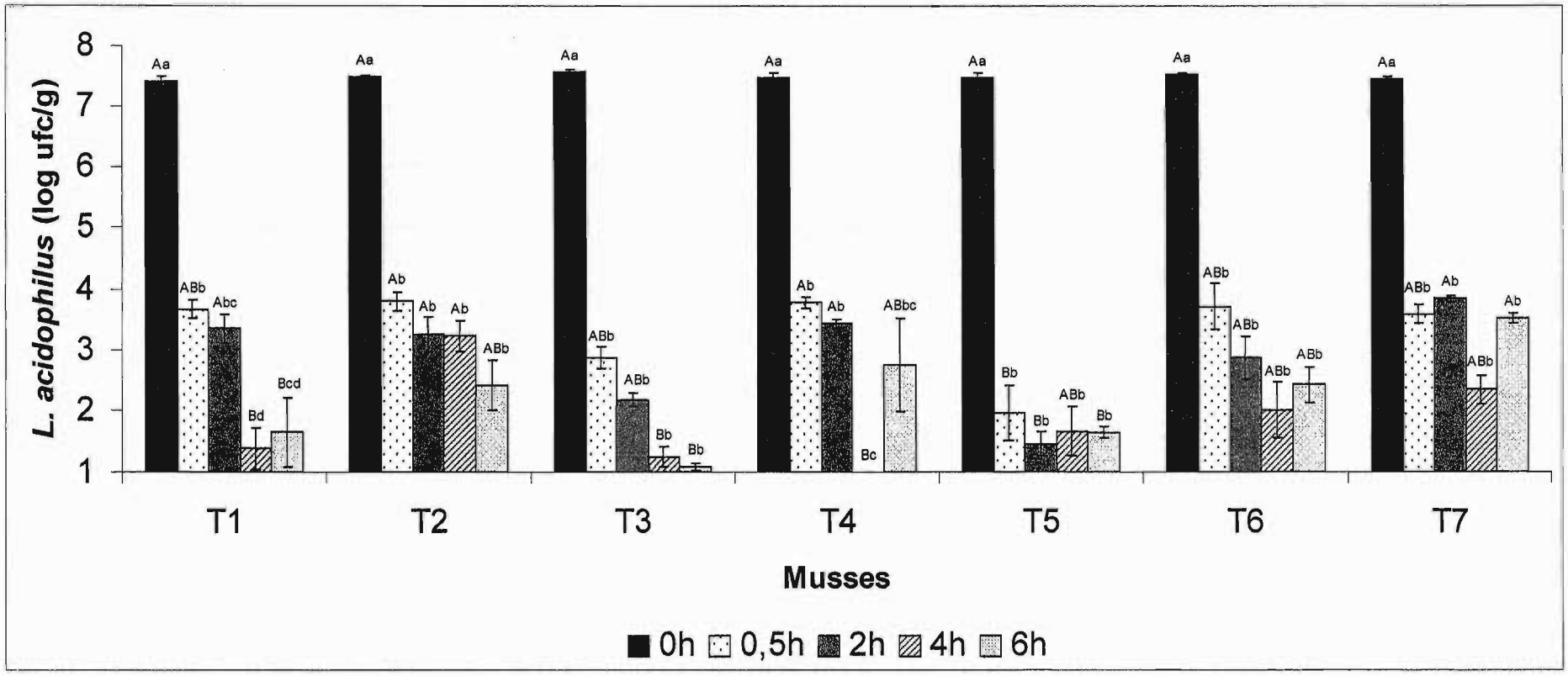


Figura 5: Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* nas musses T1 a T7 submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, após 7 dias de armazenamento sob refrigeração (4±1°C) (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7). Resultados com variâncias homogêneas entre os tratamentos para cada tempo e ao longo do armazenamento para cada tratamento (p>0,01). ^{A,B} letras maiúsculas sobrescritas distintas indicam diferenças significativas (p<0,05) entre as diferentes formulações de musse aos 7 dias de armazenamento. ^{a,b} letras minúsculas sobrescritas distintas indicam diferenças significativas (p<0,05) em cada tempo de coleta ao longo do ensaio *in vitro* para uma mesma formulação.

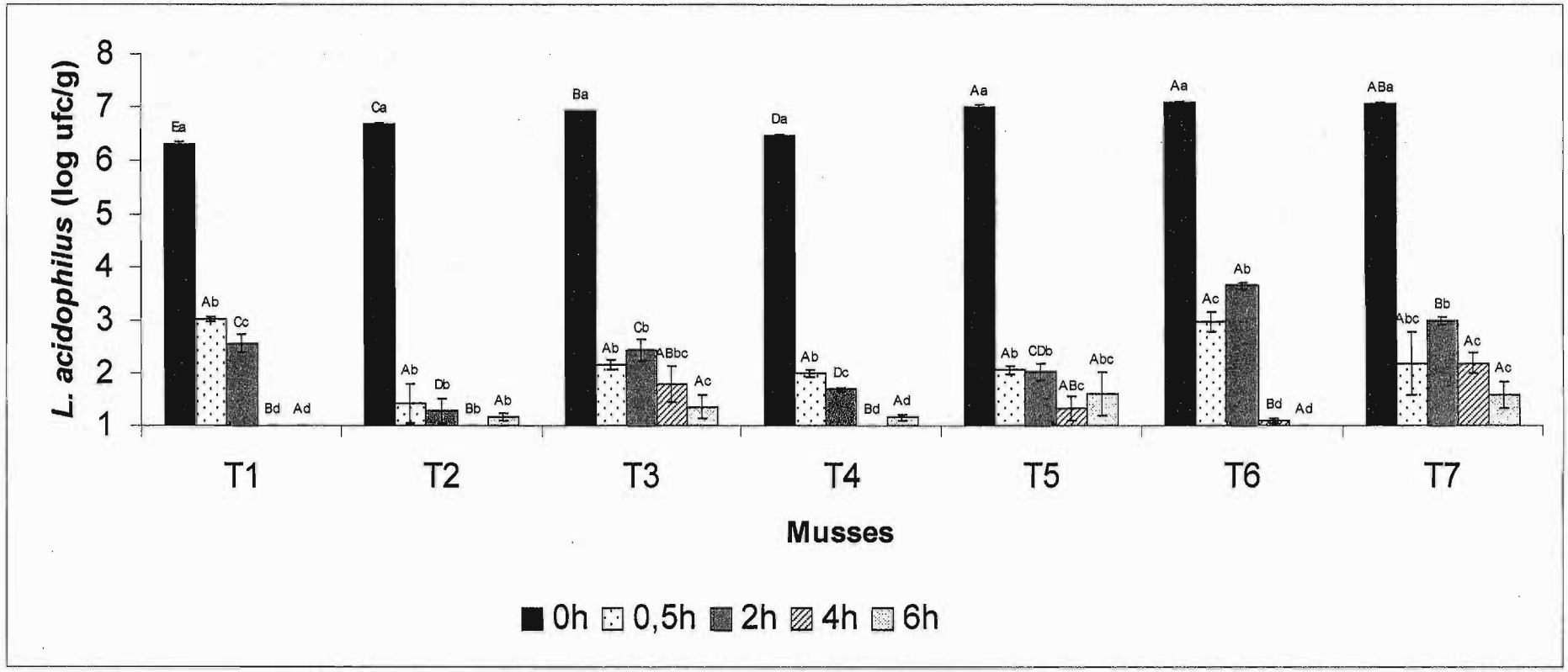


Figura 6: Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* nas musses T1 a T7 submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, após 14 dias de armazenamento sob refrigeração (4±1°C) (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7). Resultados com variâncias homogêneas entre os tratamentos para cada tempo e ao longo do armazenamento para cada tratamento ($p>0,01$). ^{A,B} letras maiúsculas sobrescritas distintas indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as diferentes formulações de musse aos 14 dias de armazenamento. ^{a,b} letras minúsculas sobrescritas distintas indicam diferenças significativas ($p<0,05$) em cada tempo de coleta ao longo do ensaio *in vitro* para uma mesma formulação.

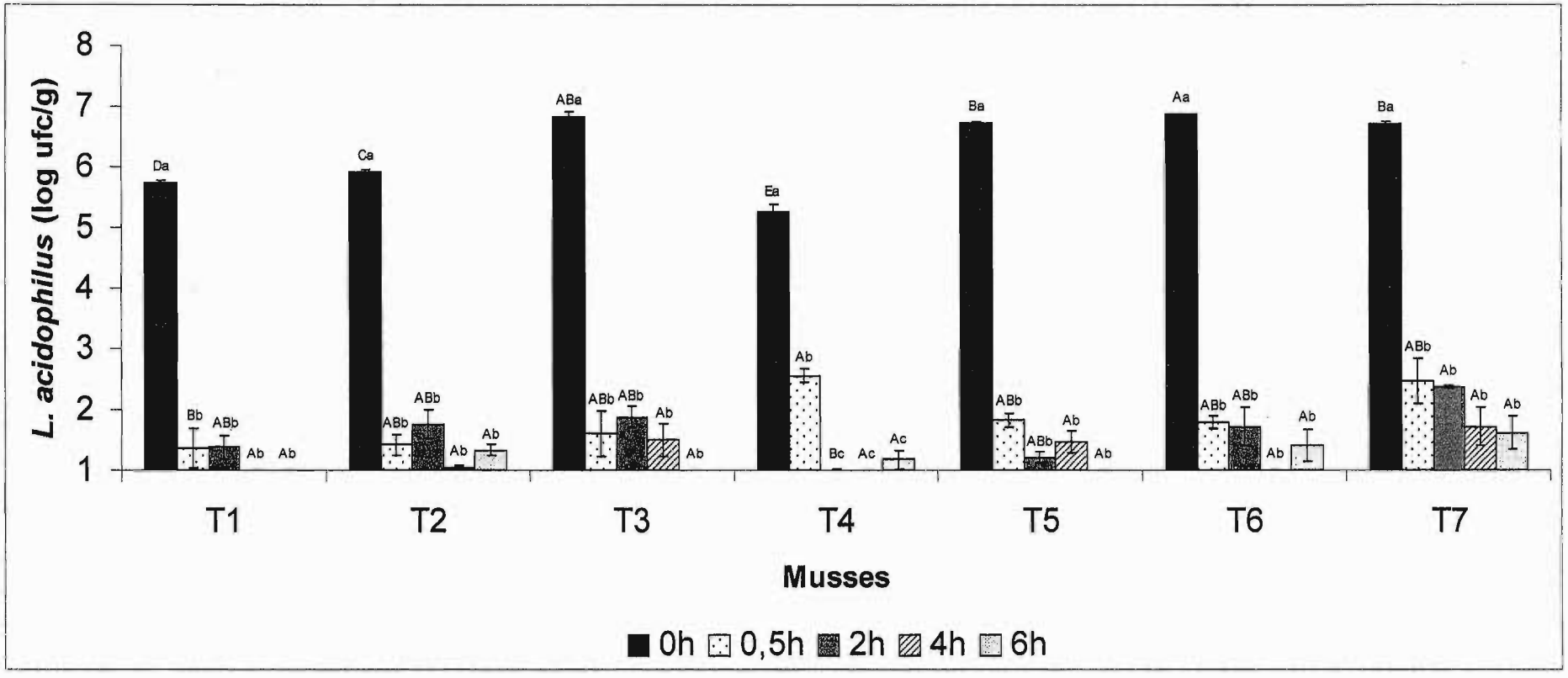


Figura 7: Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* nas musses T1 a T7 submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, após 21 dias de armazenamento sob refrigeração (4±1°C) (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7). Resultados com variâncias homogêneas entre os tratamentos para cada tempo e ao longo do armazenamento para cada tratamento ($p>0,01$). ^{A,B} letras maiúsculas sobrescritas distintas indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as diferentes formulações de musse aos 21 dias de armazenamento. ^{a,b} letras minúsculas sobrescritas distintas indicam diferenças significativas ($p<0,05$) em cada tempo de coleta ao longo do ensaio *in vitro* para uma mesma formulação.

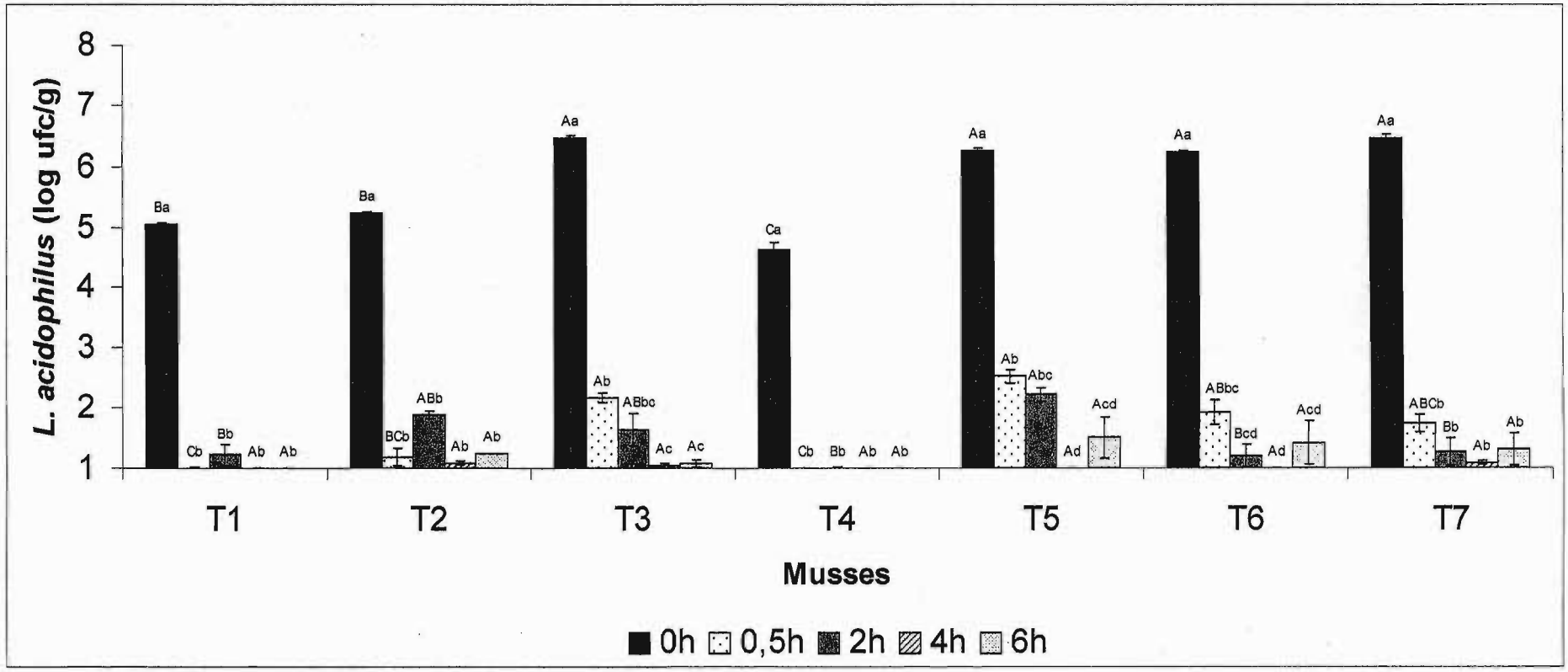


Figura 8: Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* nas musses T1 a T7 submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, após 28 dias de armazenamento sob refrigeração (4±1°C) (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7). Resultados com variâncias homogêneas entre os tratamentos para cada tempo e ao longo do armazenamento para cada tratamento ($p>0,01$). ^{A,B} letras maiúsculas sobrescritas distintas indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as diferentes formulações de musse aos 28 dias de armazenamento. ^{a,b} letras minúsculas sobrescritas distintas indicam diferenças significativas ($p<0,05$) em cada tempo de coleta ao longo do ensaio *in vitro* para uma mesma formulação.

Do mesmo modo que foi observado para as musses refrigeradas ao 1º e ao 7º dia de armazenamento, a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* diminuiu em pelo menos 3 log UFC/g na meia hora inicial de simulação das condições gastrintestinais *in vitro*, mantendo-se constante, sem redução significativa ($p>0,05$) até o final da etapa ácida (2h) nas musses congeladas ao longo de 112 dias de armazenamento (**figuras 9 a 13**).

Para a musse controle T1, o congelamento favoreceu a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* na simulação gastrintestinal *in vitro*, em que foi possível uma recuperação média do probiótico, ao final de 6 h de ensaio, de 2,5 log UFC/g ao longo de 112 dias de armazenamento. Esse benefício se estendeu também às demais formulações, considerando o tempo de armazenamento mais longo em que o microrganismo probiótico foi capaz de sobreviver ao ensaio *in vitro* no produto congelado, de modo bastante semelhante às musses refrigeradas na primeira semana após a sua fabricação (**figuras 4 e 5; 9 a 13**).

De maneira geral, *Lactobacillus acidophilus* sobreviveu de modo similar nas musses congeladas T3, T5, T6 e T7, todas contendo WPC, que não apresentaram diferenças significativas entre si ($p>0,05$) na maior parte do armazenamento (**figuras 9 a 13**), com exceção da musse T5 aos 56 dias, que apresentou sobrevivência do probiótico ao final de 6 h de ensaio igual a 3,14 log UFC/g, significativamente maior ($p<0,05$), comparada a T6 e T7, 1,24 log UFC/g e 1,46 log UFC/g, respectivamente (**figura 11**).

Exceto aos 112 dias de armazenamento, a musse congelada T4 apresentou sobrevivência do microrganismo probiótico superior a 3 log UFC/g ao final das 6 h de ensaio *in vitro*, diferindo significativamente de T3 aos 7 dias, de T6 aos 56 e 84 dias e de T7 aos 56 dias ($p<0,05$), musses nas quais a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* foi menor nos períodos citados. Esses dados sugerem que a inulina combinada apenas com a gordura do creme de leite (musse T4) foi mais favorável para a sobrevivência desse microrganismo às condições gastrintestinais simuladas durante a maior parte do armazenamento, enquanto que, a inulina adicionada juntamente ao WPC não possibilitou o mesmo desempenho do probiótico durante o ensaio *in vitro* quando incorporada às musses congeladas (T6 e T7).

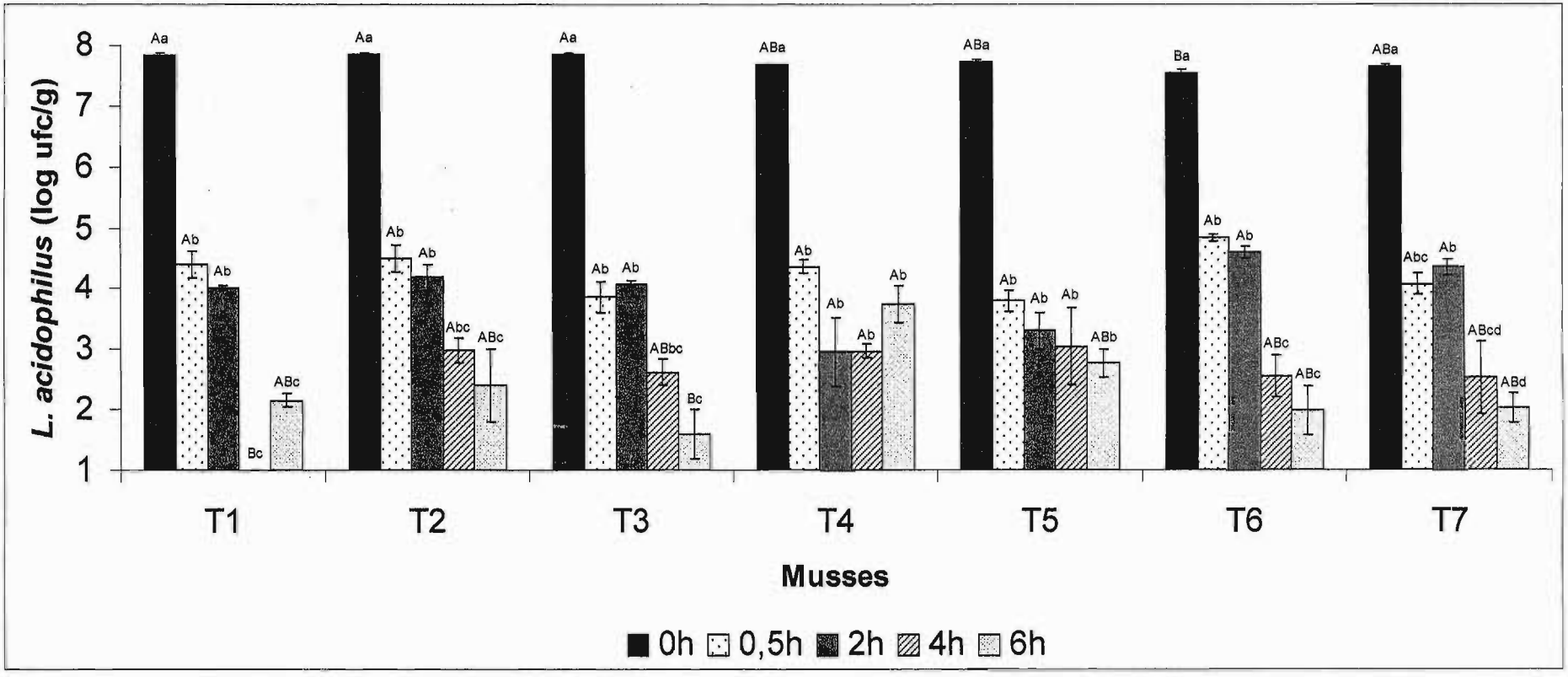


Figura 9: Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* nas musses T1 a T7 submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, após 7 dias de armazenamento sob congelamento (–18±3°C) (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7). Resultados com variâncias homogêneas entre os tratamentos para cada tempo e ao longo do armazenamento para cada tratamento ($p>0,01$). ^{A,B} letras maiúsculas sobrescritas distintas indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as diferentes formulações de musse aos 7 dias de armazenamento. ^{a,b} letras minúsculas sobrescritas distintas indicam diferenças significativas ($p<0,05$) em cada tempo de coleta ao longo do ensaio *in vitro* para uma mesma formulação.

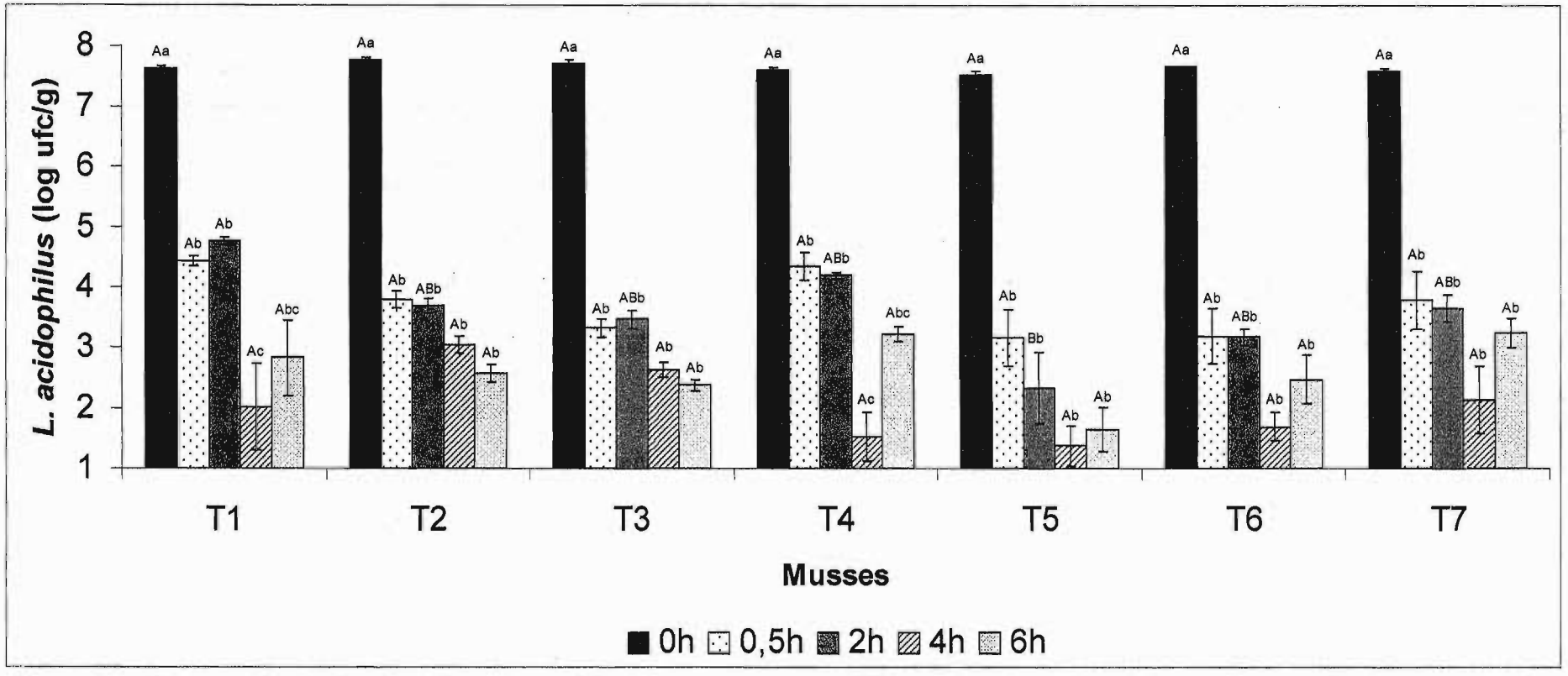


Figura 10: Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* nas musses T1 a T7 submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, após 35 dias de armazenamento sob congelamento (–18±3°C) (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7). Resultados com variâncias homogêneas entre os tratamentos para cada tempo e ao longo do armazenamento para cada tratamento ($p>0,01$). ^{A,B} letras maiúsculas sobrescritas distintas indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as diferentes formulações de musse aos 35 dias de armazenamento. ^{a,b} letras minúsculas sobrescritas distintas indicam diferenças significativas ($p<0,05$) em cada tempo de coleta ao longo do ensaio *in vitro* para uma mesma formulação.

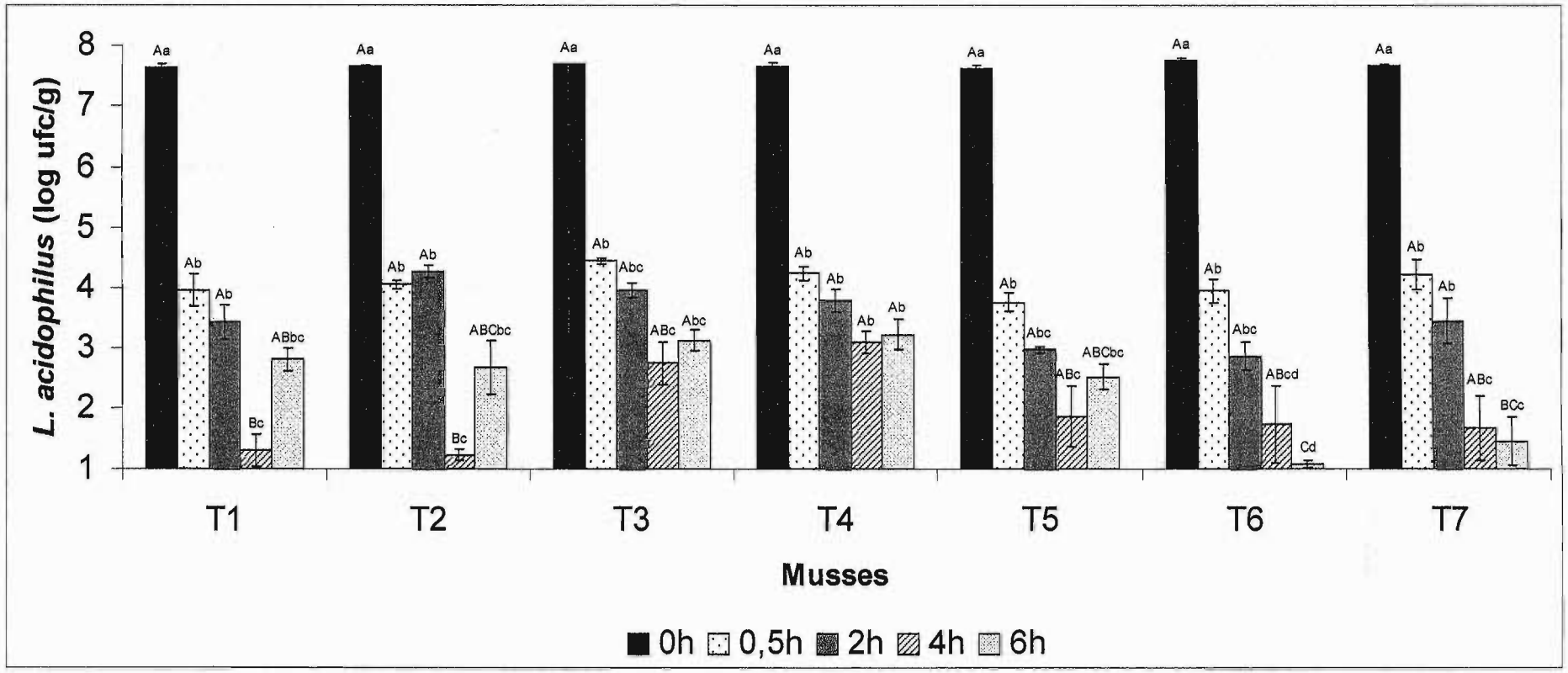


Figura 11: Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* nas musses T1 a T7 submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, após 56 dias de armazenamento sob congelamento (–18±3°C) (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7). Resultados com variâncias homogêneas entre os tratamentos para cada tempo e ao longo do armazenamento para cada tratamento ($p>0,01$). ^{A,B} letras maiúsculas sobrescritas distintas indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as diferentes formulações de musse aos 56 dias de armazenamento. ^{a,b} letras minúsculas sobrescritas distintas indicam diferenças significativas ($p<0,05$) em cada tempo de coleta ao longo do ensaio *in vitro* para uma mesma formulação.

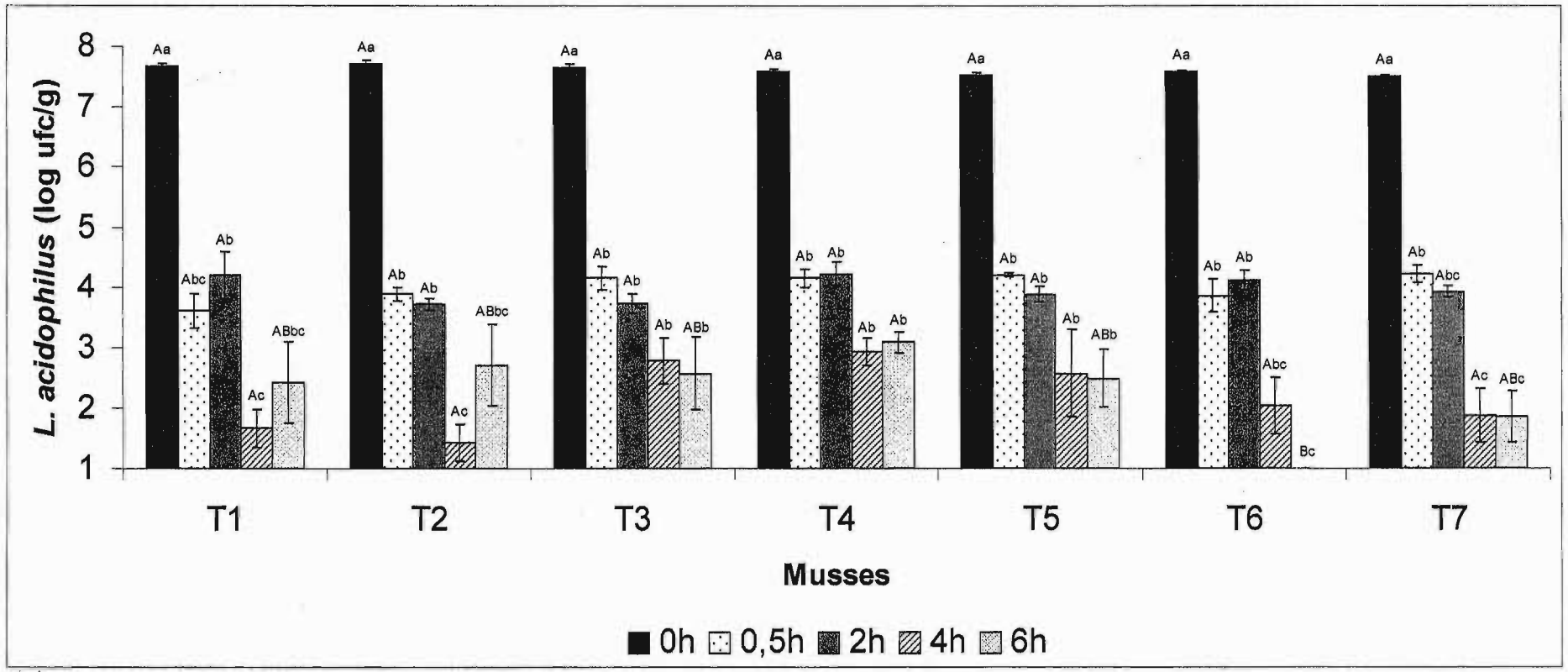


Figura 12: Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* nas musses T1 a T7 submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, após 84 dias de armazenamento sob congelamento (–18±3°C) (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7). Resultados com variâncias homogêneas entre os tratamentos para cada tempo e ao longo do armazenamento para cada tratamento ($p>0,01$). ^{A,B} letras maiúsculas sobrescritas distintas indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as diferentes formulações de musse aos 84 dias de armazenamento. ^{a,b} letras minúsculas sobrescritas distintas indicam diferenças significativas ($p<0,05$) em cada tempo de coleta ao longo do ensaio *in vitro* para uma mesma formulação.

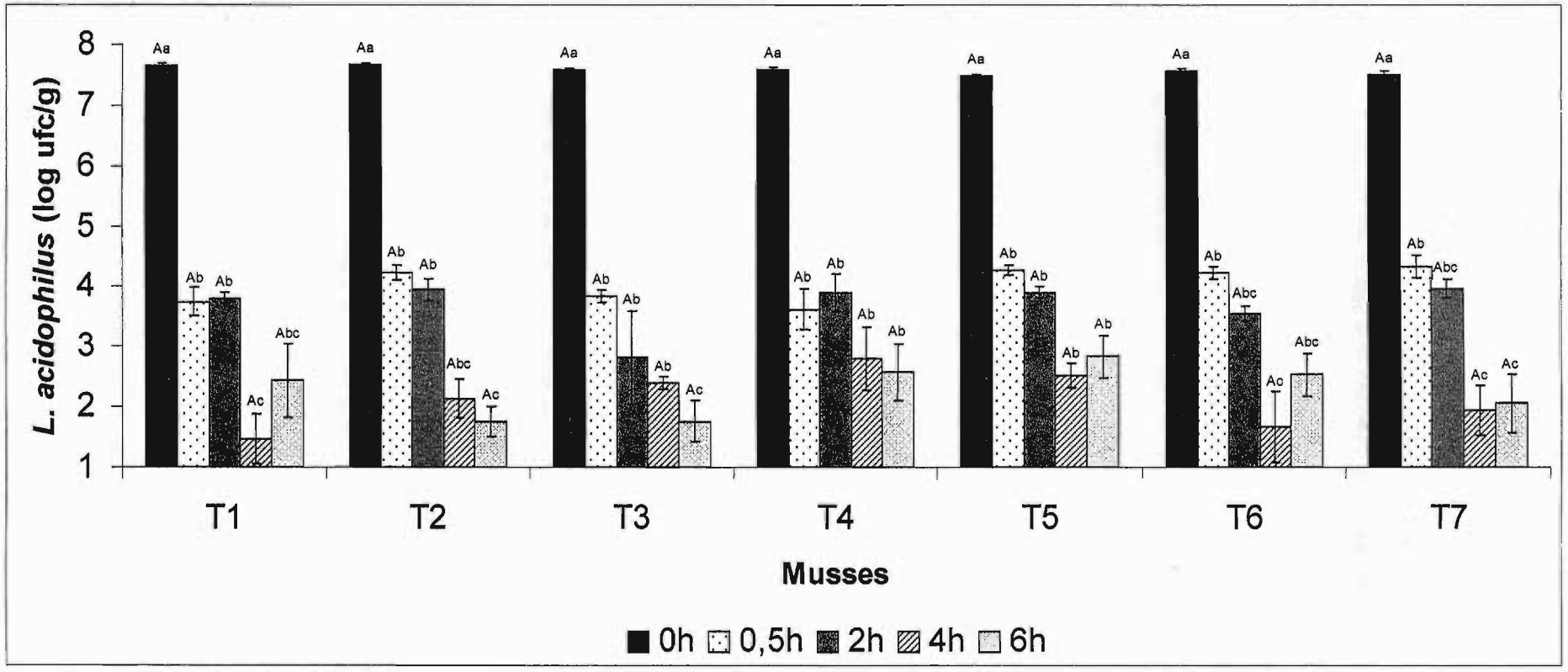


Figura 13: Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* nas musses T1 a T7 submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, após 112 dias de armazenamento sob congelamento (–18±3°C) (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7). Resultados com variâncias homogêneas entre os tratamentos para cada tempo e ao longo do armazenamento para cada tratamento ($p>0,01$). ^{A,B} letras maiúsculas sobrescritas distintas indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as diferentes formulações de musse aos 112 dias de armazenamento. ^{a,b} letras minúsculas sobrescritas distintas indicam diferenças significativas ($p<0,05$) em cada tempo de coleta ao longo do ensaio *in vitro* para uma mesma formulação.

É necessário destacar que, a manutenção das populações de *Lactobacillus acidophilus* acima de 7,5 log UFC/g nas musses congeladas ao longo de todo o armazenamento foi fundamental para a maior sobrevivência do probiótico durante ensaio *in vitro* por até 112 dias em todas as musses, se comparada à sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* nas musses refrigeradas a partir do 14º dia.

Para todas as musses estudadas no presente trabalho, foi possível observar uma enorme sensibilidade de *Lactobacillus acidophilus* ao HCl contendo pepsina, uma vez que a redução da viabilidade do probiótico na primeira meia hora de ensaio, em ambas as formas de armazenamento foi, em média, de 3 log UFC/g. No entanto, com poucas exceções, houve uma manutenção sem alterações significativas ($p<0,05$) dessa população de probiótico nos 90 minutos restantes da etapa ácida. SCHILLINGER *et al.* (2005) observaram que cepas de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus johnsonii* foram mais tolerantes ao suco gástrico simulado contendo pepsina, quando comparados a cepas de *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus.*

No presente estudo, foi observada uma susceptibilidade também grande de *Lactobacillus acidophilus* às etapas do ensaio contendo bile, já que houve redução significativa ($p<0,05$) na sobrevivência do probiótico entre as etapas ácida e entérica para a maioria das amostras. A bile é uma secreção digestiva que apresenta o papel principal na emulsificação e solubilização de lipídios. Dessa forma, ela também afeta os fosfolipídios e as proteínas das membranas celulares bacterianas, interrompendo a sua homeostase (BEGLEY *et al.*, 2005).

KRASAEKOOPT *et al.* (2004) observaram que células puras de *Lactobacillus acidophilus* LA 547 apresentaram uma redução de até 7 log UFC/g após 120 minutos de exposição a 0,6% de sais biliares em solução de pH 8,25. No presente trabalho, a redução da viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* durante as 6 horas de ensaio *in vitro* para a maioria das musses estudadas foi de, no máximo, 5 log UFC/g, dificilmente ultrapassando 2 log UFC/g durante as 4 horas de exposição à bile. Deve ser salientado que os componentes da dieta ou ingredientes alimentícios influenciam a sobrevivência das bactérias probióticas durante a sua passagem pelo TGI (KOS *et al.*, 2000). Embora os resultados obtidos por KRASAEKOOPT *et al.* (2004) fossem para uma outra cepa de *Lactobacillus acidophilus*, as células puras estudadas por aqueles autores

estavam mais susceptíveis à ação da bile. Nesse sentido, os ingredientes alimentícios adicionados às musses no presente estudo foram importantes para a proteção da bactéria probiótica durante o ensaio *in vitro*, mesmo na musse controle.

Os resultados obtidos no presente trabalho para a simulação das condições gastrintestinais *in vitro* indicam que a sobrevivência do probiótico aos 30 minutos iniciais da etapa ácida também foi decisiva para determinar a viabilidade desse microrganismo ao final do ensaio, já que as maiores perdas da população de *Lactobacillus acidophilus* ocorreram nesse período.

Os melhores resultados obtidos para as musses contendo inulina na sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* às condições gastrintestinais simuladas *in vitro*, em especial nos tratamentos T2, T4 e T7 refrigerados e T4 congelado, foi provavelmente em função de essa fibra ser resistente à hidrólise pelas enzimas do TGI e de seu elevado grau de polimerização, médio de 20 (ROBERFROID, 2007; FRANCK, 2008) e, conseqüentemente, não ter sido digerida pelas enzimas utilizadas no ensaio, resultando em maior proteção para o microrganismo probiótico.

Na matriz alimentícia, a inulina liga-se à água ali disponível, formando um gel constituído de uma rede de partículas cristalinas que se assemelham a cristais de gordura em óleo. Análises de criomicroscopia eletrônica confirmaram que esse gel é composto por uma rede tridimensional de partículas de inulina em água, apresentando diâmetro de 1-3μm. Grande quantidade de água é imobilizada nessa estrutura, em função do tempo e esse gel não sofre influência do pH com valores entre 4 a 9 (FRANCK, 2008). No caso específico de frutanos com alto grau de polimerização, como a inulina utilizada no presente trabalho (Beneo® HP-Gel), estes são mais estáveis termicamente e apresentam solubilidade ainda mais reduzida (VILLEGAS & COSTEL, 2007; FRANCK, 2008). ZIMERI & KOKINI (2003), usando microscopia de luz (óptica), observaram a presença desses cristais de inulina imersos em uma solução de 5% de inulina em água.

Possivelmente, nas musses adicionadas de inulina, para as quais o probiótico apresentou maior resistência *in vitro*, uma parte das células de *Lactobacillus acidophilus* ficaram protegidas entre essa rede de partículas que não foram destruídas, mesmo após a homogeneização da amostra com a solução

salina, com as enzimas adicionadas e nas diferentes condições de pH a 37°C, durante 6 horas. De fato, a inulina tem sido estudada como componente para a produção de micro e nanocápsulas para a administração de fármacos que serão liberados diretamente no cólon (POULAIN *et al.*, 2003; KOSARAJU, 2005), bem como para a proteção de microrganismos probióticos ao longo do armazenamento de culturas puras e durante a passagem pelo TGI (CRITTENDEN *et al.*, 2006).

A utilização da inulina pelo probiótico como fonte de energia ao longo dos ensaios *in vitro* é pouco provável. Mesmo a 37°C, o microrganismo dificilmente se multiplicaria naquelas condições, apenas tentaria sobreviver. Em estudo realizado por MAKRAS *et al.*, 2005, as cepas de *Lactobacillus acidophilus* ACC e IBB 801 não foram aptas a metabolizar inulina a 37°C em meio MRS modificado contendo, em substituição à glicose, Raftiline® HP, inulina com grau de polimerização próximo ao da utilizada no presente trabalho.

Os valores de pH foram monitorados durante a amostragem da população de *Lactobacillus acidophilus* nas etapas de avaliação de resistência às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro* das musses refrigeradas e congeladas de todos os tratamentos e apresentaram pouca variação dentro de um mesmo tratamento em cada período de amostragem das musses (dias de armazenamento) para cada tempo de coleta (horas de ensaio *in vitro*). Esses valores de pH estão apresentados ao final da tese, nos **anexos 10 e 11**.

4.5 Perfil de textura instrumental

O perfil de textura instrumental das musses refrigeradas e congeladas do presente trabalho é apresentado nas **tabelas 15 a 19**. Alterações significativas ($p<0,05$) em todos os parâmetros de textura analisados foram observadas com o congelamento das amostras a –18±3°C e o seu posterior descongelamento a 4°C nos diferentes períodos de amostragem. Teoricamente, o congelamento deveria ocasionar a solidificação da fase aquosa do alimento, que resultaria em uma maior estabilidade do sistema durante o armazenamento das amostras a essa condição (DALGLEISH, 2006). Após o seu descongelamento, as musses não mantiveram a sua condição inicial, com exceções para alguns tratamentos quanto à adesividade e à elasticidade. As principais modificações na textura das amostras decorrentes do congelamento e da substituição da gordura láctea adicionada pela inulina e/ou WPC são detalhadas a seguir.

Em todos os tratamentos, os valores de firmeza das amostras congeladas foram significativamente inferiores ($p<0,05$) quando comparados aos das suas respectivas musses refrigeradas ao longo do armazenamento (**tabela 15**). No presente estudo, o descongelamento das amostras armazenadas a –18°C, antes da determinação da textura, teria alterado a estrutura dessas musses, tornando-as menos firmes. Por outro lado, no início do armazenamento de produtos refrigerados, existe um tempo maior para a "acomodação" e estabilidade de partículas, devido à mobilidade e pequeno deslocamento das bolhas de ar, o que resultaria em uma maior firmeza do produto recém fabricado que, em muitos casos, pode se perpetuar ao longo do armazenamento, tornando o produto ainda mais firme (CARDARELLI *et al.*, 2008a).

Tabela 15: Valores de firmeza (N) (média ± desvio padrão) obtidos para as musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) por até 28 dias e sob congelamento (–18±3°C) por até 112 dias (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7).

Temperatura de armazenamento	Tempo (dias)	Firmeza (N)						
		Musses#						
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
4±1°C	1	3,23±0,17^{CDd}	2,90±0,31^{Dd}	3,78±0,32^{BCa}	3,25±0,17^{CDc}	4,01±0,15^{Ba}	4,74±0,50^{Aa}	2,97±0,16^{Da}
	7	3,52±0,12^{Bc}	3,53±0,15^{Bc}	3,06±0,21^{Da}	3,33±0,22^{BCc}	3,09±0,26^{CDb}	4,76±0,44^{Aa}	3,21±0,06^{CDb}
	14	3,67±0,22^{BCabc}	3,74±0,12^{Bab}	3,15±0,14^{Da}	3,68±0,22^{BCb}	3,20±0,20^{Db}	4,78±0,14^{Aa}	3,37±0,20^{CDab}
	21	3,62±0,18^{CDb}	3,74±0,17^{BCbc}	3,14±0,18^{Da}	4,08±0,24^{Ba}	3,24±0,08^{Db}	4,60±0,21^{Aa}	3,33±0,09^{DEb}
	28	3,80±0,24^{Ba}	3,88±0,14^{Ba}	3,32±0,35^{Ca}	3,79±0,08^{Bb}	3,08±0,21^{Cb}	4,92±0,17^{Aa}	3,33±0,21^{Cb}
	Média geral (tratamentos)	3,57±0,26	3,56±0,39	3,29±0,35	3,63±0,36	3,32±0,40	4,76±0,32	3,24±0,21
–18±3°C	7	2,95±0,23^{ABa}	2,71±0,02^{Ca}	2,52±0,18^{CDa}	3,10±0,19^{Aa}	2,55±0,39^{BCDbc}	3,10±0,16^{Ac}	2,42±0,18^{Dbc}
	35	2,85±0,21^{Ba}	2,68±0,14^{BCa}	2,85±0,27^{Ba}	3,30±0,30^{Aa}	2,41±0,13^{Cc}	2,91±0,31^{Abc}	2,41±0,15^{Cb}
	56	2,76±0,20^{Ba}	2,94±0,20^{ABa}	2,82±0,25^{ABa}	3,00±0,54^{ABa}	3,18±0,27^{ABa}	3,43±0,48^{Abc}	2,66±0,10^{Bac}
	84	2,76±0,19^{Ba}	2,91±0,17^{Ba}	2,86±0,32^{Ba}	2,98±0,37^{Ba}	2,63±0,14^{Bbc}	3,80±0,17^{Aab}	2,64±0,20^{Bab}
	112	2,59±0,18^{Ca}	3,03±0,19^{Ba}	3,04±0,25^{Ba}	2,60±0,22^{Ca}	2,78±0,17^{BCb}	3,95±0,16^{Aa}	2,89±0,09^{BCa}
	Média geral (tratamentos)	2,78±0,22*	2,85±0,20*	2,82±0,29*	3,00±0,38*	2,71±0,35*	3,44±0,48*	2,61±0,23*

Variâncias homogêneas observadas para os tratamentos (p>0,05), exceto para as amostras refrigeradas e congeladas aos 7 dias.

A,B letras maiúsculas sobrescritas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05) entre as diferentes formulações de musse para um mesmo dia e temperatura de armazenamento.

a,b letras minúsculas sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes dias para uma mesma formulação de musse em uma mesma temperatura de armazenamento.

* na mesma coluna, para a média geral de uma mesma formulação de musse, indica diferença significativa entre o armazenamento refrigerado e o congelado (p<0,05).

A musse T6, contendo 2% de inulina e 2% de WPC, foi a que apresentou os valores de firmeza significativamente maiores ($p<0,05$), tanto para as amostras refrigeradas quanto para as congeladas, exceto aos 35 dias de armazenamento (**tabela 15**). Este fato pode ser atribuído à capacidade da inulina se ligar às moléculas de água e à possível interação com as proteínas do soro de leite (GOKAVI *et al.*, 2005; HERCEG *et al.*, 2007). Esta interação pode, portanto, aumentar o peso molecular da fração protéica do leite (TÁRREGA & COSTEL, 2006) e, assim, modificar a textura do produto em relação às musses de maior teor lipídico. Aumentos significativos na firmeza ao longo do armazenamento foram observados para as musses refrigeradas T1, T2, T4 e T7 e para os tratamentos congelados T5, T6 e T7 ($p<0,05$). Ao contrário, a musse T5 refrigerada apresentou redução significativa da firmeza ($p<0,05$) na primeira semana de armazenamento.

De modo semelhante ao observado para a firmeza, todas as musses refrigeradas apresentaram valores de coesividade significativamente superiores ($p<0,05$) aos das suas respectivas formulações congeladas ao longo do armazenamento (**tabela 16**). Porém, ao contrário do que foi observado para a firmeza, a musse T6 apresentou os menores valores de coesividade durante o armazenamento das amostras refrigeradas e congeladas, quando comparado às demais musses, diferindo significativamente destas outras ($p<0,05$) após 1, 7 e 14 dias sob armazenamento refrigerado. Devido à sua capacidade hidrofílica, a inulina pode formar pontes de hidrogênio com algumas proteínas do soro, como a β-lactoglobulina, por exemplo, e reduzir a tensão de superfície e a estabilidade do sistema (HERCEG *et al.*, 2007), o que poderia ter resultado na diminuição da coesividade das musses T6, em comparação às demais. Por outro lado, aumentos significativos da coesividade ao longo do armazenamento foram observados para as musses T6 refrigerada e T1 congelada ($p<0,05$).

Tabela 16: Valores de coesividade (média ± desvio padrão) obtidos para as musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) por até 28 dias e sob congelamento (–18±3°C) por até 112 dias (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7).

Temperatura de armazenamento	Tempo (dias)	Coesividade						
		Musses#						
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
4±1°C	1	0,444±0,020^{Aa}	0,474±0,012^{Aa}	0,482±0,019^{Aa}	0,450±0,022^{Aa}	0,440±0,015^{Aa}	0,375±0,014^{Bab}	0,440±0,027^{Aa}
	7	0,445±0,021^{Aa}	0,458±0,013^{Aa}	0,467±0,021^{Aa}	0,454±0,020^{Aa}	0,442±0,017^{Aa}	0,369±0,021^{Bb}	0,448±0,015^{Aa}
	14	0,455±0,015^{Aa}	0,455±0,011^{Aa}	0,475±0,013^{Aa}	0,440±0,014^{Aa}	0,427±0,021^{Aa}	0,387±0,019^{Bab}	0,432±0,012^{Aa}
	21	0,437±0,022^{Aa}	0,455±0,022^{Aa}	0,458±0,013^{Aa}	0,442±0,030^{Aa}	0,439±0,026^{Aa}	0,418±0,025^{Aa}	0,435±0,009^{Aa}
	28	0,438±0,014^{Aa}	0,449±0,006^{Aa}	0,439±0,026^{Aa}	0,441±0,027^{Aa}	0,442±0,027^{Aa}	0,402±0,026^{Aab}	0,437±0,028^{Aa}
	Média geral (tratamentos)	0,444±0,018	0,458±0,015	0,464±0,023	0,446±0,022	0,438±0,021	0,390±0,027	0,438±0,019
–18±3°C	7	0,359±0,025^{BDbc}	0,420±0,024^{ABCa}	0,428±0,038^{ABa}	0,436±0,022^{Aa}	0,351±0,072^{CDa}	0,325±0,023^{Da}	0,374±0,046^{ADa}
	35	0,340±0,020^{BCc}	0,422±0,021^{Aa}	0,435±0,036^{Aa}	0,397±0,034^{ABba}	0,377±0,037^{ACa}	0,311±0,024^{Ca}	0,370±0,021^{ACa}
	56	0,386±0,025^{ABac}	0,396±0,027^{ABa}	0,446±0,014^{Aa}	0,398±0,018^{ABa}	0,343±0,018^{Ba}	0,335±0,024^{Ba}	0,348±0,025^{Ba}
	84	0,420±0,048^{Aab}	0,394±0,020^{Aa}	0,423±0,022^{Aa}	0,389±0,017^{Aa}	0,382±0,033^{Aa}	0,308±0,023^{Ba}	0,395±0,056^{Aa}
	112	0,439±0,012^{Aa}	0,393±0,020^{ACa}	0,451±0,011^{Aa}	0,398±0,020^{ABa}	0,343±0,022^{BCa}	0,323±0,024^{Ca}	0,388±0,029^{ACa}
	Média geral (tratamentos)	0,389±0,046*	0,405±0,024*	0,437±0,026*	0,404±0,027*	0,359±0,041*	0,320±0,024*	0,375±0,038*

Variâncias homogêneas entre os tratamentos para cada tempo e ao longo do armazenamento para cada tratamento (p>0,05).

A,B letras maiúsculas sobrescritas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05) entre as diferentes formulações de musse para um mesmo dia e temperatura de armazenamento.

a,b letras minúsculas sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes dias para uma mesma formulação de musse em uma mesma temperatura de armazenamento.

* na mesma coluna, para a média geral de uma mesma formulação de musse, indica diferença significativa entre o armazenamento refrigerado e o congelado (p<0,05).

As musses T2 (4% de inulina) armazenadas sob refrigeração e T6 (2% de inulina + 2% de WPC) sob congelamento apresentaram aumentos significativos da adesividade ao longo do armazenamento ($p<0,05$). O mesmo comportamento foi descrito por CARDARELLI *et al.* (2008a) para musses de chocolate simbióticas produzidas com a adição de inulina e armazenadas em refrigeração. Embora não significativa ($p>0,05$), foi possível observar uma tendência de aumento da adesividade para as demais amostras refrigeradas e congeladas durante o armazenamento dos demais tratamentos, exceto para as musses T3 e T5 (**tabela 17**).

A elasticidade foi o parâmetro de textura que apresentou a maior estabilidade durante o armazenamento das musses refrigeradas e congeladas (**tabela 18**), sempre ao redor de 0,9 para todos os tratamentos. Diferenças significativas entre as formulações ($p<0,05$) só foram observadas ao 1º dia de armazenamento. Alterações significativas da elasticidade ao longo dos armazenamentos refrigerado e congelado ($p<0,05$) somente foram verificadas na musse T1.

Também de maneira similar à firmeza, os valores de gomosidade das amostras congeladas dos diferentes tratamentos foram significativamente inferiores ($p<0,05$) aos das suas respectivas amostras refrigeradas durante o armazenamento (**tabela 19**).

Tabela 17: Valores de adesividade[1] (N s) obtidos para as musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) por até 28 dias e sob congelamento (–18±3°C) por até 112 dias (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7).

Temperatura de armazenamento	Tempo (dias)	Adesividade (N s)[#]						
		Musses						
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
4±1°C	1	1,82±0,38^{Aa}	1,78±0,39^{Aa}	1,85±0,37^{Aa}	1,42±0,32^{Aa}	2,55±0,45^{Aa}	3,16±0,96^{Aa}	1,65±0,45^{Aa}
	7	2,07±0,42^{ABa}	2,93±0,83^{ABab}	2,36±0,82^{ABa}	1,71±0,30^{Ba}	2,40±0,42^{ABa}	3,64±1,65^{Aa}	2,00±0,46^{ABa}
	14	2,16±0,42^{ABa}	3,23±0,23^{ABab}	2,03±0,46^{ABa}	1,57±0,42^{Ba}	2,40±0,22^{ABa}	3,80±0,81^{Aa}	2,44±0,35^{ABa}
	21	2,14±0,63^{Aa}	3,73±0,65^{Ab}	2,19±0,43^{Aa}	2,62±0,64^{Aa}	2,27±0,46^{Aa}	3,15±1,05^{Aa}	2,65±0,44^{Aa}
	28	2,62±1,01^{Aa}	3,56±0,76^{Aab}	2,07±0,83^{Aa}	2,35±0,56^{Aa}	2,30±0,97^{Aa}	3,94±1,17^{Aa}	3,15±0,65^{Aa}
	Média geral (tratamentos)	2,16±0,61	3,05±0,90	2,10±0,57	1,93±0,64	2,38±0,51	3,54±1,09	2,38±0,68
–18±3°C	7	1,88±0,48^{Aa}	1,60±0,37^{Aa}	1,63±0,51^{Aa}	1,53±0,38^{Aa}	1,94±0,93^{Aa}	2,79±0,64^{Ab}	1,35±0,58^{Aa}
	35	1,97±0,15^{ABa}	2,03±0,27^{ABa}	1,30±0,38^{Ba}	1,71±0,27^{Ba}	1,69±0,37^{Ba}	3,77±0,33^{Aab}	1,32±0,26^{Ba}
	56	2,01±0,65^{ABa}	2,23±0,82^{ABa}	1,21±0,43^{Ba}	1,61±0,48^{Ba}	2,71±0,41^{ABa}	3,83±1,63^{Aab}	1,76±0,87^{Ba}
	84	2,44±0,38^{Ba}	2,74±0,20^{Ba}	1,48±0,76^{Ba}	2,11±0,47^{Ba}	1,82±0,37^{Ba}	5,19±1,18^{Aa}	1,91±1,11^{Ba}
	112	2,16±1,07^{Ba}	2,61±0,51^{Ba}	1,22±0,47^{Ba}	2,14±0,85^{Ba}	1,71±0,77^{Ba}	4,87±1,08^{Aa}	1,93±0,58^{Ba}
	Média geral (tratamentos)	2,09±0,59	2,24±0,60*	1,37±0,48*	1,82±0,53	1,97±0,67*	4,09±1,29	1,65±0,71*

[1] Valores em módulo. Variâncias homogêneas entre os tratamentos para cada tempo e ao longo do armazenamento para cada tratamento ($p>0,05$).

[A,B] letras maiúsculas sobrescritas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as diferentes formulações de musse para um mesmo dia e temperatura de armazenamento.

[a,b] letras minúsculas sobrescritas distintas na mesma coluna indicam as diferenças significativas ($p<0,05$) entre os diferentes dias para uma mesma formulação de musse em uma mesma temperatura de armazenamento.

* na mesma coluna, para a média geral de uma mesma formulação de musse, indica diferença significativa entre o armazenamento refrigerado e o congelado ($p<0,05$).

Tabela 18: Valores de elasticidade obtidos para as musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) por até 28 dias e sob congelamento (–18±3°C) por até 112 dias (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7).

Temperatura de armazenamento	Tempo (dias)	Elasticidade#						
		Musses						
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
4±1°C	1	0,892±0,027^{ABab}	0,902±0,031^{ABa}	0,921±0,013^{Aa}	0,890±0,024^{ABa}	0,880±0,030^{ABa}	0,877±0,007^{ABa}	0,875±0,024^{Ba}
	7	0,917±0,032^{Aa}	0,929±0,035^{Aa}	0,905±0,047^{Aa}	0,870±0,096^{Aa}	0,889±0,038^{Aa}	0,876±0,005^{Aa}	0,908±0,031^{Aa}
	14	0,923±0,023^{Aab}	0,951±0,008^{Aa}	0,920±0,036^{Aa}	0,888±0,052^{Aa}	0,917±0,041^{Aa}	0,913±0,044^{Aa}	0,909±0,037^{Aa}
	21	0,896±0,036^{Aab}	0,945±0,011^{Aa}	0,930±0,020^{Aa}	0,873±0,075^{Aa}	0,903±0,038^{Aa}	0,907±0,039^{Aa}	0,894±0,030^{Aa}
	28	0,897±0,047^{Ab}	0,947±0,014^{Aa}	0,895±0,039^{Aa}	0,875±0,097^{Aa}	0,934±0,049^{Aa}	0,919±0,042^{Aa}	0,886±0,053^{Aa}
	Média geral (tratamentos)	0,905±0,035	0,934±0,028	0,914±0,034	0,879±0,072	0,906±0,042	0,900±0,036	0,894±0,036
–18±3°C	7	0,945±0,012^{Aa}	0,931±0,010^{Aa}	0,893±0,066^{Aa}	0,871±0,067^{Aa}	0,907±0,087^{Aa}	0,946±0,043^{Aa}	0,917±0,057^{Aa}
	35	0,942±0,016^{Aab}	0,925±0,014^{Aa}	0,896±0,063^{Aa}	0,888±0,056^{Aa}	0,942±0,016^{Aa}	0,910±0,057^{Aa}	0,933±0,020^{Aa}
	56	0,899±0,036^{Ab}	0,886±0,052^{Aa}	0,915±0,030^{Aa}	0,905±0,050^{Aa}	0,948±0,029^{Aa}	0,942±0,055^{Aa}	0,936±0,019^{Aa}
	84	0,912±0,064^{Aab}	0,944±0,016^{Aa}	0,916±0,043^{Aa}	0,926±0,025^{Aa}	0,940±0,032^{Aa}	0,939±0,062^{Aa}	0,887±0,041^{Aa}
	112	0,903±0,047^{Aab}	0,938±0,033^{Aa}	0,926±0,014^{Aa}	0,926±0,034^{Aa}	0,907±0,050^{Aa}	0,921±0,044^{Aa}	0,923±0,025^{Aa}
	Média geral (tratamentos)	0,914±0,046	0,945±0,034	0,910±0,045	0,904±0,051*	0,928±0,048	0,931±0,050*	0,919±0,037*

Variâncias homogêneas somente observadas para os tratamentos no 1º dia de armazenamento refrigerado e aos 35 e 112 dias de armazenamento congelado (p>0,05).

A,B letras maiúsculas sobrescritas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05) entre as diferentes formulações de musse para um mesmo dia e temperatura de armazenamento.

a,b letras minúsculas sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes dias para uma mesma formulação de musse em uma mesma temperatura de armazenamento.

* na mesma coluna, para a média geral de uma mesma formulação de musse, indica diferença significativa entre o armazenamento refrigerado e o congelado (p<0,05).

Tabela 19: Valores de gomosidade (N) obtidos para as musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) por até 28 dias e sob congelamento (–18±3°C) por até 112 dias (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7).

Temperatura de armazenamento	Tempo (dias)	Gomosidade (N)[#]						
		Musses						
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
4±1°C	1	1,39±0,05^{Ca}	1,38±0,13^{Cb}	1,82±0,10^{Aa}	1,50±0,17^{BCb}	1,76±0,02^{Aa}	1,77±0,13^{ABbc}	1,31±0,12^{Ca}
	7	1,54±0,07^{BCa}	1,62±0,10^{ABa}	1,43±0,09^{CDb}	1,47±0,11^{BDb}	1,36±0,07^{Db}	1,75±0,08^{Ac}	1,44±0,03^{CDa}
	14	1,48±0,01^{CDa}	1,71±0,05^{Ba}	1,50±0,07^{CDb}	1,58±0,06^{Cb}	1,36±0,04^{Eb}	1,84±0,07^{Aac}	1,45±0,07^{DEa}
	21	1,52±0,08^{Ca}	1,70±0,04^{Ba}	1,44±0,08^{Cb}	1,81±0,21^{ABa}	1,42±0,07^{Cb}	1,93±0,15^{Aab}	1,46±0,03^{Ca}
	28	1,56±0,16^{BDa}	1,75±0,06^{ABa}	1,43±0,09^{CDb}	1,59±0,05^{BCb}	1,36±0,14^{Db}	1,97±0,11^{Aa}	1,44±0,14^{CDa}
	Média geral (tratamentos)	1,49±0,10	1,63±0,16	1,52±0,17	1,59±0,17	1,45±0,17	1,85±0,14	1,42±0,10
–18±3°C	7	1,06±0,10^{Aa}	1,14±0,07^{Aa}	1,08±0,07^{Aa}	1,26±0,10^{Aa}	0,91±0,28^{Aabc}	1,01±0,10^{Ac}	0,91±0,16^{Abc}
	35	0,97±0,08^{BCa}	1,13±0,03^{ABa}	1,24±0,13^{Aa}	1,24±0,12^{Aa}	0,91±0,09^{Cc}	0,90±0,09^{Cd}	0,89±0,07^{Cc}
	56	1,06±0,09^{ABa}	1,16±0,12^{ABa}	1,26±0,09^{Aa}	1,22±0,16^{Aa}	1,09±0,13^{ABa}	1,11±0,15^{ABbcd}	0,93±0,06^{Bc}
	84	0,89±0,10^{Ca}	1,15±0,1^{ABa}	1,21±0,12^{Aa}	1,15±0,17^{ABa}	0,98±0,10^{BCb}	1,17±0,07^{ABab}	1,04±0,09^{ACab}
	112	0,99±0,18^{Ba}	1,19±0,09^{Aba}	1,35±0,11^{Aa}	1,01±0,14^{Ba}	1,01±0,12^{Bab}	1,28±0,11^{Aa}	1,12±0,12^{ABa}
	Média geral (tratamentos)	0,99±0,13*	1,15±0,08*	1,23±0,13*	1,18±0,16*	0,98±0,16*	1,09±0,16*	0,98±0,13*

[#] Variâncias homogêneas observadas para os tratamentos (p>0,05), exceto no 1º e 21º dia de armazenamento refrigerado e ao 7º dia de armazenamento congelado.

[A,B] letras maiúsculas sobrescritas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05) entre as diferentes formulações de musse para um mesmo dia e temperatura de armazenamento.

[a,b] letras minúsculas sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes dias para uma mesma formulação de musse em uma mesma temperatura de armazenamento.

* na mesma coluna, para a média geral de uma mesma formulação de musse, indica diferença significativa entre o armazenamento refrigerado e o congelado (p<0,05).

De modo geral, considerando todos os parâmetros de textura estudados no presente trabalho, a substituição da gordura láctea por inulina nas musses T2 refrigeradas e congeladas resultou em um perfil de textura bastante próximo ao da musse controle T1 durante todo o armazenamento. Este efeito é atribuído à propriedade de gelificação da inulina, que melhora a consistência do produto, através do aumento de sua ligação com a fase aquosa (EL-NAGAR *et al.*, 2002). Define-se gel como uma estrutura insolúvel e semi-rígida de uma dispersão de um sólido em um líquido. Os carboidratos e as proteínas são considerados os principais ingredientes para a produção de géis alimentícios. Polímeros solúveis tornam-se insolúveis ao formarem uma estrutura semi-sólida (gel), devido à associação das moléculas desse polímero com a solução onde ele está presente. A forma de processamento do alimento, os ingredientes que ele contém e o pH contribuem para a resistência e demais propriedades reológicas do gel (KIM *et al.*, 2001).

Resultados semelhantes ao encontrado para a musse T2 do presente trabalho também foram obtidos para iogurtes contendo inulina, em substituição aos lipídios do leite, armazenados durante um período de 15 dias (GUVEN *et al.*, 2005). Por outro lado, a substituição parcial da gordura láctea por inulina em sorvetes promoveu um aumento da firmeza e da adesividade do produto (EL-NAGAR *et al.*, 2002). No presente estudo, verificou-se que as musses refrigeradas e congeladas T4, com substituição parcial da gordura por inulina, apresentaram valores médios de firmeza ligeiramente superiores ao da musse controle T1 aos 21 e 35 dias de armazenamento, respectivamente.

A substituição da gordura láctea por WPC resultou em alterações bastante discretas na textura das musses refrigeradas e congeladas T3, que de maneira geral, se aproximou ao perfil apresentado pela musse T1, considerando todo o período de armazenamento analisado. De modo semelhante ao que foi observado no presente estudo para a musse T3, SANDOVAL-CASTILLA *et al.* (2004) verificaram que iogurtes contendo WPC como substituto de gordura apresentaram perfil de textura muito similar ao do iogurte convencional, particularmente para os parâmetros firmeza, coesividade, adesividade e elasticidade. Os autores observaram, através de microscopia eletrônica, que as proteínas desnaturadas do soro contidas no WPC foram completamente incorporadas à matriz protéica do iogurte, fator este que teria aumentado a firmeza e adesividade do produto em

relação ao produto com baixo teor de gordura e sem a adição de WPC, tornando a sua textura comparável à do iogurte tradicional.

Os parâmetros de textura firmeza e coesividade foram escolhidos para um entendimento mais detalhado das interações entre os ingredientes gordura láctea (x_1), inulina (x_2) e WPC (x_3). Foram testados os modelos de regressão linear, quadrático e cúbico especial para essas variáveis, considerando $p<0,05$, para os resultados desses parâmetros, obtidos aos 14 dias de armazenamento refrigerado e aos 112 dias de armazenamento congelado (dados apresentando variâncias homogêneas e diferenças significativas entre os tratamentos com $p<0,05$). Os tempos de 14 e de 112 dias para os produtos refrigerado e congelado, respectivamente, foram escolhidos em função de serem os períodos máximos de estudo em que todos os tratamentos avaliados apresentavam populações aceitáveis do microrganismo probiótico para efeito benéfico *in vivo* (**tabela 10**).

Os modelos linear e quadrático não foram suficientes para explicar os resultados obtidos de firmeza e coesividade nas musses refrigeradas e congeladas, por apresentarem falta de ajuste significativa em todos os casos ($p<0,05$). Por outro lado, o modelo cúbico especial, com a eliminação das interações não significativas ($p>0,05$), foi significativo ($p<0,05$) para as variáveis em questão e não apresentou falta de ajuste significativa ($p>0,05$). Para a variável firmeza nos armazenamentos refrigerado e congelado, o coeficiente de determinação (R^2) indicou que o modelo foi capaz de explicar, respectivamente, 90,78% e 85,07% da variação observada. Para coesividade, a capacidade de explicação do modelo foi um pouco menor, 76,23% e 82,67% para os armazenamentos refrigerado e congelado, respectivamente. Os coeficientes do modelo cúbico especial obtido, calculado por regressão múltipla, a partir dos resultados de firmeza e coesividade nas musses refrigeradas e congeladas aos 14 e 112 dias de armazenamento, respectivamente, e as análises de variância detalhadas de tais modelos são apresentados nas **tabelas 20** a **24**.

Tabela 20: Coeficientes calculados por regressão múltipla e respectivos erros-padrão e intervalos de confiança (IC) de 95% obtidos para o modelo cúbico especial a partir dos resultados de firmeza e coesividade nas musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) aos 14 dias e sob congelamento (-18±3°C) aos 112 dias (x_1 = gordura láctea, x_2 = inulina e x_3 = WPC).

Parâmetro	Temperatura de armazenamento		x_1	x_2	x_3	x_1x_2	x_1x_3	x_2x_3	$x_1x_2x_3$
Firmeza	4±1°C	Coeficientes	3,66	3,73	3,15	0	-0,85	5,33	-17,47
		Erro-padrão	0,07	0,07	0,07	-	0,38	0,38	2,56
		IC 95%	[3,51; 3,81]	[3,59; 3,88]	[2,99; 3,32]	-	[-1,64; -0,06]	[4,53; 6,11]	[-22,72; -12,23]
		p	<0,01	<0,01	<0,01	-	0,03	<0,01	<0,01
	−18±3°C	Coeficientes	2,52	2,96	3,04	0	0	3,81	-9,97
		Erro-padrão	0,07	0,08	0,08	-	-	0,41	2,62
		IC 95%	[2,37; 2,67]	[2,80; 3,12]	[2,88; 3,20]	-	-	[2,97; 4,65]	[-15,31; -4,62]
		p	<0,01	<0,01	<0,01	-	-	<0,01	<0,01
Coesividade	4±1°C	Coeficientes	0,450	0,450	0,475	0	-0,142	-0,303	0,610
		Erro-padrão	0,006	0,006	0,007	-	0,034	0,034	0,226
		IC 95%	[0,437; 0,463]	[0,437; 0,463]	[0,460; 0,489]	-	[-0,212; -0,072]	[-0,372; -0,234]	[0,15; 1,07]
		p	<0,01	<0,01	<0,01	-	<0,01	<0,01	0,01
	−18±3°C	Coeficientes	0,433	0,387	0,451	0	-0,396	-0,383	1,37
		Erro-padrão	0,009	0,009	0,010	-	0,046	0,046	0,308
		IC 95%	[0,415; 0,451]	[0,369; 0,405]	[0,432; 0,471]	-	[-0,490; -0,302]	[-0,477; -0,288]	[0,738; 2,00]
		p	<0,01	<0,01	<0,01	-	<0,01	<0,01	<0,01

Tabela 21: Análise de variância obtida para o modelo cúbico especial para os resultados de firmeza das musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) aos 14 dias (x_1 = gordura láctea, x_2 = inulina e x_3 = WPC).

Causas de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado	p
Regressão	9,043036	5	1,808607	57,07256	<0,01
Resíduo	0,918999	29	0,031690		
Falta de ajuste	0,001580	1	0,001580	0,04822	0,827791
Erro puro	0,917419	28	0,032765		
Total	9,962035	34	0,293001		
R^2	0,907750				
R^2 ajustado	0,891845				

Tabela 22: Análise de variância obtida para o modelo cúbico especial para os resultados de firmeza das musses T1 a T7, armazenadas sob congelamento (-18±3°C) aos 112 dias (x_1 = gordura láctea, x_2 = inulina e x_3 = WPC).

Causas de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado	p
Regressão	6,299256	4	1,574814	42,74695	<0,01
Resíduo	1,105211	30	0,036840		
Falta de ajuste	0,140381	2	0,070190	2,03697	0,149307
Erro puro	0,964831	28	0,034458		
Total	7,404468	34	0,217778		
R^2	0,850737				
R^2 ajustado	0,830836				

Tabela 23: Análise de variância obtida para o modelo cúbico especial para os resultados de coesividade das musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) aos 14 dias (x_1 = gordura láctea, x_2 = inulina e x_3 = WPC).

Causas de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado	p
Regressão	0,022951	5	0,004590	18,60127	<0,01
Resíduo	0,007156	29	0,000247		
Falta de ajuste	0,000770	1	0,000770	3,37672	0,076758
Erro puro	0,006386	28	0,000228		
Total	0,030107	34	0,000885		
R^2	0,762308				
R^2 ajustado	0,721326				

Tabela 24: Análise de variância obtida para o modelo cúbico especial para os resultados de coesividade das musses T1 a T7, armazenadas sob congelamento (-18±3°C) aos 112 dias (x_1 = gordura láctea, x_2 = inulina e x_3 = WPC).

Causas de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado	p
Regressão	0,063134	5	0,012627	27,66242	<0,01
Resíduo	0,013237	29	0,000456		
Falta de ajuste	0,001013	1	0,001013	2,31942	0,138983
Erro puro	0,012225	28	0,000437		
Total	0,076372	34	0,002246		
R^2	0,826671				
R^2 ajustado	0,796787				

Abaixo são apresentadas as equações obtidas a partir dos coeficientes apresentados na **tabela 20**.

Equação para a firmeza das musses aos 14 dias de armazenamento refrigerado:

$$\hat{y}_{(2)} = 3{,}66x_1 + 3{,}73x_2 + 3{,}15x_3 - 0{,}85x_1x_3 + 5{,}33x_2x_3 - 17{,}47x_1x_2x_3$$

onde, $\hat{y}_{(2)}$ é o valor estimado da variável firmeza do produto refrigerado.

Equação para a firmeza das musses aos 112 dias de armazenamento congelado:

$$\hat{y}_{(3)} = 2{,}52x_1 + 2{,}96x_2 + 3{,}04x_3 + 3{,}81x_2x_3 - 9{,}97x_1x_2x_3$$

onde, $\hat{y}_{(3)}$ é o valor estimado da variável firmeza do produto congelado.

Equação para a coesividade das musses aos 14 dias de armazenamento refrigerado:

$$\hat{y}_{(4)} = 0{,}45x_1 + 0{,}45x_2 + 0{,}475x_3 - 0{,}142x_1x_3 - 0{,}303x_2x_3 + 0{,}61x_1x_2x_3$$

onde, $\hat{y}_{(4)}$ é o valor estimado da variável coesividade do produto refrigerado.

Equação para a coesividade das musses aos 112 dias de armazenamento congelado:

$$\hat{y}_{(5)} = 0{,}433x_1 + 0{,}387x_2 + 0{,}451x_3 - 0{,}396x_1x_3 - 0{,}383x_2x_3 + 1{,}37x_1x_2x_3$$

onde, $\hat{y}_{(5)}$ é o valor estimado da variável coesividade do produto congelado.

De acordo com os modelos propostos para a variável firmeza, a substituição total da gordura láctea adicionada (x_1) por WPC (x_3) na musse T3 resulta em uma diminuição da firmeza do produto refrigerado aos 14 dias de armazenamento quando comparada ao controle (T1) e à musse T2, na qual a gordura láctea adicionada foi completamente substituída por inulina (x_2). No produto congelado ao contrário, o efeito isolado x_3 resulta em um maior aumento da firmeza quando comparado ao o efeito isolado x_1.

Nesses 4 modelos apresentados, a interação binária x_1x_2 (gordura láctea e inulina) não foi significativa (p>0,05), do mesmo modo como ocorreu no modelo para *Lactobacillus acidophilus* no produto refrigerado. Para a variável firmeza do produto congelado, a interação x_1x_3 (gordura láctea e WPC) também não foi significativa (p>0,05). Para as demais variáveis, a interação x_1x_3 exerceu uma ação negativa, reduzindo a firmeza no produto refrigerado e a coesividade em ambas as condições de armazenamento. No entanto, o efeito da interação entre a gordura láctea e o WPC na firmeza do produto refrigerado foi pequeno, quando comparado aos demais. Com relação às interações binária x_2x_3 e ternária $x_1x_2x_3$, observou-se que em ambas as condições de armazenamento essas interações contribuíram para comportamentos distintos: aumento da firmeza e redução da coesividade para a interação x_2x_3 e o efeito inverso para a interação $x_1x_2x_3$ (redução da firmeza e aumento da coesividade).

Os diagramas triangulares dos modelos estatísticos da firmeza e da coesividade nas musses refrigeradas e congeladas aos 14 e 112 dias de armazenamento, respectivamente, estão representados nas **figuras 14** a **17**.

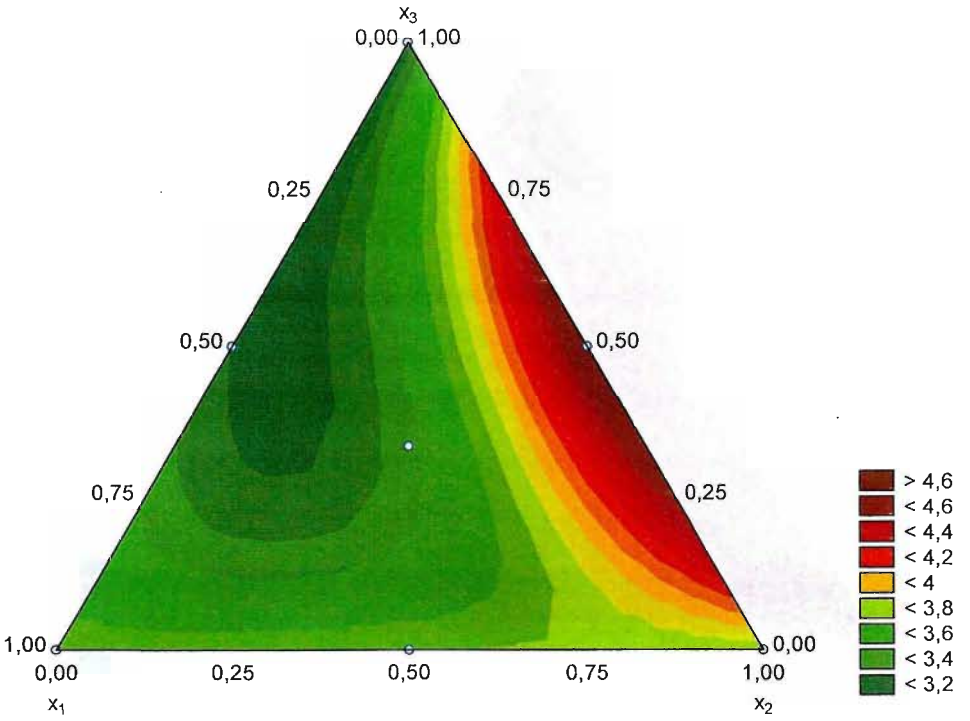


Figura 14: Diagrama triangular da variável firmeza nas musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) aos 14 dias (x_1 = gordura láctea, x_2 = inulina e x_3 = WPC).

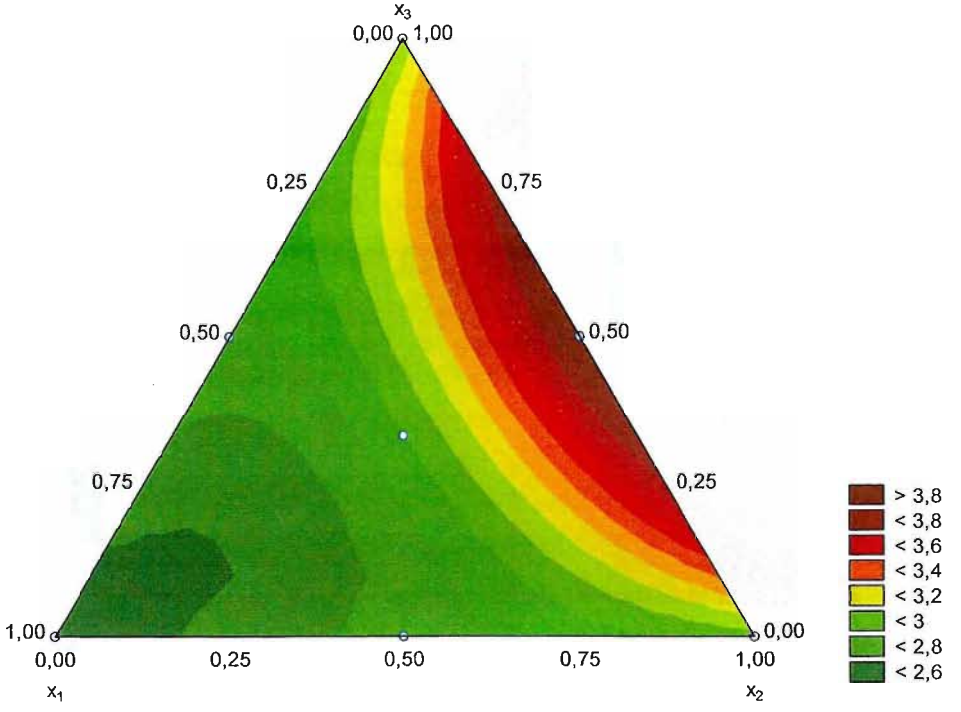


Figura 15: Diagrama triangular da variável firmeza nas musses T1 a T7, armazenadas sob congelamento (-18±3°C) aos 112 dias (x_1 = gordura láctea, x_2 = inulina e x_3 = WPC).

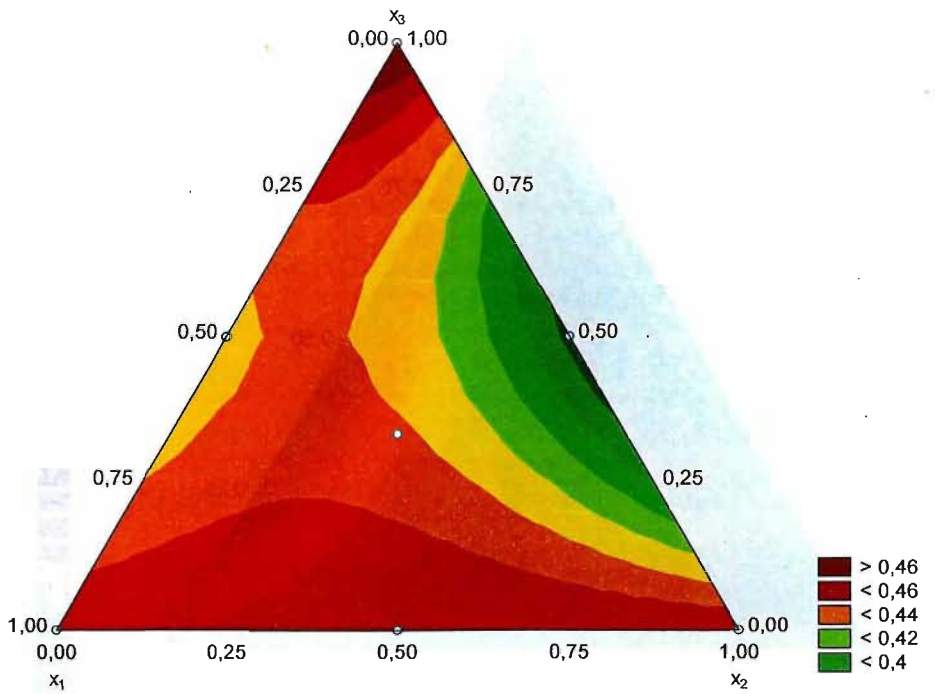


Figura 16: Diagrama triangular da variável coesividade nas musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) aos 14 dias (x_1 = gordura láctea, x_2 = inulina e x_3 = WPC).

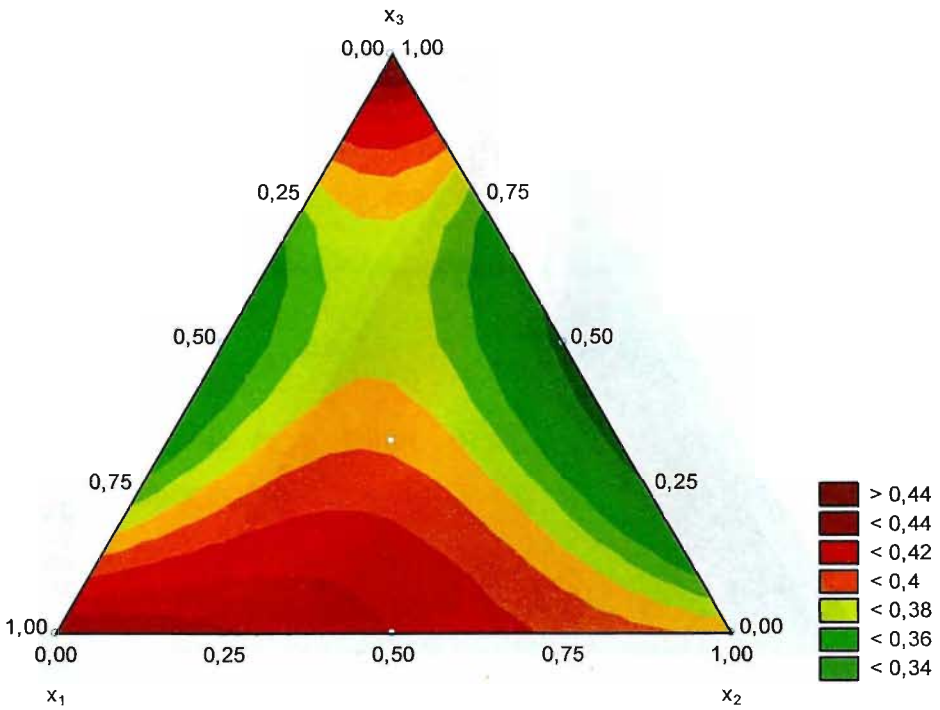


Figura 17: Diagrama triangular da variável coesividade nas musses T1 a T7, armazenadas sob congelamento (-18±3°C) aos 112 dias (x_1 = gordura láctea, x_2 = inulina e x_3 = WPC).

Assim, os modelos propostos são capazes de explicar a ação contrária da interação entre a inulina e o WPC nos parâmetros firmeza e coesividade, conforme foi observado nas musses T6 (**tabelas 15** e **16**). Do mesmo modo, esses modelos também foram capazes de explicar que, quando a gordura láctea é adicionada em conjunto com a inulina e o WPC no tratamento T7, a firmeza do produto é reduzida e a coesividade elevada, se comparada a T6, alcançando valores mais próximos aos obtidos pelo controle T1 aos 14 dias de armazenamento refrigerado e aos 112 dias de armazenamento congelado (**tabelas 15** e **16**).

4.6 Avaliação sensorial

Dos provadores que participaram da avaliação sensorial do presente trabalho, 40,8% eram do sexo masculino e 59,2% do sexo feminino. A média de idade dos provadores era de 26,6 anos (desvio padrão = 8,1 anos) e a mediana de 23,8 anos. A idade mínima dos provadores foi de 18,0 anos e a máxima de 62,1 anos, sendo que 50% dos participantes apresentavam idades entre 20,9 e 28,2 anos (idades entre o 1º e o 3º quartil).

A escala hedônica híbrida 11 pontos foi utilizada na avaliação das musses do presente trabalho (**anexo 2**). Ela consiste em uma escala linear, resultado da combinação de escala estruturada e não estruturada, ancorada na região central e nos extremos, com anotações verbais e numéricas. Os pontos eqüidistantes na linha horizontal servem para melhor definir o grau e a orientação do contínuo hedônico. A escala híbrida apresenta uma série de vantagens sobre a tradicional escala hedônica de 9 pontos. Tal modelo não se restringe a um número limitado de categorias; o provador pode utilizar qualquer parte da escala para atribuir seus valores hedônicos, com possível aumento do poder discriminativo da escala, pelo fato dos provadores terem maior liberdade na escolha do valor numérico que expressará o seu grau de aceitabilidade do produto. Também existe uma diminuição do erro psicológico de hábito, encorajando o provador a fazer sua avaliação de maneira mais consciente e criteriosa. Por fim, ela permite a utilização de uma diversidade de análises estatísticas paramétricas e não paramétricas, pelo fato de gerar dados contínuos (VILLANUEVA *et al.*, 2000; VILLANUEVA, 2003).

A análise sensorial realizada para as diferentes musses (**tabela 25**) indicou que o congelamento não causou alterações significativas nos valores de aceitabilidade das musses ($p>0,05$). De modo geral, todos os produtos apresentaram aceitabilidade elevada ao longo de todo o armazenamento, com notas médias que variaram entre 7,2 e 8,0. No entanto, para a musse T6, na qual a gordura láctea foi substituída pela adição simultânea de inulina e WPC, os valores médios de aceitabilidade do produto refrigerado, considerando todo o período de armazenamento, foram significativamente menores que os das musses congeladas ($p<0,05$). Embora não tenham ocorrido diferenças significativas durante o armazenamento ($p>0,05$), a musse refrigerada T6 apresentou as menores notas de aceitabilidade ao final do armazenamento (nota média de 6,78 aos 21 dias). Tais resultados evidenciam que, para a musse T6, o congelamento foi capaz de evitar as variações perceptíveis ao consumidor que podem ocorrer ao longo do armazenamento, além de prolongar a sua vida de prateleira.

Adicionalmente, as diferentes musses não apresentaram diferenças significativas entre si ao longo dos armazenamentos refrigerado e congelado ($p>0,05$), mostrando que a substituição da gordura láctea por inulina e/ou WPC não afetou a aceitabilidade global das musses de goiaba simbióticas estudadas no presente trabalho. Os provadores indicaram os atributos sensoriais que mais apreciaram e que menos gostaram naquelas amostras. Tais indicações compreendiam os atributos sabor, textura, aparência e aroma. Os provadores ficaram livres para mencionar mais de um atributo em ambos os casos. Tais informações estão apresentadas nas **tabelas 26** a **29**.

Tabela 25: Aceitabilidade sensorial obtida para as musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) por até 28 dias e sob congelamento (–18±3°C) por até 112 dias (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7).

Temperatura de armazenamento	Tempo (dias)	Notas#						
		Musses						
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
4°C	7	8,08± 1,39[Aa]	7,93±1,18[Aa]	7,08±2,00[Aa]	8,13±1,32[Aa]	8,06±1,27[Aa]	7,56±1,67[Aa]	7,60±1,44[Aa]
	14	8,08± 1,22[Aa]	7,96±1,20[Aa]	7,14±1,59[Aa]	7,81±1,27[Aa]	7,45±1,60[Aa]	7,36±1,34[Aa]	7,86±1,09[Aa]
	21	7,57± 1,04[Aa]	7,52±1,07[Aa]	7,40±1,09[Aa]	7,61±1,47[Aa]	7,27±1,60[Aa]	6,78±1,71[Aa]	7,70±1,18[Aa]
	Média (tratamentos)	7,91±1,23	7,80±1,15	7,21±1,59	7,85±1,34	7,60±1,51	7,24±1,58	7,72±1,23
-18°C	7	7,97±1,37[Aa]	7,53±1,55[Aa]	8,15±0,87[Aa]	8,02±1,28[Aa]	8,46±0,85[Aa]	8,08±1,14[Aa]	7,87±1,35[Aa]
	35	7,86±1,36[Aa]	7,86±1,49[Aa]	7,74±1,05[Aa]	7,99±1,46[Aa]	7,96±1,77[Aa]	7,70±1,58[Aa]	7,95±1,34[Aa]
	56	8,09±1,53[Aa]	7,70±1,61[Aa]	7,22±1,42[Aa]	7,81±1,30[Aa]	7,95±1,80[Aa]	7,88±1,16[Aa]	7,37±1,29[Aa]
	84	8,23±1,28[Aa]	8,12±1,36[Aa]	7,66±1,36[Aa]	7,63±1,60[Aa]	7,74±1,74[Aa]	7,73±1,31[Aa]	8,26±1,09[Aa]
	112	7,84±1,65[Aa]	8,43±0,95[Aa]	7,57±1,49[Aa]	7,82±1,62[Aa]	7,37±1,56[Aa]	7,62±1,48[Aa]	7,69±1,14[Aa]
	Média (tratamentos)	8,00±1,43	7,90±1,38	7,67±1,27	7,85±1,44	7,89±1,59	7,80±1,33*	7,82±1,26

Análises de variância com valores de p>0,05 para o efeito provador. Resultados com variâncias homogêneas entre os tratamentos para cada tempo e ao longo do armazenamento para cada tratamento (p>0,05).

Aa Resultados sem diferenças significativas entre os tratamentos para cada tempo de armazenamento e ao longo do tempo para um mesmo tratamento.

* Na mesma coluna para a musse T6 indica diferença significativa entre os valores médios obtidos para os armazenamentos refrigerado e congelado (p<0,01).

O sabor e a textura foram os atributos mais citados como "mais apreciados". No entanto, merecem destaque as citações relativas ao sabor dadas à musse T6 armazenada sob refrigeração, em que o número de citações como atributo "mais apreciado" diminuiu ao longo do tempo, aumentando o número como "menos apreciado" (**tabela 26**). Tal fato pode ter relação com as menores notas de aceitabilidade dadas às amostras T6 refrigeradas ao final do armazenamento. Os valores de firmeza instrumental significativamente mais elevados ($p<0,05$) para as musses refrigeradas T6 (**tabela 15**) não parecem ter tido relação com as notas baixas de aceitabilidade ao final do armazenamento, uma vez que o número de citações para textura como "atributo mais apreciado" não diminuiu aos 21 dias (**tabela 27**). Por outro lado, o número de citações para textura como atributo "mais apreciado" diminuiu ao longo do tempo para as musses refrigeradas T2 (4% de inulina), aumentando o número de citações como "menos apreciado" (**tabela 27**), embora esse fato não tenha causado maior redução nos valores de aceitabilidade dessa formulação ao final do armazenamento. Para o tratamento T2 refrigerado, os valores instrumentais de adesividade em módulo foram significativamente superiores ($p<0,05$) aos demais tratamentos aos 21 dias, sendo o dobro do valor apresentado por estas musses ao 1º dia (**tabela 17**). O aumento da adesividade pode ter sido sensorialmente perceptível aos provadores, porém, não comprometendo a aceitabilidade do produto nesse período.

Tabela 26: Distribuição das citações relacionadas ao atributo sabor obtida para as musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) por até 21 dias e sob congelamento (–18±3°C) por até 112 dias (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7).

	Classificação	Tempo (dias)	Temperatura de armazenamento (4±1°C)							Tempo (dias)	Temperatura de armazenamento (-18±3°C)						
			Musses								Musses						
			T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Citações relativas ao sabor	Mais apreciado	7	17	13	12	18	16	13	13	7	10	8	10	11	14	13	14
		14	14	15	11	15	12	8	17	35	15	11	15	14	11	16	14
		21	11	18	12	12	12	6	16	56	15	15	12	16	17	15	9
		Total (tratamentos)	42	46	35	45	40	27	46	84	13	12	13	16	15	20	15
										112	10	12	15	16	16	14	13
										Total (tratamentos)	63	58	65	73	73	78	65
	Menos apreciado	7	7	8	8	6	3	11	10	7	11	12	10	11	5	10	8
		14	9	6	9	7	10	12	8	35	6	9	10	8	10	7	7
		21	12	6	7	9	8	16	7	56	6	9	10	4	5	6	11
		Total (tratamentos)	28	20	24	22	21	39	25	84	8	8	7	7	7	4	8
										112	11	12	6	6	5	8	7
										Total (tratamentos)	42	50	43	36	32	35	41
	Indiferente*	7	1	4	5	1	6	1	2	7	4	5	5	3	6	2	3
		14	2	4	6	3	3	5	0	35	4	5	0	3	4	2	4
		21	2	1	6	4	5	3	2	56	4	1	3	5	3	4	5
		Total (tratamentos)	5	9	17	8	14	9	4	84	4	5	5	2	3	1	2
										112	4	1	4	3	4	3	5
										Total (tratamentos)	20	17	17	16	20	12	19

* Por sessão, corresponde ao número de fichas em que o atributo sabor não foi citado.

Tabela 27: Distribuição das citações relacionadas ao atributo textura obtida para as musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) por até 28 dias e sob congelamento (–18±3°C) por até 112 dias (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7).

	Classificação	Tempo (dias)	Temperatura de armazenamento (4±1°C)							Tempo (dias)	Temperatura de armazenamento (-18±3°C)						
			Musses								Musses						
			T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Citações relativas à textura	Mais apreciado	7	10	12	11	8	10	7	9	7	12	14	11	7	13	11	11
		14	12	10	11	7	12	12	7	35	11	15	10	11	8	8	11
		21	14	5	11	10	8	14	10	56	1	8	9	6	6	13	11
		Total (tratamentos)	36	27	33	25	30	33	26	84	12	11	14	11	10	6	13
										112	9	11	9	11	3	7	11
										Total (tratamentos)	45	59	53	46	40	45	57
	Menos apreciado	7	7	6	6	12	9	8	5	7	5	8	7	6	2	8	6
		14	8	11	2	12	2	4	6	35	12	5	4	8	6	7	6
		21	4	16	4	4	7	9	7	56	7	5	7	10	11	5	3
		Total (tratamentos)	19	33	12	28	18	21	18	84	3	5	5	9	7	10	5
										112	5	6	3	10	14	10	6
										Total (tratamentos)	32	29	26	43	40	40	26
	Indiferente*	7	8	7	8	5	6	10	11	7	8	3	7	12	10	6	8
		14	5	4	12	6	11	9	12	35	2	5	11	6	11	10	8
		21	7	4	10	11	10	2	8	56	7	12	9	9	8	7	11
		Total (tratamentos)	20	15	30	22	27	21	31	84	10	9	6	5	8	9	7
										112	11	8	13	4	8	8	8
										Total (tratamentos)	38	37	46	36	45	40	42

* Por sessão, corresponde ao número de fichas em que o atributo textura não foi citado.

A aparência foi mais citada como o atributo "menos apreciado" para todos os tratamentos em ambas as condições de armazenamento (**tabela 28**), estando principalmente relacionada à cor do produto, considerada pelos provadores como "muito clara" ou "pálida" para um alimento a base de goiaba (**figura 18**). A cor tem sido reconhecida como um dos principais fatores determinantes para a escolha de um alimento, geralmente refletindo as expectativas do consumidor em relação ao sabor e ao aroma desse produto. Esse comportamento do consumidor parece ser resultado de associações aprendidas ao longo de sua vida, bem como de características físicas e psíquicas inerentes ao ser humano. Nesse sentido, não é incomum a cor exercer uma forte influência sobre a percepção do sabor (FRANCIS, 1995; MARSHALL *et al.*, 2006; LEVITAN *et al.*, 2008). Nas musses elaboradas no presente trabalho, a polpa de goiaba adicionada foi fixada em 12,5% para todas as formulações, sendo o único ingrediente responsável pela cor do produto. O problema apontado pelos provadores pode ser facilmente resolvido pela indústria de alimentos através da adição do corante natural carmim de cochonilha na proporção de 0,05% nas musses, sem representar um risco à viabilidade dos microrganismos probióticos, como já verificado em trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa com queijos *petit-suisse* (MARUYAMA *et al.*, 2006; CARDARELLI *et al.*, 2008b), nos quais esse corante foi empregado.

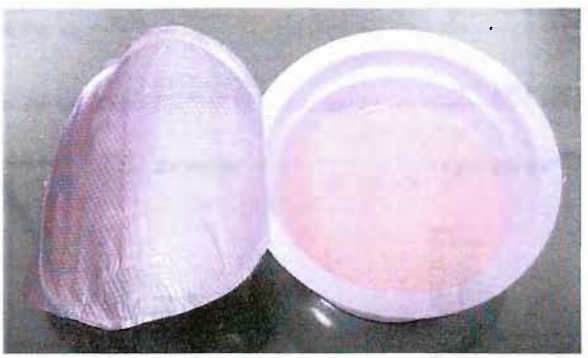


Figura 18: Aparência geral das musses servidas aos provadores na análise sensorial.

Com relação ao aroma, a maioria dos provadores mostrou-se indiferente a esse atributo (**tabela 29**).

Tabela 28: Distribuição das citações relacionadas ao atributo aparência obtida para as musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) por até 21 dias e sob congelamento (–18±3°C) por até 112 dias (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7).

	Classificação	Tempo (dias)	Temperatura de armazenamento (4±1°C)							Tempo (dias)	Temperatura de armazenamento (-18±3°C)						
			Musses								Musses						
			T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Citações relativas à aparência	Mais apreciado	7	1	3	2	4	2	2	0	7	2	4	2	3	0	0	2
		14	3	2	1	2	0	3	0	35	4	1	2	5	1	0	5
		21	2	2	1	2	0	2	1	56	2	3	1	0	0	0	2
		Total (tratamentos)	6	7	4	8	2	7	1	84	6	4	1	2	1	1	1
										112	3	1	0	6	0	2	3
										Total (tratamentos)	17	13	6	16	2	3	13
	Menos apreciado	7	6	12	11	8	10	7	8	7	4	6	9	3	0	11	7
		14	9	10	14	9	13	10	8	35	8	9	13	4	8	7	9
		21	8	10	15	15	15	7	11	56	7	7	11	12	10	12	7
		Total (tratamentos)	23	32	40	32	38	24	27	84	10	11	11	6	12	9	9
										112	4	6	14	11	7	14	10
										Total (tratamentos)	33	39	58	36	37	53	42
	Indiferente*	7	18	10	12	13	13	16	17	7	19	15	14	19	25	14	16
		14	13	13	10	14	12	12	17	35	13	15	10	16	16	18	11
		21	15	13	9	8	10	16	13	56	16	15	13	13	15	13	16
		Total (tratamentos)	46	36	31	35	35	44	47	84	9	10	13	17	12	15	15
										112	18	18	11	8	18	9	12
										Total (tratamentos)	75	73	61	73	86	69	70

* Por sessão, corresponde ao número de fichas em que o atributo aparência não foi citado.

Tabela 29: Distribuição das citações relacionadas ao atributo aroma obtida para as musses T1 a T7, armazenadas sob refrigeração (4±1°C) por até 21 dias e sob congelamento (–18±3°C) por até 112 dias (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7).

	Classificação	Tempo (dias)	Temperatura de armazenamento (4±1°C) Musses							Tempo (dias)	Temperatura de armazenamento (-18±3°C) Musses						
			T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Citações relativas ao aroma	Mais apreciado	7	2	0	0	1	2	3	4	7	3	1	2	1	0	3	0
		14	3	3	2	1	1	3	3	35	3	1	2	0	0	0	2
		21	2	1	0	5	2	0	2	56	2	3	1	1	1	4	3
		Total (tratamentos)	7	4	2	7	5	6	9	84	0	3	0	2	1	4	2
										112	1	1	0	2	2	5	2
										Total (tratamentos)	9	9	5	6	4	16	9
	Menos apreciado	7	0	0	2	0	0	0	0	7	1	0	0	0	1	0	0
		14	0	0	1	2	3	2	0	35	1	1	0	0	0	1	1
		21	0	1	0	0	2	2	0	56	0	0	1	1	1	0	1
		Total (tratamentos)	0	1	3	2	5	4	0	84	0	0	3	1	0	1	0
										112	1	0	1	1	0	0	2
										Total (tratamentos)	3	1	5	3	2	2	4
	Indiferente*	7	23	25	23	24	23	22	21	7	21	24	23	24	24	22	25
		14	22	22	22	22	21	20	22	35	21	23	23	25	25	24	22
		21	23	23	25	20	21	23	23	56	23	22	23	23	23	21	21
		Total (tratamentos)	68	70	70	66	65	65	66	84	25	22	22	22	24	20	23
										112	23	24	24	22	23	20	21
										Total (tratamentos)	113	115	115	116	119	107	112

* Por sessão, corresponde ao número de fichas em que o atributo aroma não foi citado.

5. CONCLUSÕES

- A viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* mostrou-se satisfatória até o 28º dia de armazenamento nas musses refrigeradas adicionadas de concentrado protéico de soro de leite (WPC), com populações variando entre 6 e 7 log UFC/g nesse período. Dessa forma, a adição de WPC às musses mostrou ser a melhor opção para minimizar a redução da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* no produto refrigerado.
- Por outro lado, as musses contendo a fibra prebiótica inulina apresentaram populações mais elevadas do probiótico ao final dos ensaios de simulação das condições gástrica e entérica, com destaque para a musse congelada T4 (2% de gordura láctea e 2% de inulina).
- A substituição total da gordura láctea adicionada pela adição simultânea de inulina e WPC nas musses refrigeradas e congeladas resultou em modificações na textura dos produtos, particularmente quanto ao aumento significativo ($p<0,05$) da firmeza, adesividade e gomosidade e à redução da coesividade, além da redução da aceitabilidade sensorial no produto refrigerado aos 21 dias. Quando a inulina e o WPC foram adicionados isoladamente ou quando a gordura láctea adicionada foi retirada parcialmente, as características de textura foram mantidas, além de resultarem em produtos mais saudáveis, com características sensoriais comparáveis às da musse convencional e com um maior valor funcional agregado.
- O congelamento resultou em modificações na textura dos produtos, particularmente quanto à redução da firmeza, coesividade e gomosidade. No entanto, o congelamento se mostrou como uma alternativa para o aumento da vida de prateleira das musses, por manter as populações do microrganismo probiótico superiores ou próximas a 7,5 log UFC/g durante 112 dias de armazenamento e por não resultar em prejuízo à aceitabilidade sensorial pelo consumidor.
- Dessa maneira, considerando as populações máximas do microrganismo probiótico ao longo do armazenamento e a sua sobrevivência às condições gastrintestinais simuladas *in vitro*, é recomendável a substituição parcial da

gordura láctea adicionada no produto refrigerado por WPC, na proporção de 2 a 3% da formulação. Para essa substituição parcial da gordura láctea, é recomendada a adição simultânea de WPC e inulina nas musses armazenadas sob refrigeração e congelamento, de maneira que a proporção conjunta desses ingredientes no produto não ultrapasse 2,6%, no sentido de não prejudicar a textura e as características sensoriais do produto. De modo especial para as musses congeladas, também é aconselhada a proporção 2% de gordura láctea e 2% de inulina, para a qual foram obtidos os melhores resultados nos ensaios de sobrevivência *in vitro* do probiótico.

6. TRABALHOS RESULTANTES DA PRESENTE TESE DE DOUTORADO

A presente Tese de Doutorado resultou em um depósito de pedido de patente:

- SAAD, S.M.I.; BURITI, F.C.A.; KOMATSU, T.R. Sobremesas lácteas aeradas probióticas e/ou prebióticas: seu processo de fabricação e uso. Patente de invenção depositada pela Agência USP Inovação em 21/08/2007, tendo sido protocolado junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial, São Paulo (INPI/SP) sob o nº. 018070054893. P.I. 0.703.859-3 de 23/08/2007.

Um artigo científico referente aos ensaios preliminares deste trabalho já foi publicado na forma de *Short Communication*, conforme citação a seguir:

- 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. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.39, p.315-317, 2007. (Trabalho em anexo, **anexo 12**).

Ao longo deste curso de Doutorado, dois artigos de revisão foram preparados, ambos já publicados em periódicos indexados:

- BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v.57, n.4, p.373-380, 2007.
- 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.

Esta Tese de Doutorado também resultou em 10 trabalhos apresentados em reuniões científicas, das quais duas foram no exterior. Em ordem cronológica ascendente, os trabalhos estão listados a seguir:

- BURITI, F.C.A.; KOMATSU, T.R.; SAAD, S.M.I. Influência da adição de suco concentrado e polpas congeladas de maracujá e goiaba na viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* em musses armazenadas a 4°C e a -18°C. In: SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 11, São Paulo, 2006. Res. FCF077. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.42, supl.1, p.41, 2006.
- BURITI, F.C.A; KOMATSU, T.R; SAAD, S.M.I. Influência da refrigeração e congelamento sobre o perfil de textura de musses de goiaba potencialmente simbióticas. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 7, Campinas, 2007. 1CD.
- KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SILVA, R.C.; RODRIGUES, A.M.; GIOIELLI, L.A.; SAAD, S.M.I. Influência da substituição de gordura láctea no perfil de ácidos graxos de formulações de musse de goiaba potencialmente probióticas. In: SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 12, São Paulo, 2007. Res. FCF107. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.43, supl.1, p.56, 2007.
- KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Desenvolvimento de diferentes formulações de sobremesa aerada simbiótica: caracterização química. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 15 – BIOLÓGICAS, Ribeirão Preto, 2007. 1CD.
- KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Valor nutricional de diferentes formulações de sobremesa aerada simbiótica. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 15 – BIOLÓGICAS, Ribeirão Preto, 2007. 1CD.
- 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, 2008, High Tatras. International Probiotic Conference, 3: conference proceedings. Bratislava: SAMEDI, 2008. p.49S.

- HARAMI, J.B.; SOUZA, C.H.B.; BURITI, F.C.A.; GIOIELLI, L.A.; SAAD, S.M.I. Behaviour of probiotic strains in different non-fermented dairy products during storage. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM: PREBIOTIC AND PROBIOTICS APPLICATIONS IN DAIRY PRODUCTS, 1. Campinas: ITAL, 2008. 1CD.
- BURITI, F.C.A.; HARAMI, J.B.; SOUZA, C.H.B.; SAAD, S.M.I. Effect of refrigeration, freezing and substitution of milk fat by inulin and whey protein concentrate on viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses. In: SYMPOSIUM ON LACTIC ACID BACTERIA, 9. Egmond aan Zee: FEMS, 2008. p.D082.
- BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Redução do teor lipídico e congelamento de musses de goiaba simbióticas não alteram a aceitabilidade sensorial do produto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 21. Belo Horizonte: SBCTA, 2008. 1CD.
- BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Replacing milk fat content by inulin and whey protein concentrate in the production of synbiotic guava mousses and the implications for probiotic viability and texture profile. In: JORNADA INTERNACIONAL DE PROTEÍNAS E COLÓIDES ALIMENTARES, 5. Campinas: ITAL, 2008. p.26.

O seguinte trabalho, também apresentado em reunião científica no exterior, foi relativo ao acompanhamento de um dos projetos de pesquisa envolvendo ecologia microbiana e biologia molecular de bactérias láticas durante a visita à Wageningen University, Wageningen, Holanda:

- CARDARELLI, H.R.; BURITI, F.C.A.; SMIDT, H.; SAAD, S.M.I. Comparison of *Lactobacillus sobrius* abilities to assimilate glucomannan oligosaccharides (GMO), fructooligosaccharides (FOS) and trans-galactooligosaccharides (TOS). SYMPOSIUM ON LACTIC ACID BACTERIA, 9, Egmond aan Zee, Holanda, 2008. p.G083.

Os seguintes artigos científicos, relativos a esta Tese de Doutorado, estão sendo preparados para serem submetidos à publicação em periódicos indexados:

- 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. Em fase de redação para ser submetido à publicação no periódico *International Journal of Food Microbiology*, Elsevier.
- BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Effect of refrigeration, freezing and substitution of milk fat by inulin and whey protein concentrate on texture profile and sensorial acceptance of synbiotic guava mousses. Em fase de redação para ser submetido à publicação no periódico *Food Chemistry* ou *LWT-Food Science and Technology*, ambos da Elsevier (a ser decidido posteriormente).
- KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SILVA, R.C.; GIOIELLI, L.A.; SAAD, S.M.I. Substitution of milk fat by inulin and whey protein concentrate in synbiotic guava mousses: chemical composition and implications in the nutritional value. Em fase de redação para ser submetido à publicação no periódico *Química Nova*, Sociedade Brasileira de Química.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS[1]

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista das alegações aprovadas. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 7 ago. 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria nº. 15, de 30 de abril de 1999. O Ministério da Saúde institui junto à Câmara Técnica de Alimentos a Comissão de Assessoramento de Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 14 maio 1999a. Seção 2.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº. 12, de 02 de janeiro de 2001. A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 10 jan. 2001. Disponível em: http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id= 144#. Acesso em: 22 set. 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº. 16, de 30 de abril de 1999b. Regulamento técnico de procedimentos para registro de alimentos e ou novos ingredientes. Disponível em: http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/show Act.php?id=107& mode=PRINT_VERSION. Acesso em: 7 ago. 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº. 18, de 30 de abril de 1999c. Aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Disponível em: http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSI ON&id=109. Acesso em: 7 mar. 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº. 19, de 30 de abril de 1999d. Aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro de alimentos com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. Disponível em: http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php ?mode=PRINT_VERSION&id=110. Acesso em: 7 ago. 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº. 266, de 22 de setembro de 2005. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico para gelados comestíveis e preparados para gelados comestíveis. Disponível em: http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct. php?id=18825&word=Acesso em 27 out. 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº. 359, de 23 de dezembro de 2003. Aprova regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. *Diário Oficial da União*, Brasília,

[1] De acordo com a NBR6023/2002 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT).

26 dez. 2003a. Disponível em: http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php ?id=9058#'. Acesso em: 24 fev. 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº. 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. *Diário Oficial da União*, Brasília, 26 dez. 2003b. Disponível em: http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=9059#. Acesso em: 24 fev. 2006.

AKALIN, A.S.; GÖNÇ, S.; ÜNAL, G.; FENDERYA, S. Effects of fructooligosaccharide and whey protein concentrate on the viability of starter culture in reduced-fat probiotic yogurt during storage. *Journal of Food Science*, v.72, n.7, p.M222-M227, 2007.

AKIN, M.B.; AKIN, M.C.; KIRMACI, Z. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. *Food Chemistry*, v.104, p.93-99, 2007.

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

AMERICAN OIL CHEMISTS. SOCIETY. *Official methods and recommended practices of the AOCS*. 4.ed. Champaign: AOCS, 1990,Ce 1- 62.

ANDREASEN, T.G.; NIELSEN, H. Ice cream and aerated desserts. In: EARLY, R., ed. *The technology of dairy products.* 2.ed. London: Blackie Academic & Professional, 1998. p.321-326.

ANTUNES, A.E.C.; CAZETTO, T.F.; BOLINI, H.M.A. Viability of probiotic micro-organisms during storage, postacidification and sensory analysis of fat-free yogurts with added whey protein concentrate. *International Journal of Dairy Technology*, v.58, n.3, p.169-173, 2005.

ARAGON-ALEGRO, L.C.; ALEGRO, J.H.C.; CARDARELLI, H.R.; CHIU, M.C.; SAAD, S.M.I. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. *LWT – Food Science and Technology*, v.40, p.669-675, 2007.

ARCHER, D.L. Freezing: an underutilized food safety technology? *International Journal of Food Microbiology*, v.90, p.127-138, 2004.

ARICI, M.; BILGIN, B.; SAGDIC, O.; OZDEMIR, C. Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces. *Food Microbiology*, v.21, p.19-24, 2004.

ARVANITOYANNIS, I.S.; VAN HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, 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.

ASAD, U.; EMENAKER, N.J.; MILNER, J.A. Designing studies and rodent models for studying prebiotics for colorectal cancer prevention. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B., ed. *Handbook of prebiotics*. Boca Raton: CRC, 2008. p.263-284.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS. *Anuário Brasileiro das Indústrias de Alimentação*. ABIA: s.l., 2006. Disponível em: http://www.anuarioabia.com.br/editorial_05.htm. Acessado em 01 ago. 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis*. 17.ed, 2.rev. Gaithersburg: AOAC, 2003a. v.1, p.12.1-12.3.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis*. 17.ed, 2.rev. Gaithersburg: AOAC, 2003b. v.2, p.33.1-33.88.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S., WRIGHT, A., OUWEHAND, A., ed. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 2004. p.1-66.

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.

BEGLEY, M.; GAHAN, C.G.M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, v.29, p.625-651, 2005.

BETORET, N.; PUENTE, L.; DÍAZ, M.J.; PAGÁN, M.J.; GARCÍA, M.J.; GRAS, M.L.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J.; FITO, P. Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal of Food Engineering*, v.56, p.273-277, 2003.

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.

BOWER, J.A. Statistics for food science – V: ANOVA and multiple comparisons (part B). *Nutrition and Food Science*, v.28, n.1, p.41-48, 1998a.

BOWER, J.A. Statistics for food science – V part C: non-parametric ANOVA. *Nutrition and Food Science*, v.28, n.2, p.102-108, 1998b.

BOWER, J.A. Statistics for food science IV: two sample tests. *Nutrition and Food Science*, v.27, n.1, p.39-43, 1997.

BRASIL. Portaria no. 27, de 13 de janeiro de 1998. O Ministério da Saúde aprova o regulamento técnico referente à informação nutricional complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes), constantes do anexo desta Portaria. *Diário Oficial da União*, Brasília, 16 jan. 1998. Disponível em: http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=97#. Acesso em: 16 ago. 2005.

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 coculture 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. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.39, 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.; ROCHA, J.S.; ASSIS, E.G.; SAAD, S.M.I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v.38, 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, p.1279-1288, 2005b.

BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v.57, p.373-380, 2007.

CAMACHO, M.M.; MARTÍNEZ-NAVARRETE, N.; CHIRALT, A. Stability of whipped dairy creams containing locust bean gum/λ-carrageenan mixtures during freezing-thawing processes. *Food Research International*, v.34, p.887-894, 2001.

CANI, P.D.; BURCELIN, R.; KNAUF, C. Prebiotics and modulation of gastrointestinal peptides. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B., ed. *Handbook of prebiotics*. Boca Raton: CRC, 2008. p.247-262.

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, 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, p.1037-1046, 2008b.

CARDARELLI, H.R.; SAAD, S.M.I.; GIBSON, G.R.; VULEVIC, J. Functional *petit-suisse* cheese: measure of the prebiotic effect. *Anaerobe*, v.13, p.200-207, 2007.

CÉRANTOLA, S.; KERVAREC, N.; PINCHON, R.; MAGNÉ, C.; BESSIERES, M.A.; DESLANDES, E. NMR characterization of inulin-type fructooligosaccharides as the major water-soluble carbohydrates from *Matricaria maritima* (L.). *Carbohydrate Research*, v.339, n.14, p.2445-2449, 2004.

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.

CHRISTIE, W.W. *Lipid analysis:* isolation, separation, identification and structural analysis of lipids. Oxford: Pergamon, 1982. 207p.

COMPENDIUM *of methods for the microbiological examination of foods.* 4.ed. Washington: APHA, 2001. 676p.

CONOVER, W. J. *Practical nonparametric statistics.* 3.ed. New York: Wiley, 2001. 124p.

CONRAD, P.B.; MILLER, D.P.; CIENLENSKI, P.R.; PABLO, J.J. Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology*, v.41, p.17-24, 2000.

CRITTENDEN, R.; WEERAKKODY, R.; SANGUANSRI, L.; AUGUSTIN, M. Synbiotic microcapsules that enhance microbial viability during nonrefrigerated storage and gastrointestinal transit. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, n.3, p.2280-2282, 2006.

DALGLEISH, D.G. Food emulsions – their structures and structure-forming properties. *Food Hydrocolloids*, v.20, p.415-422, 2006.

DANIELLS, S. Synbiotics and chocolate mousse – a tasty combination? *Nutraingredients.com/Europe*, 2007. Available at: http://www. nutraingredients.com/news/ng.asp?n=74551&m=1nie227&c=tgjnksatfttkbcj. Accessed: 27 feb. 2007.

DAVIDSON, R.H.; DUNCAN, S.E.; HACKNEY, C.R.; EIGEL, W.N.; BOLING, J.W. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. *Journal of Dairy Science*, v.82, p.666-673, 2000.

DELZENNE, N.M.; NEYRINCK, A.M. Prebiotics and lipids metabolism: review of experimental and human data. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B., ed. *Handbook of prebiotics*. Boca Raton: CRC, 2008. p.201-218.

DELZENNE, N.M.; ROBERFROID, M.R. Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v.27, p.1-6, 1994.

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

DUNKER, K.L.L.; ALVARENGA, M.; MORIEL, P. Grupo do leite, queijo e iogurte. In: PHILIPPI, S.T. *Pirâmide dos alimentos:* fundamentos básicos da nutrição. Barueri: Manole, 2008. p.99-165.

DYMINSKI, D.S.; WASZCYNSKYJ, N.; RIBANI, R.H.; MASSON, M.L. Características físico-químicas de musse de maracujá (*Passiflora*) elaborado com substitutos de gorduras. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, v.18, n.2, p.267-274, 2000.

EL-NAGAR, G.; CLOWES, G.; TUDORICĂ, M.; KURI, V.; BRENNAN, C.S. Rheological quality and stability of yog-ice cream with added inulin. *International Journal of Dairy Technology*, v.55, n.2, p.89-93, 2002.

EMAM-DJOME, Z.; MOUSAVI, M.E.; GHORBANI, A.V.; MADADLOU, A. Effect of whey protein concentrate addition on the physical properties of homogenized sweetened dairy creams. *International Journal of Dairy Technology*, v.61, n.2, p.183-191, 2008.

FARRELL, H.M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G.T.; BROWN, E.M.; BUTLER, J.E.; CREAMER, L.K.; HICKS, C.L.; HOLLAR, C.M.; NG-KWAI-HANG, K.F.; SWAISGOOD, H.E. Nomenclature of the proteins of cows' milk – sixth revision. *Journal of Dairy Science*, v.87, p.1641-1674, 2004.

FILISETTI, T.M.C.C. Fibra alimentar: definição e métodos analíticos. In: LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. *Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos*. São Paulo: Ed. USP, 2006. p. 257-286.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf. Acessado em 15 dez. 2005.

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

FRANCIS, F.J. Quality as influenced by color. *Food Quality and Preference*, v.6, p.149-155, 1995.

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

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

GEIER, M.S.; BUTLER, R.N.; GIFFARD, P.M.; HOWARTH, G.S. Prebiotic and synbiotic fructooligosaccharide administration fails to reduce the severity of experimental colitis in rats. *Diseases of the Colon & Rectum*, v.50, p.1061-1069, 2007.

GIBSON, G.R.; BEATY, E.R.; WANG, X.; CUMMINGS, J.H. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*, v.108, p.975-982, 1995.

GIBSON, G.R.; FULLER, R. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward indentifying probiotics and prebiotics for human use. *Journal of Nutrition*, v.130, p.391S-394S, 2000.

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

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, v.125, p.1401-1412, 1995.

GILLILAND, S.E. Probiotics and prebiotics. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L. *Applied dairy microbiology*. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2001. p.327-343.

GLASSER, F.; DOREAU, M.; FERLAY, A.; CHILLIARD, Y. Technical note: estimation of milk fatty acid yield from milk fat data. *Journal of Dairy Science*, v.90, p.2302-2304, 2007.

GOFF, H.D.; GRIFFITHS, M.H. Major advances in fresh milk and milk products: fluid milk products and frozen desserts. *Journal of Dairy Science*, v.89, p.1163-1173, 2006.

GOKAVI, S.; ZHANG, L.; HUANG, M.K; ZHAO, X.; GUO, M. Oat-based symbiotic beverage fermented by *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* ssp. *casei*, and *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Food Science*, v.70, n.4, p.M216-M223, 2005.

GREGER, J.L. Nondigestible carbohydrates and mineral bioavailability. *Journal of Nutrition*, v.129, suppl. 7, p.1434S-1435S, 1999.

GUARNER, F. Prebiotics in inflammatory bowel diseases. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B., ed. *Handbook of prebiotics*. Boca Raton: CRC, 2008. p.375-392.

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

GUVEN, M.; YASAR, K.; KARACA, O.B.; HAYALOGLU, A. The effect of inulin as a fat replacer on the quality of set-type low-fat yogurt manufacture. *International Journal of Dairy Technology*, v.58, n.3, p.180-184, 2005.

HAARMAN, M.; KNOL, J. Quantitative real-time PCR assays to identify and quantify fecal *Bifidobacterium* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, n.5, p.2318-2324, 2005.

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

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, v.22, p.475-476, 494, 1973.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables and commercial frozen fruit pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.2928-2935, 2005.

HAWTHORNE, K.M.; ABRAMS, S.A. Prebiotics and the absorption of minerals: a review of experimental and human data. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B., ed. *Handbook of prebiotics*. Boca Raton: CRC, 2008. p.105-113.

HEKMAT, S.; McMAHON, D.J. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. *Journal of Dairy Science*, v.75, p.1415-1422, 1992.

HENSON, S. MASAKURE, O.; CRANFIELD, J. The propensity for consumers to offset health risks through the use of functional foods and nutraceuticals: the case of lycopene. *Food Quality and Preference*, v.19, p.395-406, 2008.

HERCEG, Z.; REŽEC, A.; LELAS, V.; KREŠIĆ, G.; FRANETOVIĆ, M. Effect of carbohydrates on the emulsifying, foaming and freezing properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*, v.79, p.279-286, 2007.

HICKSON, M.; D'SOUZA, A.L., MUTHU, N.; ROGERS, T.R.; WANT, S.; RAJKUMAR, C. BULPITT, C.J. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *British Medical Journal*, v.335, n.7610, p.80-83, 2007.

HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, v.35, n.2/3, p.109-116, 2002.

HONG, S.H.; MARSHALL, R.T. Natural exopolysaccharides enhance survival of lactic acid bacteria in frozen dairy desserts. *Journal of Dairy Science*, v.84, p.1367-1374, 2001.

IMRAM, N. Colour and appearance of chilled mousse: a factorial study of ingredient and processing effects. *Nutrition & Food Science*, v.99, n.1, p.19-23, 1999.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.* 4.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 1018p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. *Fermented and non-fermented milk products. Detection and enumeration of Lactobacillus acidophilus. Culture media.* Bulletim of the IDF 306. Brussels: IDF, 1995.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. Probiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v.18, n.2, p.299-313, 2004.

ITAYA, N.M.; ASEGA, A.F.; CARVALHO, M.A.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Hydrolase and fructosyltransferase activities implicated in the accumulation of different chain size fructans in three Asteraceae species. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.45, p.647-656, 2007.

JAIN, P.K.; McNAUGHT, C.E.; ANDERSON, A.D.; MacFIE, J.; MITCHELL, C.J. Influence of synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium lactis* Bb12, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and oligofructose on gut barrier function and sepsis in critically ill patients: a randomized controlled trial. *Clinical Nutrition*, n.23, p.467-475, 2004.

JANER, C.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Caseinomacropeptide and whey protein concentrate enhance *Bifidobacterium lactis* growth in milk. *Food Chemistry*, v.86, p.263-267, 2004.

JENSEN, R.G. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*, v.85, p.295-350, 2002.

JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RINCÓN, M.; PULIDO, R.; SAURA-CALIXTO, F. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, p.5489-5493, 2001.

JONES, P.J.; JEW, S. Functional food development: concept to reality. *Trends in Food Science and Technology*, v.18, p.387-390, 2007.

JONG, N.; KLUNGEL, O.H; VERHAGEN, H.; WOLFS, M.C.J.; OCKÉ, M.C.; LEUFKENS, H.G.M. Functional foods: the case for closer evaluation. *British Medical Journal*, v.334, p.1037-1039, 2007.

JUNTUNEN, M., KIRJAVAINEN, P.V., OUWEHAND, A.C., SALMINEN, S.J., ISOLAURI, E. Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.8, p.293-296., 2001.

KAPLAN, H.; HUTKINS, R.W. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, n.6, p.2682-2684, 2000.

KAUR, N.; GUPTA, A.K. Applications of inulin and oligofrutose in health and nutrition. *Journal of Bioscience*, v.27, n.7, p.703-714, 2002.

KELLOW, J.E.; AZPIROZ, F.; DELVAUX, M.; GEBHART, G.F.; MERTZ, H.R.; QUIGLEY, E.M.M.; SMOUT, A.J.P.M. Applied principles of neurogastroenterology: physiology/ motility sensation. *Gastroenterology*, v.130, p.1412-1420, 2006.

KIM, Y.; FAQIH, M.N.; WANG, S.S. Factors affecting gel formation of inulin. *Carbohydrate Polymers*, v.46, p.135-145, 2001.

KLAENHAMMER, T.R. Probiotics and prebiotics. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. *Food microbiology:* fundamentals and frontiers. 2nd. ed. Washington: ASM, 2001. p.797-811.

KLINDER, A.; GLEI, M.; POOL-ZOBEL, L. Prebiotics and reduction of risk of carcinogenesis: review of experimental and human data. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B., ed. *Handbook of prebiotics.* Boca Raton: CRC, 2008. p.295-328.

KOLIDA, S.; GIBSON, G.R. The prebiotic effect: review of experimental and human data. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B., ed. *Handbook of prebiotics.* Boca Raton: CRC, 2008. p.69-92.

KOLIDA, S.; TUOHY, K.; GIBSON, G.R. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, v.87, suppl.2, p.S193-S197, 2002.

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.

KOS, B., ŠUŠKOVIĆ, J. GORETA, J., MATOŠIĆ, S. Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. *Food Technology and Biotechnology*, v.38, n.2, p.121-127, 2000.

KOSARAJU, S.L. Colon targeted delivery systems: review of polysaccharides for encapsulation and delivery. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.45, n.44, p.251-258, 2005.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, v.14, p.737-743, 2004.

KRISSANSEN, G.W. Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications. *Journal of the American College of Nutrition*, v.26, n.6, p.713S-723S, 2007.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; MORALES, M.T. FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciência Rural*, v.36, n.4, p.1283-1287, 2006.

LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. *Sensory evaluation of foods:* principles and practices. Gaithersburg: Aspen, 1999. 827p.

LEATHWOOD, P.D.; RICHARDSON, D.P.; STRÄTER, P., TODD, P.M.; VAN TRIJP, H.C.M. Consumer understanding of nutrition and health claims: sources of evidence. *British Journal of Nutrition*, v.98, p.474-484, 2007.

LEVITAN, C.A.; ZAMPINI, M.; LI, R.; SPENCE, C. Assessing the role of color cues and people's beliefs about color-flavor associations on the discrimination of the flavor of sugar-coated chocolates. *Chemical Senses*, v.33, n.5, p.415-423, 2008.

LIONG, M.T. Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: postulated mechanisms and *in vivo* evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, v.9, p.854-863, 2008.

LISERRE, A.M.; RÉ, M.I.; FRANCO, B.D.G.M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Biotechnology*, v.21, p.1-16, 2007.

LOBATO-CALLEROS, C.; REYES-HERNÁNDEZ, J.; BERISTAIN, C.I.; HORNELAS-URIBE, Y.; SÁNCHEZ-GARCÍA, J.E.; VERNON-CARTER, E.J. Microstructure and texture of White fresh cheese made with canola oil and whey protein concentrate in partial or total replacement of milk fat. *Food Research International*, v.40, p.529-537, 2007.

LOBO, A.R.; COLLI, C.; ALVARES, E.P.; FILISETTI, T.M.C.C. Effects of fructans-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) flour on caecum mucosal morphometry, calcium and magnesium balance, and bone calcium retention in growing rats. *British Journal of Nutrition*, v.97, p.776-785, 2007.

LOBO, A.R.; COLLI, C.; FILISETTI, T.M.C.C. Fructooligosaccharides improve bone mass and biomechanical properties in rats. *Nutrition Research*, v.26, p.413-420, 2006.

LUHOVYY, B.L.; AKHAVAN, T.; ANDERSON, G.H. Whey proteins in the regulation of food intake and satiety. *Journal of the American College of Nutrition*, v.26, n.6, p.704S-712S, 2007.

MACFARLANE, G.T.; STEED, H.; MACFARLANE, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, v.104, p.305-344, 2008.

MAGARIÑOS, H.; SELAIVE, S.; COSTA, M.; FLORES, M.; PIZARRO, O. Viability of probiotic micro-organisms (*Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12) in ice cream. *International Journal of Dairy Technology*, v.60, n.2, p.128-134, 2007.

MAHATTANATAWEE, K.; MANTHEY, J.A.; LUZIO, G.; TALCOTT, S.T.; GOODNER, K.; BALDWIN, E.A. Total antioxidant activity and fiber content of select Florida-grown tropical fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, p.7355-7356, 2006.

MAKRAS, L.; VAN ACKER, G.; DE VUYST, L. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, n.11, p.6531-6537, 2005.

MANNING, T.S.; GIBSON, G.R. Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v.18, n.2, p.287-298, 2004.

MARSHALL, D.; STUART, M.; BELL, R. Examining the relationship between product package colour and product selection in preschoolers. *Food Quality and Preference*, v.17, n.7-8, p.615-621, 2006.

MARTÍN-DIANA, A.B.; JANER, C.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, v.13, p.827-833, 2003.

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.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, v.12, p.173-182, 2002.

McCOMAS JR, K.A.; GILLILAND, S.E. Growth of probiotic and traditional yogurt cultures in milk supplemented with whey protein hydrolysate. *Journal of Food Science*, v.68, n.6, p.2090-2095, 2003.

MERCADANTE, A.Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Carotenoids from guava (*Psidium guajava* L.): isolation and structure elucidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.47, p.145-151, 1999.

MILETIĆ, I.; ŠOBAJIĆ, S.; ĐORĐEVIĆ, B. Functional foods and their role in the improvement of health status. *Journal of Medical Biochemistry*, v.27, n.3, p.367-370, 2008.

MORENO, Y.; COLLADO, M.C.; FERRÚS, M.A.; COBO, J.M.; HERNÁNDEZ, E.; HERNÁNDEZ, M. Viability assessment of lactic acid bacteria in commercial dairy products stored at 4°C using LIVE/DEAD® BacLight™ staining and conventional plate counts. *International Journal of Food Science and Technology*, v.41, p.275-280, 2006.

MÜLLER-FISCHER, N.; WINDHAB, E.J. Influence of process parameters on microstructure of food foam whipped in a rotor–stator device within a wide static pressure range. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,* v.263, p.353-362, 2005.

MURPHY, O. Non-polyol low-digestible carbohydrates: food applications and functional benefits. *British Journal of Nutrition*, v.85, suppl.1, p. S47-S53, 2001.

NERSTEDT, A.; NILSSON, E.C.; OHLSON, K.; HÅKANSSON, J.; SVENSSON, L.T.; LÖWENADLER, B.; SVENSSON, U.K.; MAHLAPUU, M. Administration of *Lactobacillus* evokes coordinated changes in the intestinal expression profile of genes regulating energy homeostase and immune phenotype in mice. *British Journal of Nutrition*, v.97, p.1117-1127, 2007.

NINESS, K.R. Inulin and oligofructose: what are they? *Journal of Nutrition*, v.129, suppl.7, p.1402S-1406S, 1999.

OLSON, D.W.; WHITE, C.H.; WATSON, C.E. Properties of frozen dairy desserts processed by microfluidization of their mixes. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.1157-1162, 2003.

PAK, N. Inulina y fructooligosacáridos: propriedades nutricionales y funcionales. In: LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. *Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos*. São Paulo: Ed. USP, 2006. p. 337-356.

PASCOAL, G.B. *Fermentabilidade de frutanos de cebola (Allium cepa L.): estudo in vivo, in vitro e do efeito trófico no intestino grosso.* Tese. Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, 2007.

PÉREZ-CANO, F.J.; MARIN-GALLÉN, S.; CASTELL, M.; RODRÍGUEZ-PALMERO, M.; RIVERO, M.; FRANCH, A.; CASTELLOTE, C. Bovine whey protein concentrate supplementation modulates maturation of immune system in suckling rats. *British Journal of Nutrition*, v.98, suppl.1, p.S80–S84, 2007.

PHILLIPS, M.; KAILASAPATHY, K.; TRAN, L. Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v.108, p.276–280, 2006.

PINTO, E.P.; TEIXEIRA, A.M.; SOPENA, L.L.; ROSA, V.P.; LUVIELMO, M.M. Sucralose no desenvolvimento de sobremesas lácteas light. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, v.21, n.1, p.49-60, 2003.

POULAIN, N.; DEZ, I.; PERRIO, C.; LASNE, M.C.; PRUD'HOMME, M.P.; NAKACHE, E. Microspheres based on inulin for the controlled release of serine

protease inhibitors: preparation, characterization and in vitro release. *Journal of Controlled Release*, v.92, p.27-38, 2003.

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.

PROSKY, L.; ASP, N.G.; FURDA, I.; DEVRIES, J.W.; SHWEIZER, T. S.; HARLAND, B.F. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods, and food products: interlaboratory study. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, v.71, p.1017-1023, 1988.

PROSKY, L.; HOEBREGS, H. Methods to determine food inulin and oligofructose. *Journal of Nutrition*, v.129, p.1418S-1423S, 1999.

QUEIROZ, V.A.V.; BERBERT, P.A.; MOLINA, M.A.B.; GRAVINA, G.A.; QUEIROZ, L.R.; SILVA, J.A. Qualidade nutricional de goiabas submetidas aos processos de desidratação por imersão-impregnação e secagem complementar por convecção. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.28, n.2, p.329-340, 2008.

QUIGLEY, E.M.M.; QUERA, R. Small intestinal bacterial overgrowth: roles of antibiotics, prebiotics, and probiotics. *Gastroenterology*, v.130, p.S78-S90, 2006.

RAO, V.A. The prebiotic properties of oligofructose at low intake levels. *Nutrition Research*, v.21, p.843-848, 2001.

REID, G.; SANDERS, M.E.; GASKINS, R.; GIBSON, G.R.; MERCENIER, A.; RASTALL, R.; ROBERFROID, M.; ROWLAND, I.; CHERBUT, C.; KLAENHAMMER, T.R. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v.37, n.2, p.105-118, 2003.

ROBERFROID, M.B. Caloric value of inulin and oligofructose. *Journal of Nutrition*, v.129, suppl.7, p.1436S-1437S, 1999b.

ROBERFROID, M.B. Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. *Journal of Nutrition*, v.129, suppl.7, p.1398S-1401S, 1999a.

ROBERFROID, M.B. Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, v.87, suppl.2, p.S139-S143. 2002.

ROBERFROID, M.B. General introduction: prebiotics in nutrition. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B., ed. *Handbook of prebiotics*. Boca Raton: CRC, 2008a. p.1-11.

ROBERFROID, M.B. Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition*, v.93, suppl.1, p.S13-S25, 2005a.

ROBERFROID, M.B. *Inulin-type fructans:* functional food ingredients. Boca Raton: CRC, 2005b. 359p.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics: concept, definition, criteria, methodologies, and products. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B., ed. *Handbook of prebiotics*. Boca Raton: CRC, 2008b. p.39-68.

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

ROBERFROID, M.B.; VAN LOO, J.A.E.; GIBSON, G.R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *Journal of Nutrition*, v.128, p.11-19, 1998.

ROCHA, J.R.; CATANA, R.; FERREIRA, B.S.; CABRAL, J.M.S.; FERNANDES, P. Design and characterisation of an enzyme system for inulin hydrolysis. *Food Chemistry*, v.95, p.77-82, 2006.

ROCHET, V.; RIGOTTIER-GOIS, L.; SUTREN, M.; KREMENTSCK, M.N.; ANDRIEUX, C.; FURET, J.P.; TAILLIEZ, P.; LEVENEZ, F.; MOGENET, A.; BRESSON, J.L.; MÉANCE, S.; CAYUELA, C.; LEPLINGARD, A.; DORÉ, J. Effects of orally administered *Lactobacillus casei* DN-114 001 on the composition or activities of the dominant faecal microbiota in healthy humans. *British Journal of Nutrition*, v.95, p.421-429, 2006.

RODRIGUES, J.N. *Reestruturação por mistura e interesterificação da gordura do leite com óleo de milho.* Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, 2002.

RODRIGUES, J.N.; GIOIELLI, L.A. Chemical interesterification of milkfat and milkfat-corn oil blends. *Food Research International*, v.36, p.149-159, 2003.

RODRIGUES, J.N.; TORRES, R.P.; MANCINI-FILHO, J.; GIOIELLI, L.A. Physical and chemical properties of milkfat and phytosterol esters blends. *Food Research International*, v.40, p.748-755, 2007.

RUGER, P.R.; BAER, R.J.; KASPERSON, K.M. Effect of double homogenization and whey protein concentrate on texture of ice cream. *Journal of Dairy Science*, v.85, p.1684-1692, 2002.

RUTHERFURD-MARKWICK, K.J.; JOHNSON, D.; CROSS, M.L.; GILL, H.S. Modified milk powder supplemented with immunostimulating whey protein concentrate (IMUCARE) enhances immune function in mice. *Nutrition Research*, v.25, p.192-203, 2005.

SANDOVAL-CASTILLA, O.; LOBATO-CALLEROS, C.; AGUIRRE-MANDUJANO, E.; VERNON-CARTER, E.J. Microstructure and texture of yogurt as influenced by fat replacers. *International Dairy Journal*, v.14, n.2, p.151-159, 2004.

SANTOS, K.M.O.; AQUINO, R.C. Grupo dos óleos e gorduras. In: PHILIPPI, S.T. *Pirâmide dos alimentos:* fundamentos básicos da nutrição. Barueri: Manole, 2008. p.241-292.

SARKAR, S. Functional foods as self-care and complementary medicine. *Nutrition & Food Science*, v.37, n.3, p.160-167, 2007.

SCHALLER-POVOLNY, L.A.; SMITH, D.E. Sensory attributes and storage life of reduced fat ice cream as related to inulin content. *Journal of Food Science*, v.64, n.3, p.555-559, 1999.

SCHILLINGER, U.; GUIGAS, C.; HOLZAPFEL, W.H. *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *International Dairy Journal*, v.15, p.1289-1297, 2005.

SCHNEEMAN, B.O. Fiber, inulin and oligofructose: similarities and differences. *Journal of Nutrition*, v.129, suppl.7, p.1424S-1427S, 1999.

SCHWAGER, J.; MOHAJERI, M.H.; FOWLER, A.; WEBER, P. Challenges in discovering bioactives for the food industry. *Current Opinion in Biotechnology*, v.19, p.66-72, 2008.

SHAH, N.P. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, v.17, p.1262-1277, 2007.

SHILS M.E.; OLSON J.A.; SHINE M.; ROSS A.C. *Modern nutrition in health and disease.* 9 ed. Baltimore: Lipincott Williams & Wilkins, 1999. 1951p.

SILBERNAGEL, K.M.; JECHOREK, R.P.; CARVER, C.N. 3M™ Petrifilm™ Staph Express count plate method for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in selected dairy foods: collaborative study. *Journal of AOAC International*, v.86, n.5, p.963-970, 2003.

SINDAYIKENGERA, S.; XIA, W. Nutritional evaluation of caseins and whey proteins and their hydrolysates from Protamex. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B,* v.7, n.2, p.90-98, 2006.

SMERUD, H.K; KLEIVELAND, C.H.; MOSLAND, A.R.; GRAVE, G.; BIRKELAND, S.E. Effect of a probiotic milk product on gastrointestinal and respiratory infections in children attending day-care. *Microbial Ecology in Health and Disease*, v.20, p.80-85, 2008.

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

SOLER, J.M.P; YAMAGUCHI, A.M. *Relatório de análise estatística sobre o projeto "Desenvolvimento de queijo fresco simbiótico".* São Paulo: IME-USP, 2004. 75p. [Relatório 04P22].

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, 2009.

STORY, M.; KAPHINGST, K.M.; ROBINSON-O'BRIEN, R.; GLANZ, K. Creating healthy food and eating environments: policy and environmental approaches. *Annual Review of Public Health*, v.29, p.253-272, 2008.

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.

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

SURH, J.; WARD, L.S.; McCLEMENTS, D.J. Ability of conventional and nutritionally-modified whey protein concentrates to stabilize oil-in-water emulsions. *Food Research International*, v.39, p.761-771, 2006.

TALWALKAR, A.; MILLER, C.W.; KAILASAPATY, K.; NGUYEN, M.H. Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, v.39, p.605-611, 2004.

TÁRREGA, A.; COSTELL, E. Effect of inulin addition on rheological and sensory properties of fat-free starch-based dairy desserts. *International Dairy Journal*, v.16, p.1104-1112, 2006.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. *Tabela brasileira de composição de alimentos – TACO: versão 2.* 2.ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2006. 113p.

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

VÁSQUEZ, A.; MOLIN, G.; PETTERSSON, B.; ANTONSSON, M.; AHRNE, S. DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus caseilparacasei* and related species. *Systematic and Applied Microbiology*, v.28, n.5, p.430-441, 2005.

VILLANUEVA, N.D.M. *Avaliação do desempenho de quatro métodos de escalonamento em testes sensoriais de aceitação utilizando modelos normais aditivos de análise da variância e mapas internos de preferência.* Tese. Departamento de Alimentos e Nutrição. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2003. 140p.

VILLANUEVA, N.D.M.; PETENATE, A.J.; DA SILVA, M.A.A.P. Performance of three affective methods and diagnosis of the ANOVA model. *Food Quality and Preference*, v.11, p.363-370, 2000.

VILLAROEL, M.; PINO, L.; HAZBÚN, J. Desarrollo de una formulación optimizada de mousse de linaza (*Linum usitatissimum*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v.56, n.2, p.185-191, 2006.

VILLEGAS, B.; COSTELL, E. Flow behaviour of inulin-milk beverages: influence of inulin average chain length and of milk fat content. *International Dairy Journal*, v.17, p.776-781, 2007.

WANG, K.Y.; LI, S.N.; LIU, C.S.; PEMG, 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*. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.80, p.737-741, 2004.

WELLS, A.L.; SAULNIER, D.M.A.; GIBSON, G.R. Gastrointestinal microflora and interactions with gut mucosa. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B., ed. *Handbook of prebiotics.* Boca Raton: CRC, 2008. p.13-38.

WILLIAMS, P.; GHOSH, D. Health claims and functional foods. *Nutrition & Dietetics*, v.65, suppl.3, p.S89-S93, 2008.

WU, H.; XIE, J.; MORBIDELLI, M. Kinetics of cold-set diffusion-limited aggregations of denatured whey protein isolate colloids. *Biomacromolecules*, v.6, p.3189-3197, 2005.

YAN, F.; CAO, H.; COVER, T.L.; WHITEHEAD, R.; WASHINGTON, M.K.; POLK, D.B. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology*, v.132, p.562-575, 2007.

ZIETEMANN, C.; ROBERTO, S.R. Produção de mudas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) em diferentes substratos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.29, n.1, p.137-142, 2007.

ZIMERI, J.E.; KOKINI, J.L. Morphological characterization of the phase behavior of inulin-waxy maize starch systems in high moisture environments. *Carbohydrate Polymers*, v.52, p.225-236, 2003.

Anexo 1: Ofício de aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 059/2005

São Paulo, 26 de abril de 2005.

Ilmo(a). Sr(a).
Flavia Carolina Alonso Buriti

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 25 de abril 2005, **APROVOU** o projeto "Sobremesa Aerada Simbiótica: Desenvolvimento do Produto e Resistência do Probiótico *In Vitro*" (Protocolo nº 296) apresentado por Vossa Senhoria.

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. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP

Orientador: Prof. Susana Marta Isay Saad
FBT

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3677 - Fax (11) 3031-8366 - e-mail: cepfcf@usp.br

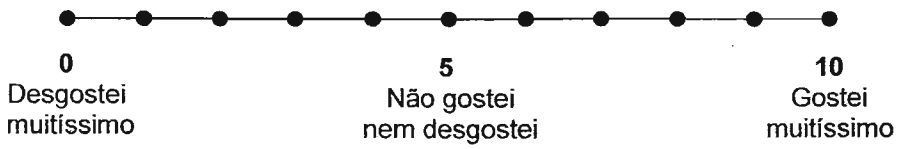
Anexo 2: Modelo da ficha de avaliação sensorial utilizada nas análises do presente trabalho.

Ficha para teste de aceitabilidade

Nome:_____ Data: __/__/____

Produto: musse de goiaba ___

Você está recebendo uma amostra de musse de goiaba.
Prove a amostra e marque com um **X** na escala abaixo o seu grau de aceitação geral em relação a esta amostra.
Utilize toda a escala, inclusive os espaços entre os pontos.



Cite o atributo que você **mais** gostou na amostra. Comente.
♥_____

Cite o atributo que você **menos** gostou na amostra. Comente.
⊗_____

Anexo 3: Informação nutricional da musse controle T1 (4% gordura láctea adicionada), segundo as normas da AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2003a,b; 2008).

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL Porção 120 g (1/2 xícara de chá)		
Quantidade por porção		% VD (*)
	kcal = kJ	
Valor energético	180 kcal = 755 kJ	9
Carboidratos	24 g	8
Proteínas	5,7 g	8
Gorduras totais	5,6 g	10
Gorduras saturadas	3,9 g	18
Gorduras trans	0 g	**
Fibra alimentar	7,5 g	30
Frutooligossacarídeos	7,2 g	240
Sódio	59 mg	2

* % Valores Diários com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas.

** Valores diários não estabelecidos

Anexo 4: Informação nutricional da musse T2 (4% inulina), segundo as normas da AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2003a,b; 2008).

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL Porção 120 g (1/2 xícara de chá)		
Quantidade por porção		% VD (*)
	kcal = kJ	
Valor energético	140 kcal = 588 kJ	7
Carboidratos	23 g	8
Proteínas	5,4 g	7
Gorduras totais	1,0 g	2
Gorduras saturadas	1 g	4
Gorduras trans	0 g	**
Fibra alimentar	12,3 g	49
Frutooligossacarídeos	7,2 g	240
Inulina	4,8 g	160
Sódio	68 mg	3

* % Valores Diários com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas.

** Valores diários não estabelecidos

Anexo 5: Informação nutricional da musse T3 (4% WPC), segundo as normas da AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2003a,b; 2008).

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL Porção 120 g (1/2 xícara de chá)		
Quantidade por porção		% VD (*)
	kcal = kJ	
Valor energético	157 kcal = 658 kJ	8
Carboidratos	23 g	8
Proteínas	9,6 g	13
Gorduras totais	1,7 g	3
Gorduras saturadas	1,3 g	6
Gorduras trans	0	**
Fibra alimentar	7,5 g	30
Frutooligossacarídeos	7,2 g	240
Sódio	82 mg	3

* % Valores Diários com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas.

** Valores diários não estabelecidos

Anexo 6: Informação nutricional da musse T4 (2% gordura láctea adicionada e 2% de inulina), segundo as normas da AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2003a,b; 2008).

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL Porção 120 g (1/2 xícara de chá)		
Quantidade por porção		% VD (*)
	kcal = kJ	
Valor energético	160 kcal = 668 kJ	8
Carboidratos	24 g	8
Proteínas	5,3 g	7
Gorduras totais	3 g	5
Gorduras saturadas	2,3 g	10
Gorduras trans	0	**
Fibra alimentar	9,9 g	40
Frutooligossacarídeos	7,2 g	240
Inulina	2,4 g	80
Sódio	63 mg	3

* % Valores Diários com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas.

** Valores diários não estabelecidos

Anexo 7: Informação nutricional da musse T5 (2% gordura láctea adicionada e 2% de WPC), segundo as normas da AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2003a,b; 2008).

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL Porção 120 g (1/2 xícara de chá)		
Quantidade por porção		% VD (*)
	kcal = kJ	
Valor energético	173 kcal = 724 kJ	9
Carboidratos	24 g	8
Proteínas	7,9 g	11
Gorduras totais	4 g	7
Gorduras saturadas	3 g	14
Gorduras trans	0	**
Fibra alimentar	7,5 g	30
Frutooligossacarídeos	7,2 g	240
Sódio	70 mg	9

* % Valores Diários com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas.

** Valores diários não estabelecidos

Anexo 8: Informação nutricional da musse T6 (2% inulina e 2% de WPC), segundo as normas da AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2003a,b; 2008).

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL Porção 120 g (1/2 xícara de chá)		
Quantidade por porção		% VD (*)
	kcal = kJ	
Valor energético	148 kcal = 620 kJ	7
Carboidratos	24 g	8
Proteínas	10 g	10
Gorduras totais	1 g	2
Gorduras saturadas	1 g	4
Gorduras trans	0 g	**
Fibra alimentar	9,9 g	40
Frutooligossacarídeos	7,2 g	240
Inulina	2,4 g	80
Sódio	75 mg	3

* % Valores Diários com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas.

** Valores diários não estabelecidos

Anexo 9: Informação nutricional da musse T7 (1,33% de gordura láctea adicionada, 1,33% de inulina e 1,33% de WPC), segundo as normas da AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2003a,b; 2008).

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL Porção 120 g (1/2 xícara de chá)		
Quantidade por porção		% VD (*)
	kcal = kJ	
Valor energético	157 kcal = 657 kJ	7
Carboidratos	25 g	8
Proteínas	6,8 g	9
Gorduras totais	1,8 g	3
Gorduras saturadas	1,3 g	6
Gorduras trans	0	**
Fibra alimentar	9,1 g	36
Frutooligossacarídeos	7,2 g	240
Inulina	1,6 g	53
Sódio	69 mg	3

* % Valores Diários com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas.

** Valores diários não estabelecidos

Anexo 10: Controle do pH durante os testes de sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* nas musses refrigeradas T1 a T7 submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7).

Dias de armazenamento	Tempo do teste	pH						
		Musses						
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	0-30 min	1,47±0,02	1,68±0,01	1,74±0,01	1,43±0,03	1,72±0,02	1,48±0,02	1,35±0,01
	30 min – 2h	1,43±0,02	1,69±0,01	1,74±0,01	1,43±0,02	1,64±0,03	1,43±0,03	1,42±0,01
	2h – 4h	4,68±0,04	5,02±0,03	5,28±0,05	5,11±0,05	5,42±0,09	5,06±0,04	4,85±0,04
	4h – 6h	6,90±0,03	7,18±0,01	7,23±0,02	7,34±0,02	7,48±0,03	6,92±0,01	6,98±0,01
7	0-30 min	1,81±0,01	1,74±0,01	1,65±0,01	1,49±0,03	1,66±0,01	1,46±0,00	1,80±0,00
	30 min – 2h	1,85±0,01	1,73±0,01	1,66±0,00	1,57±0,00	1,67±0,01	1,46±0,01	1,82±0,03
	2h – 4h	5,07±0,02	5,22±0,01	4,96±0,13	4,40±0,04	5,05±0,03	4,74±0,05	5,12±0,04
	4h – 6h	6,90±0,02	7,47±0,01	7,21±0,02	6,76±0,04	7,08±0,25	6,83±0,05	6,80±0,01
14	0-30 min	1,38±0,01	1,61±0,01	1,68±0,02	1,40±0,10	1,64±0,02	1,62±0,01	1,43±0,02
	30 min – 2h	1,41±0,00	1,60±0,00	1,67±0,02	1,44±0,18	1,65±0,03	1,61±0,02	1,43±0,01
	2h – 4h	4,73±0,02	4,98±0,06	5,08±0,03	4,92±0,34	5,16±0,02	4,51±0,02	4,67±0,04
	4h – 6h	6,93±0,02	7,26±0,01	7,10±0,02	6,97±0,25	7,15±0,01	6,84±0,00	6,80±0,03
21	0-30 min	1,41±0,00	1,39±0,02	1,74±0,01	1,52±0,01	1,78±0,01	1,53±0,01	1,65±0,02
	30 min – 2h	1,39±0,01	1,42±0,01	1,74±0,01	1,54±0,03	1,78±0,01	1,53±0,04	1,62±0,01
	2h – 4h	4,81±0,05	4,73±0,02	5,17±0,06	4,44±0,03	4,64±0,02	4,69±0,02	4,55±0,02
	4h – 6h	6,95±0,01	7,13±0,01	7,37±0,01	6,72±0,02	6,97±0,02	6,85±0,04	6,77±0,00
28	0-30 min	1,78±0,02	1,43±0,01	1,81±0,01	1,41±0,01	1,97±0,03	1,56±0,02	1,52±0,01
	30 min – 2h	1,77±0,01	1,35±0,01	1,84±0,01	1,42±0,01	1,98±0,01	1,57±0,01	1,53±0,02
	2h – 4h	4,97±0,03	4,79±0,06	5,24±0,02	4,35±0,05	5,18±0,04	4,96±0,53	4,60±0,01
	4h – 6h	6,91±0,00	7,17±0,02	7,18±0,02	6,74±0,03	7,18±0,01	6,85±0,01	6,82±0,02
Média	0-30 min	1,57±0,21	1,57±0,15	1,72±0,06	1,45±0,05	1,75±0,13	1,53±0,06	1,55±0,18
	30 min – 2h	1,57±0,22	1,56±0,17	1,73±0,07	1,48±0,07	1,74±0,14	1,52±0,07	1,56±0,16
	2h – 4h	4,85±0,16	4,95±0,20	5,15±0,13	4,64±0,35	5,09±0,26	4,79±0,22	4,76±0,23
	4h – 6h	6,92±0,02	7,24±0,14	7,22±0,10	6,91±0,26	7,17±0,19	6,86±0,04	6,83±0,08

Anexo 11: Controle do pH durante os testes de sobrevivência *Lactobacillus acidophilus* nas musses congeladas T1 a T7 submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, após 7, 35, 56, 84 e 112 dias de armazenamento (veja a tabela 1 para a descrição das musses T1 a T7).

Dias de armazenamento	Tempo do teste	pH						
		Musses						
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
7	0-30 min	1,89±0,01	1,74±0,00	1,70±0,01	1,43±0,02	1,73±0,03	1,56±0,04	1,45±0,02
	30 min – 2h	1,89±0,01	1,72±0,01	1,72±0,03	1,41±0,05	1,73±0,01	1,56±0,06	1,47±0,01
	2h – 4h	5,06±0,02	5,17±0,04	4,97±0,04	5,11±0,06	5,22±0,01	4,70±0,04	4,87±0,10
	4h – 6h	6,91±0,03	7,49±0,01	7,18±0,03	6,96±0,47	7,31±0,04	6,84±0,02	6,99±0,01
35	0-30 min	1,49±0,02	1,31±0,33	1,57±0,03	1,58±0,01	1,74±0,02	1,46±0,01	1,57±0,01
	30 min – 2h	1,48±0,00	1,32±0,01	1,58±0,01	1,57±0,01	1,70±0,00	1,47±0,00	1,57±0,01
	2h – 4h	4,57±0,10	4,87±0,03	4,90±0,05	4,43±0,03	4,99±0,05	4,57±0,10	4,58±0,02
	4h – 6h	6,67±0,01	6,88±0,01	7,01±0,02	6,75±0,02	7,19±0,04	6,72±0,01	6,91±0,01
56	0-30 min	1,53±0,01	1,38±0,02	1,60±0,02	1,85±0,03	1,68±0,01	1,72±0,01	1,55±0,01
	30 min – 2h	1,53±0,02	1,41±0,02	1,62±0,02	1,78±0,04	1,69±0,01	1,62±0,01	1,46±0,02
	2h – 4h	4,50±0,02	4,47±0,00	4,97±0,02	5,13±0,06	5,10±0,02	4,63±0,07	4,53±0,03
	4h – 6h	6,86±0,05	6,84±0,04	7,07±0,01	7,25±0,03	7,29±0,01	6,84±0,02	6,72±0,01
84	0-30 min	1,64±0,01	1,51±0,01	1,57±0,01	1,53±0,00	1,49±0,02	1,58±0,01	1,59±0,00
	30 min – 2h	1,62±0,01	1,48±0,01	1,59±0,00	1,54±0,00	1,47±0,02	1,56±0,05	1,60±0,04
	2h – 4h	4,53±0,02	4,52±0,09	4,90±0,03	4,62±0,06	4,71±0,02	4,52±0,02	4,51±0,07
	4h – 6h	6,75±0,10	6,80±0,01	7,06±0,01	7,09±0,02	6,87±0,01	6,77±0,01	6,74±0,02
112	0-30 min	1,54±0,01	1,55±0,01	1,78±0,03	1,43±0,02	1,38±0,00	1,60±0,01	1,65±0,01
	30 min – 2h	1,49±0,01	1,55±0,01	1,79±0,01	1,46±0,01	1,42±0,01	1,60±0,00	1,66±0,01
	2h – 4h	4,44±0,06	4,48±0,02	5,01±0,02	4,69±0,02	4,93±0,02	4,63±0,03	4,54±0,04
	4h – 6h	6,64±0,02	6,81±0,02	7,19±0,01	7,18±0,01	6,96±0,03	6,82±0,01	6,74±0,03
Média	0-30 min	1,62±0,16	1,50±0,17	1,64±0,09	1,56±0,17	1,60±0,16	1,58±0,09	1,56±0,07
	30 min – 2h	1,60±0,17	1,50±0,15	1,66±0,09	1,55±0,14	1,60±0,15	1,56±0,06	1,55±0,09
	2h – 4h	4,62±0,25	4,70±0,31	4,95±0,05	4,80±0,31	4,99±0,19	4,61±0,07	4,61±0,15
	4h – 6h	6,77±0,12	6,96±0,30	7,10±0,08	7,05±0,20	7,12±0,20	6,80±0,06	6,82±0,12

Anexo 12: Trabalho publicado na forma de *Short Communication* [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. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.39, p.315-317, 2007.].