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

Desenvolvimento de sorvete simbiótico de graviola (*Annona muricata* L.) com teor reduzido de gordura e avaliação da resistência gastrointestinal dos probióticos *in vitro.*

Graziela Leal Sousa

Tese para obtenção de grau de
Doutor

Orientadora:
Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad

São Paulo
2013

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

Desenvolvimento de sorvete simbiótico de graviola (*Annona muricata* L.) com teor reduzido de gordura e avaliação da resistência gastrointestinal dos probióticos *in vitro.*

Graziela Leal Sousa

Tese para obtenção de grau de
Doutor

Orientadora:
Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad

São Paulo
2013

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

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

Sousa, Graziela Leal
S725d Desenvolvimento de sorvete simbiótico de graviola *Annona muricata* L.) com teor reduzido de gordura e avaliação da resistência gastrointestinal dos probióticos *in vitro* / Graziela Leal Sousa. -- São Paulo, 2013.
138p.

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. Sorvete 3. Probióticos : Ciência dos alimentos I. T. II. Saad, Susana Marta Isay, orientador.

664 CDD

GRAZIELA LEAL SOUSA

Desenvolvimento de sorvete simbiótico de graviola (*Annona muricata* L.) com teor reduzido de gordura e avaliação da resistência gastrointestinal dos probióticos *in vitro.*

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

_____
Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad
orientador / presidente

_____
1º examinador

_____
2º examinador

_____
3º examinador

_____
4º examinador

São Paulo, _____de 2013.

A minha querida família pelo o amor e o carinho durante a minha jornada.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, João e Beth, à minha irmã Vanessa e em especial à minha irmã Patrícia pelo carinho e apoio, além da assessoria especial na revisão deste trabalho.

Ao meu querido Claudio pelo o amor e a compreensão em todas as horas.

Ao meu xodó Pitoco pela ternura e travessuras de todos os dias.

Aos queridos meus amigos, Claudinéia (Açaí), Marcelo (koike) pela força e momentos de alegria e descontração durante o meu Doutorado.

À Prof.ª Dra. Susana Marta Isay Saad, pela oportunidade de integrar ao grupo de pesquisa, pela paciência e pelos ensinamentos transmitidos na realização desta pesquisa.

À Universidade de São Paulo e ao departamento de Tecnologia Bioquímico Farmacêutica (FCF/USP) pelos ensinamentos transmitidos.

Aos técnicos Alexandre e Nilton pela atenção e ajuda nas análises que foram tão importantes no andamento do projeto de pesquisa.

À todos os colegas do Laboratório de Microbiologia, Natália, Clara, Martha, Mayra, Cristina, Marina, Felipe, Diogo, Gabriela e aos funcionários do Departamento de Tecnologa Bioquímica- Farmacêutica da FCF- USP, em especial à Ivani pelo convívio e principalmente, pelas pequenas e grandes judas no dia-a-dia que de uma forma ou de outra contribuíram para continuidade deste trabalho.

À Dra Raquel Bedani, pela contribuição dos seus conhecimentos e sempre prestativa em ajudar nas revisões dos trabalhos.

À dedicada aluna de iniciação científica Carol Costa, pela preciosa ajuda durante a parte iniciais dos experimentos.

À CAPES (Conselho Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior) pelo incentivo à pesquisa e bolsa concedida.

Às empresas Danisco, Clariant, Duas Rodas, Givaudan, CPKelco, Orafti pelas doações dos ingredientes utilizados neste trabalho.

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

Sou o que quero ser, porque possuo apenas uma vida e
nela só tenho uma chance de fazer o que quero.
Tenho felicidade o bastante para
fazê-la doce dificuldades para fazê-la forte,
Tristeza para fazê-la humana e esperança suficiente para fazê-la feliz.
As pessoas mais felizes não tem as melhores coisas,
elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos.

Clarice Lispector

RESUMO

SOUSA, G.L. **Desenvolvimento de sorvete simbiótico de graviola (*Annona muricata* L.) com teor reduzido de gordura e avaliação da resistência gastrointestinal dos probióticos *in vitro*.** 2013. 138p. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito da adição de inulina (I) e a substituição parcial da gordura do leite (G) pelo concentrado de proteína de soro de leite (WPC) sobre a sobrevivência dos probióticos *Lactobacillus acidophilus* NCFM e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 em sorvete de graviola com teor reduzido de gordura, ao longo do período de armazenamento e frente às condições encontradas no trato gastrointestinal (TGI) simuladas *in vitro*. Adicionalmente, avaliou-se a influência desses ingredientes (6% I; 1,5% WPC; 3% e 1,5% G) sobre as características tecnológicas e a aceitabilidade do sorvete funcional. Empregou-se um planejamento fatorial 2^2, para 4 formulações produzidas, em triplicata, totalizando 12 ensaios: F1- controle (- I, - WPC); F2 (+ I, - WPC); F3 (- I, + WPC) e F4 (+ I, + WPC). Todas as formulações foram armazenadas a -18±3ºC e avaliadas após 2, 28, 56, 84 e 112 dias de armazenamento. A determinação das características tecnológicas foi realizada com as análises de dureza instrumental (em analisador de textura TA-XT2), fração de derretimento, *overrun* (durante a elaboração do produto) e perfil lipídico. Para o teste de aceitabilidade do produto, utilizou-se uma escala hedônica estruturada de 9 pontos. Elevada viabilidade probiótica foi observada para todas as formulações, com médias de populações acima de 8,0 log UFC/g, não diferindo significativamente durante o armazenamento de 112 dias ($p>0,05$). *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 apresentou uma maior resistência em relação a *L. acidophilus* NCFM quando submetido aos sucos gastrointestinais artificiais, uma vez que a população de NCFM e de HN019 diminuíram, respectivamente, cerca de 5,2 log UFC/g e de 1,2 log UFC/g, durante o armazenamento. O efeito protetor do WPC e/ou I sobre a resistência de *L. acidophilus* aos sucos gastrointestinais artificiais foi observada no 56º dia e, para *B. animalis* subsp. *lactis* no 2º dia de armazenamento ($p<0,05$). Os sorvetes com WPC apresentaram menores valores de dureza, aos 7º e 112º dias de estocagem ($p<0,05$). A adição de inulina influenciou no aumento da dureza para F2 após 56 dias e para F4 durante todo período de armazenamento ($p<0,05$). Os resultados mostraram, também, que a presença do WPC e/ou inulina reduziu a velocidade de derretimento dos sorvetes durante todo o armazenamento ($p<0,05$). Elevados escores médios (entre 6,8 e 8,0) foram obtidos no teste de aceitabilidade sensorial dos sorvetes probióticos, indicando excelente aceitação pelos consumidores e não diferiram significativamente durante o armazenamento de até 84 dias. Já para F4, a adição do WPC + I aumentou a aceitação do produto após 56 dias ($p<0,05$). Os resultados obtidos sugerem que a utilização do WPC como substituto parcial da gordura láctea separadamente ou combinada com a inulina pode ser vantajosa no desenvolvimento de sorvete probiótico com baixo teor de gordura, uma vez que a presença desses ingredientes desempenhou um papel importante na proteção dos probióticos contra o efeito dos fluidos gastrointestinais nos testes *in vitro*. Além deste efeito protetor, a utilização da inulina e WPC também melhorou as características tecnológicas e sensoriais do sorvete funcional reduzido de gordura.

Palavras-chave: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, prebiótico, inulina, resistência *in vitro*, sorvete, graviola, concentrado proteico de soro.

ABSTRACT

SOUSA, G.L. **Development of low-fat symbiotic graviola (*Annona muricata* L.) ice-cream and evaluation of the probiotics gastrointestinal *in vitro* resistance.** 2013. 138p. Tese (PhD of Science) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

This study aimed to assess the effect of the addition of inulin (I) and the partial substitution of the milk fat (MF) by whey protein concentrate (WPC) on *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 viability incorporated in low fat *graviola* (*Annona muricata* L.) ice-cream and on probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions throughout 112 days of storage. Moreover, the influence of these ingredients (6% I; 1,5% WPC; 3% and 1,5% MF) on the functional ice-cream technological and sensorial features was also evaluated. Employing a 2^2 factorial design, four formulations were produced, in triplicates: F1- control (- I, - WPC); F2 (+ I, - WPC); F3 (- I, + WPC) and F4 (+ I, + WPC). The product were stored at -18±3ºC and analyzed after 2, 28, 56, 84, and 112 days of storage. Ice-creams from each trial were used for determination of *L. acidophilu*s and *B. animalis* subsp. *lactis* viability in the products and survival in ice-creams submitted to gastrointestinal simulated conditions during storage at -18±3ºC for up to 112 days. For the determination of technological features, instrumental hardness (in TA-XT2 Texture Analyser), melting rate, overrun (during production), and lipid profile were determined. For sensory acceptability evaluation, a 9 point hedonic scale was used. High probiotic viability was observed for all formulations, with mean populations above 8.0 cfu/g and which did not differ significantly throughout 112 days of storage ($p>0.05$). *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 resistance to the artificial gastrointestinal juices was higher than for *L. acidophilus* NCFM, since the NCFM and the HN019 populations decreased approximately 5.2 log cfu/g and 1.2 log cfu/g, respectively, throughout storage. The protective effect of WPC and/or WPC + I on the *L. acidophilus* resistance to artificial gastrointestinal juices was observed on the 56th day and for *B. animalis* subsp. *lactis* on the 2nd day of storage ($p<0.05$). The ice-creams with WPC presented lower hardness in the 7th and 112nd days of frozen storage ($p<0.05$). The addition of inulin led to an incresed hardnes for F2 after 56 days and for F4 during the whole storage ($p<0.05$). The results also showed that the presence of the WPC and/or inulin reduced the ice-creams melting rates during the whole storage ($p<0.05$). The high mean scores obtained (between 6.8 and 8.0) in the acceptability test indicated that the functional ice-creams evaluated were very well accepted, and did not differ significantly throughout storage of up to 84 days. Except for F4, the addition of the WPC + I improved the acceptability after 56th days of frozen storage ($p<0.05$). The results suggest that the use of WPC for the partial substitution of the milk fat separately or combined with inulin may be advantageous in the development of low-fat synbiotic ice-cream, since the presence of these ingredients played an important role in the probiotic protection against gastrointestinal juices in the *in vitro* simulated assays. Besides these protective effects, inulin and WPC also improved the technological and sensory features of the low-fat functional ice-cream.

Keywords: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, prebiotic, inulin, in vitro resistance, ice-cream, graviola, whey protein concentrate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1. Graviola (*Annona muricata* L.) 21

Figura 2. Consumo brasileiro de sorvetes entre os anos 2003 - 2012 (ABIS, 2013). 24

Figura 3. Ilustração da estrutura do sorvete..... 28

CAPÍTULO 2

Figura 1. Fluxograma com as principais etapas do processamento das formulações do sorvete de graviola..... 60

Figura 2. Sobrevivência das culturas frescas de *L. acidophilus* NCFM e *B. animalis* subsp. *Lactis* HN019 submetidas ao teste de resistência gastrointestinal - TGI simulado *in vitro*..... 72

Figura 3. (a, b, c, d, e). Sobrevivência de ***L. acidophilus* NCFM** nas formulações de sorvete (F1 a F4) durante o armazenamento -18±3ºC por até 112 dias..... 75

Figura 4. (a, b, c, d, e). Sobrevivência de ***B. animalis* subsp. *lactis*** HN019 nas formulações de sorvete (F1 a F4) durante o armazenamento de -18±3ºC por até 112 dias. 76

CAPÍTULO 3

Figura 1. Fluxograma com as principais etapas do processamento das formulações do sorvete de graviola..... 97

Figura 2. Valores de rendimento (% *overrun*) dos sorvetes durante a etapa batimento/congelamento parcial dos sorvetes..... 109

Figura 3. Tempo de derretimento (min) dos 10 primeiros mL dos sorvetes ao longo do armazenamento de 112 dias..... 111

Figura 4. (a, b, c e d) Distribuição das notas atribuídas para as formulações (F1 a F4) avaliadas respectivamente no 7º, 28º, 56º e 84º. dia de armazenamento a -18 ±3℃..... 119

Figura 5. Frequência de citações positiva (+) e negativa (-) atribuídas para as características de sabor, textura, aparência, sabor característico da fruta e doçura dos diferentes sorvetes funcionais de graviola (F1 a F4) 120

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Valor nutricional (g/100g) da polpa de fruta de graviola (*Annona muricata* L.)..... 22

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Delineamento experimental e proporções definidas para os constituintes das 4 formulações do sorvete funcional com baixo teor de gordura e as quantidades codificadas em ausência [-1] ou presença [+1] dos fatores (inulina e substituto parcial da gordura láctea - WPC) e os respectivos valores reais..... 57

Tabela 2. Ingredientes e respectivas proporções (%) e váriaveis estudadas na produção dos sorvetes (F1 a F4)..... 58

Tabela 3. Valores de pH (médias ± desvio padrão para n=3), durante a produção e o armazenamento dos sorvetes por até 112 dias a -18 ± 3°C..... 65

Tabela 4. Viabilidade (média ± desvio padrão para n=6) de *Lactobacillus acidophilus* NCFM e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 (log UFC/g) nas formulações de sorvete de graviola estudadas aos diferentes períodos (dias) de armazenamento -18±3ºC..... 68

Tabela 5. Taxa de sobrevivência (%) de *L. acidophilus* NCFM frente às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, incorporados às formulações de sorvete de graviola e reduzido de gordura (F1 a F4), durante o armazenamento de 112 dias a -18±3ºC..... 77

Tabela 6. Taxa de sobrevivência (%) de *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 frente às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, incorporados às formulações de sorvete de graviola e reduzido de gordura (F1 a F4), durante o armazenamento de 112 dias a -18±3ºC..... 77

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Delineamento experimental e proporções definidas para os constituintes das 4 formulações do sorvete funcional com baixo teor de gordura e as quantidades codificadas em ausência [-1] ou presença [+1] dos fatores (inulina e substituto parcial da gordura láctea - WPC) e os respectivos valores reais..... 93

Tabela 2. As proporções de ingredientes (%) e as váriaveis estudadas na produção dos sorvetes funcionais..... 94

Tabela 3. Composição centesimal (%) e valor energético total (VET) em g/100g (média ± desvio-padrão) dos sorvetes funcionais..... 104

Tabela 4. Composição em nutrientes e valor energético total (VET) obtido para as porções* de 60 g (média ± desvio-padrão) para cada formulação do sorvete funcional..... 105

Tabela 5. Composição qualitativa de ácidos graxos presentes em 100 g de amostra (média ± desvio-padrão) 106

Tabela 6. Composição qualitativa de ácidos graxos (média), agrupados segundo o grau de insaturação, em relação ao total de ácidos graxos presentes nas diferentes formulações do sorvete funcional..... 108

Tabela 7. Velocidade de derretimento (mL/ min) dos sorvetes durante os períodos de armazenamento (dias) a -18±3º C. (media ± desvio-padrão) 112

Tabela 8. Valores de dureza instrumental (kgf) obtidos para as diferentes formulações do sorvete funcional (média ± desvio-padrão), durante os períodos de armazenamento (dias) a -18±3º C..... 114

Tabela 9. Aceitabilidade sensorial (média ± desvio-padrão) obtida para as formulações do sorvete funcional com polpa de fruta de graviola, durante os períodos de armazenamento (dias) a -18±3º C..... 117

LISTA DE QUADROS

CAPITULO 1

Quadro 1. Aplicações e limitações dos ingredientes utilizados para formulação do 'mix' do sorvete..... 25

Quadro 2. Diferentes tipos de sorvetes..... 29

LISTA DE ABREVIATURAS

AACC- AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTIS

ABIS - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDUSTRIAIS E DO SETOR DE SORVETES

ADA – AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE

BSA - ALBUMINA DO SORO BOVINO

FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION

FOS - FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

FOSHU – FOOD FOR SPECIFIED HEALTH USES

GOS - GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS

GRAS - ENSAIOS CLÍNICOS

GSH - CONVERSÃO INTRACELULAR DE GLUTATIONA

MS – MINISTÉRIO DA SAÚDE

SCFAs- ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA

SNGL - SÓLIDOS NÃO GORDUROSOS DO LEITE

TGI – TRATO GASTROINTESTINAL

UFC – UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS

WPC – CONCENTRADO PROTÉICO DE SORO DO LEITE

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO..... 01

CAPÍTULO 1. Revisão Bibliográfica

1. Alimentos funcionais..... 04

2. Microbiota intestinal 06

2.1 *Lactobacillus acidophilus* NCFM..... 09

2.2 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019..... 12

3. Definição e características de fibras alimentares e prebióticos..... 13

4. Alimentos probióticos, prebiótico e simbióticos..... 16

5. Concentrado protéico de soro de leite (WPC)..... 18

6. Polpa de fruta de graviola (*Annona muricata L.*) 20

7. Sorvete - Definição e características tecnológicas..... 24

8. Sorvetes como carreadores de culturas probióticas e ingredientes prebióticos..... 31

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 33

CAPÍTULO 2. Sobrevivência das cepas probióticas incorporadas em sorvete de graviola com baixo teor de gordura, no produto durante o armazenamento e quando submetidas as condições gastrointestinais simuladas *in vitro.*

RESUMO..... 52

ABSTRACT..... 53

1. INTRODUÇÃO..... 54

2. MATERIAL E MÉTODOS..... 56

2.1 Planejamento experimental..... 56

2.2 Elaboração dos sorvetes..... 59

2.2.1 Preparo do Inóculo..... 59

2.2.2 Produção dos sorvetes 59

2.3 Período de amostragem..... 61

2.4 Determinação de pH e da viabilidade probiótica 61

2.5 Sobrevivência das culturas probióticas submetidas às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*..... 62

2.5.1 Preparação das culturas probióticas frescas..... 62

2.5.2 Determinação da resistência dos probióticos durante a passagem pelo trato gastrointestinal simulado *in vitro*..... 63

2.6 Análise estatística..... 64

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... 65

3.1 Valores de pH e viabilidade probiótica..... 65

3.2 Sobrevivência de *L. acidophilus* NCFM e *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*..... 69

4. CONCLUSÕES..... 80

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 81

CAPÍTULO 3. Características físico-químicas e aceitação sensorial dos sorvetes probióticos e simbióticos de baixo teor de gordura e adicionados de polpa de fruta de graviola *(Annoma muricata* L*).*

RESUMO..... 88

ABSTRACT..... 89

1. INTRODUÇÃO..... 90

2. MATERIAL E MÉTODOS..... 92

2.1 Planejamento experimental..... 92

2.2 Elaboração dos sorvetes 95

2.2.1 Preparo do Inóculo..... 95

2.2.2 Produção dos sorvetes..... 95

2.3 Período de armazenamento..... 97

2.4 Avaliação das características físico-químicas dos sorvetes..... 97

2.4.1 Determinação da composição centesimal e cálculo do valor energético total (VET)..... 97

2.4.2 Composição dos ácidos graxos..... 98

2.4.3 Incorporação de ar (*overrun*)..... 99

2.4.4 Fração de derretimento..... 100
2.4.5 Determinação da dureza instrumental..... 100
2.5 Segurança microbiológica sanitária dos sorvetes..... 101
2.6 Análise sensorial..... 101
2.7 Análise Estatística..... 103

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... 104

3.1 Características físico-químicas..... 104
3.1.1 Composição centesimal (%) e valor energético dos sorvetes..... 105
3.1.2 Composição em ácidos graxos..... 106
3.1.3 Valores de rendimento dos sorvetes (*overrun*)..... 109
3.1.4 Fração de derretimento dos sorvetes 111
3.1.5 Comportamento do parâmetro de dureza instrumental dos sorvetes..... 113

4. Parâmetros microbiológicos sanitários..... 116

5. Aceitação sensorial dos sorvetes..... 116

6. CONCLUSÕES..... 121

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 122

ANEXO I- Controle do pH (média ± desvio padrão) durante os testes de sobrevivência às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, após 2, 28, 56, 84 e 112 dias de armazenamento a -18±3º C..... 129

ANEXO II- Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP..... 130

ANEXO III- Termo de consentimento Livre e Esclarecido..... 133

ANEXO IV- Modelo da ficha de avaliação sensorial utilizada no presente trabalho.... 135

ANEXO V - Ficha do aluno..... 136

ANEXO VI- Curriculum lattes..... 138

APRESENTAÇÃO

O desenvolvimento de novos produtos funcionais tem sido cada vez mais desafiante, no sentido de atender, simultaneamente, a expectativa do consumidor em relação à promoção da saúde, acessibilidade, praticidade e apreciação sensorial do produto. Nesse sentido, na categoria de alimentos nutritivos e promotores da saúde destacam-se os lácteos com propriedades simbióticas, incluindo o sorvete como uma matrix alimentícia inovadora para aplicação de culturas probióticas e de ingredientes prebióticos. No caso específico do sorvete, esse produto tem sido relatado em diversos trabalhos como um alimento em potencial para o uso como veículo de culturas probióticas, com a vantagem de ser apreciado pela maioria da população (CRUZ et al., 2009). No entanto, o sorvete tradicional é um produto bastante calórico que apresenta altas concentrações de gordura láctea e sacarose, o que torna um alimento não muito atrativo para uma dieta com restrição de calorais.

Diante do interesse dos atuais consumidores por produtos mais saudáveis e sem excesso de gorduras ou açúcares, o que contribui para a diminuição dos riscos de doenças crônico-degenerativas, tem-se incentivado o desenvolvimento de alimentos probióticos com baixo teor de gordura contendo inulina e / ou concentrado protéico de soro do leite (WPC), uma vez que ambos os ingredientes podem ser empregados como substitutos de gordura (AKALIN et al., 2007; FRANCK, 2008).

Assim, os sorvetes com baixo teor de gordura e que apresentam probióticos e ingredientes prebióticos do tipo inulina, tendem a ser mais atraente do que sorvetes tradicionais, devido aos seus efeitos potencialmente benéficos para a saúde dos consumidores.

O presente trabalho será apresentado em três capítulos, conforme a descrição a seguir.

Capítulo 1 – "**Revisão de Literatura**". Apresentará o embasamento bibliográfico abordando os principais temas envolvidos no trabalho.

Capítulo 2- "**Sobrevivência das cepas probióticas em sorvete de graviola (*Annona muricata* L.) com teor reduzido de gordura durante o armazenamento e quando submetidas às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*".** Esta seção terá como objetivo apresentar o efeito da substituição parcial da gordura do leite por WPC e adição ou não do prebiótico do tipo inulina sobre a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* NCFM e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 no sorvete *light* com polpa de fruta de graviola (*Annona muricata L.*) e a sobrevivência dos probióticos ao trato gastrointestinal (TGI) simulado *in vitro* ao longo do armazenamento do produto.

Capítulo 3 - **"Características físico-químicas e aceitação sensorial dos sorvetes probióticos e simbióticos de baixo teor de gordura e adicionados de polpa de fruta de graviola *(Annoma muricata* L*)."***
Pretende avaliar o efeito da substituição parcial da gordura do leite por WPC e adição ou não do prebiótico do tipo inulina sobre as características tecnológicas, nutricionais e sensoriais de cada formulação do sorvete simbiótico adicionado de polpa de fruta de graviola (*Annona muricata L*) e submetido ao armazenamento a -18±3ºC por até 112 dias.

CAPÍTULO 1

Revisão de Literatura

Revisão de literatura

1. Alimentos funcionais

Nas últimas décadas, as exigências dos consumidores em relação à qualidade dos alimentos mudaram consideravelmente. Cada vez mais há uma conscientização de que uma alimentação equilibrada e saudável está diretamente relacionada à saúde do indivíduo, contribuindo, não apenas para o seu bem estar, mas também para o risco mínimo de desenvolvimento de doenças ao longo da vida.

Os primeiros estudos científicos que comprovaram a ligação entre alimentação e saúde surgiram nos anos 1960, apontando para os impactos negativos do excesso de gordura e açúcar. Na década de 1980, os produtos *diet* e *light* começaram a ser comercializados com sucesso. Recentemente, vem-se exigindo ainda mais dos alimentos, pois além de não fazerem mal à saúde, eles devem ainda desempenhar funções terapêuticas (RAUD, 2008).

As mudanças do estilo de vida e o aumento da expectativa de vida da população, aliados ao crescimento dos custos médico-hospitalares, têm estimulado a procura por novos conhecimentos científicos e novas tecnologias para o desenvolvimento de alimentos que atendam a essas necessidades (SAAD; BEDANI, 2013). Diante disso, hoje os alimentos não se destinam apenas em satisfazer a vontade de alimentar-se e em fornecer os nutrientes necessários para os seres humanos, mas também para a prevenção de doenças relacionadas com a nutrição e que resulte em melhorias do bem-estar físico e mental do indivíduo (PÉREZ-ALVAREZ, 2008; SANZ; SALVADOR; FISZMAN, 2008).

O conceito de alimento funcional foi promovido pela primeira vez em 1984, por cientistas japoneses que estudaram as relações entre nutrição, satisfação sensorial, fortificação e a modulação dos sistemas fisiológicos. Em 1991, o Ministério da Saúde – MS - introduziu um selo de aprovação para essa

categoria de Alimentos para Uso Específico à Saúde conhecida como FOSHU (*Food for Specified Health Uses*) (BURDOCK; CARABIN; GRIFFITHS, 2006; MENRAD, 2003; ROBERFROID, 2000). O termo foi rapidamente adotado mundialmente (HASLER, 2002). No entanto, as alegações ou *claims*, bem como os critérios para a sua aprovação, podem variar conforme a regulamentação de cada país ou de cada bloco econômico (STRINGHETA et al., 2007).

Segundo a definição de alimentos funcionais, os mesmos devem permanecer em sua forma original, ou seja, alimentos, e devem demonstrar efeitos benéficos à saúde em quantidades normalmente ingeridas na dieta (ALZAMORA et al., 2005). Já o termo nutracêutico não deve ser confundido com o termo alimento funcional, pois os nutracêuticos possuem compostos bioativos, independentemente da existência de uma matriz alimentar e são apresentados ao consumidor geralmente na forma de pílulas, ampolas ou cápsulas (JONES, 2002).

De acordo com a **Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação**, o mercado mundial de alimentos funcionais deve crescer em 38% até ano de 2017, com faturamento estimado para US$ 207 bilhões. Já no Brasil, o crescimento do poder de consumo dos brasileiros nos últimos anos, aliados à preocupação em viver mais e melhor, vem consolidando um cenário promissor para o mercado de alimento funcional, estimado em US$ 4 bilhões ao ano no país (ABIA, 2012).

De acordo com Annunziata e Vecchio (2011, 2013), as atuais preocupações com saúde, a familiaridade com o conceito de alimento funcional, a natureza do veículo do ingrediente funcional, bem como os possiveis efeitos sobre a saúde influenciam consideravelmente a procura desses alimentos pelo consumidor. No entanto, o desenvolvimento e o comércio dos produtos funcionais ainda são bastante complexos, pois, além do produto atender à alegação funcional, é indispensável que ele apresente características sensoriais satisfatórias para o consumidor, além da praticidade e acessibilidade.

Nesse sentido, diferentes estudos têm mostrado que a aceitação de alimentos funcionais pelo consumidor está longe de ser incondicional. Como principais condições para a aceitação do novo produto pelo consumidor são

considerados os atributos de sabor, o preço, a conveniência e a confiabilidade das alegações de saúde (SIRÓ et al., 2008). De forma geral, os consumidores parecem avaliar primeiro alimentos funcionais como alimentos. Em outras palavras, os benefícios funcionais podem fornecer um valor adicional para consumidores, mas não podem prevalecer sobre as propriedades sensoriais dos alimentos (SIRÓ et al., 2008).

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 serem seguros para o consumo sem a supervisão médica (ANVISA, 1999a, 1999b, 1999c, 2008). Também é obrigatório mencionar nas rotulagens que os benefícios à saúde esperados pelo consumo regular dos alimentos funcionais devem estar associados a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis (ANVISA, 2008).

A compra de alimentos funcionais possibilita aos consumidores uma impressão moderna e positiva de si mesmos, pois o seu hábito de consumo torna-se uma maneira moderna de seguir uma alimentação e um estilo de vida mais saudável. De uma forma geral, é uma atitude positiva, tanto para os consumidores como para o mercado de alimentos funcionais, apresentando uma tendência sustentável em múltiplos nichos de mercado (SIRÓ et al., 2008).

2. Microbiota intestinal

A microbiota intestinal é constituída por uma variedade de bactérias aeróbias e anaeróbias que interagem entre si em um ecossistema complexo e dinâmico capaz de influenciar nos fatores microbiológicos, imunológicos e bioquímicos no hospedeiro (MONREAL; PEREIRA; LOPES, 2005). Ela apresenta um número considerável de microrganismos, em torno de 400-500 diferentes espécies bacterianas, incluindo principalmente as bactérias anaeróbias, destacando-se, em ordem decrescente: bacteróides, bifidobactérias, lactobacilos, entre outros microrganismos (TRINDADE, 2004). As bactérias autóctones desempenham três grandes funções importantes no

local que colonizam: antibacteriana, imunomoduladora e metabólico/ nutricional (ISOLAURI; SALMINEN; OUWEHAND, 2004; RAMOS, 2006).

A primeira função da microbiota, chamada de “exclusão competitiva” ou efeito de barreira microbiológica, pode ser definida como a capacidade de impedir ou reduzir a multiplicação de microrganismos exógenos que ocasionalmente penetram no ecossistema digestivo (RAMOS, 2006). Essa proteção envolve mecanismos como a competição por nutrientes essenciais, competição por sítios de adesão no epitélio intestinal e a produção de substâncias ou metabólitos antagonistas tais como: os peptídeos antibacterianos, os ácidos orgânicos e outros compostos, como o peróxido de hidrogênio, que também faz parte do mecanismo de exclusão competitiva (LIEVIN-LE MOAL; SERVIN, 2006; ROUZAUD, 2007; O’FLAHERTY; KLAENHAMMER, 2010).

A imunomodulação é outra função importante nas infecções, já que permite resposta das defesas imunológicas locais e sistêmicas do hospedeiro a uma tentativa de agressão por microrganismos patogênicos. Ao aderir na mucosa intestinal com a formação de microcolônias, as bactérias autóctones são reconhecidas por um sistema sofisticado que consegue detectar antígenos bacterianos, permitindo ao hospedeiro distinguir, dentre a sua microbiota, as bactérias residentes e as indesejáveis, como, por exemplo, os agentes patogênicos (TURRONI et al., 2008).

As bactérias intestinais, ao se ligarem aos receptores localizados na superfície das células epiteliais, desencadeiam uma cascata de mecanismos de defesa imunológica, incluindo a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (SAAD; BEDANI, 2013).

A terceira função da microbiota é a sua contribuição nutricional. A microbiota intestinal possui muitas capacidades metabólicas, que faltam no hospedeiro e, assim, pode ser considerada como sendo indispensável para a vida dos seres humanos (SAVAGE, 2001). Ela contribui para nutrição do hospedeiro, melhorando o aproveitamento de energia da dieta, como a síntese de vitaminas essenciais, por exemplo, as vitaminas do complexo B. No caso das bacterias láticas, as enzimas que são liberadas no lúmen intestinal podem exercer efeitos sobre a digestão, aliviando sintomas de deficiência na absorção de nutrientes (SAAD; BEDANI, 2013), como a liberação de β-galactosidase

endógena durante o metabolismo da lactose pela microbiota, favorecendo a digestão para os indivíduos intolerantes à lactose (RABOT et al., 2010).

No entanto, o estresse, a dieta desbalanceada, os tratamentos com antibióticos, as infecções, as intoxicações alimentares e o avanço da idade são considerados fatores que podem interferir no equilíbrio gastrintestinal e imunológico e desencadear algumas doenças inflamatórias crônicas para o hospedeiro (NAGALINGAM; LYNCH, 2012). Assim, a microbiota intestinal em equilíbrio, por sua vez, pode ser caracterizada pelo predomínio de bactérias benéficas ou promotoras da saúde sobre bactérias potencialmente patogênicas (ZIEMER; GIBSON, 1998; NICOLI et al., 2003; CUMMINGS et al., 2004).

A partir do conhecimento da microbiota intestinal e suas interações com o hospedeiro, é possível o desenvolvimento de estratégias alimentares objetivando a manutenção e o estímulo das bactérias normais presentes na mucosa intestinal (GIBSON; FULLER, 2000). Desta forma, a correção das propriedades da microbiota autóctone desbalanceada pode ser realizada por microrganismos probióticos (ISOLAURI; SALMINEN; OUWEHAND, 2004; SLOVER; DANZIGER, 2008).

Por definição, os probióticos são definidos como "microrganismos vivos que, quando administrados em concentrações adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro" (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION - FAO/WHO, 2006).

Os microrganismos probióticos são considerados potencialmente bem sucedidos, quando apresentam várias propriedades desejadas e são capazes de exercer efeitos benéficos. Os critérios de seleção considerados relevantes para qualquer microrganismo com potencial probiótico prevêem que o mesmo seja de origem humana, se for para uso em humanos (especificidade da estirpe); que apresentem estabilidade com relação à acidez gástrica e à bile; que sejam seguros para uso em alimentos e em ensaios clínicos (GRAS); que apresentem efeitos benéficos na saúde, documentados cientificamente e clinicamente validados; e que possuam propriedades tecnológicas desejáveis (SALMINEN et al., 1998).

Tem sido destacado que a ingestão dessas bactérias probióticas pode aumentar a resistência a infecções por microrganismos patogênicos, podendo

inclusive contribuir na prevenção de alguns tipos de cancer (PARK et al., 1999; VINDEROLA; MEDICI; PERDIGON, 2004; RINNE et al., 2005; ISOLAURI; SALMINEN, 2005). Esse efeito pode estar relacionado à capacidade dos microrganismos probióticos interagirem com as placas de Peyer e as células epiteliais intestinais, estimulando as células B produtoras de IgA e a migração de células T do intestino (PERDIGÓN; HOLGADO, 2000; PERDIGON; FULLER; RAYA, 2001; FORSYTHE; BIENENSTOCK, 2010). Além disso, os probióticos podem favorecer a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos, sugerindo uma ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imunológico (CROSS, 2002).

No entanto, é importante salientar que o potencial probiótico de uma determinada espécie pode diferir de uma cepa para a outra. Diferentes cepas de uma mesma espécie são incomparáveis e podem possuir áreas de aderência distintas, efeitos imunológicos específicos e diferentes mecanismos de ação sobre a mucosa saudável ou inflamada (ISOLAURI; SALMINEN; OUWEHAND, 2004).

Atualmente, os microrganismos probióticos reconhecidos e utilizados na tecnologia de produtos lácteos pertecem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (SANDERS; MARCO, 2010).

Nesses dois gêneros encontramos uma variedade de cepas com atuação probiótica, entre elas, *Lactobacillus acidophilus* (NCFM) e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (HN019), também conhecido como DR10™. Ambas as cepas são comercializadas pela empresa Danisco (Redhill, Reino Unido).

2.1 *Lactobacillus acidophilus NCFM*

O gênero *Lactobacillus* compreende um vasto grupo de bactérias gram-positivas, na forma de bastonetes ou cocobacilos, não formadoras de esporos, desprovidas de citocromos, anaeróbicos facultativos, mas aerotolerantes, ácido-tolerantes e catalase-negativas, com algumas exceções (AXELSSON,

2004; BURITI; SAAD, 2007; VASILJEVIC; SHAH, 2008; WELLS; SAULNIER; GIBSON, 2008).

As cepas de *L. acidophilus* são homofermentativas, tendo grande aplicação biotecnológica na produção de alimentos lácteos probióticos, uma vez que esses microrganimos possuem as características necessárias para sobreviver às condições ambientais adversas (SAMEERA; GANESH; PRASAD, 2013). De acordo com Tomas et al. (2002) e Arsene-Ploetze (2006), *Lactobacillus* se multiplicam melhor em temperaturas de 30-37 °C e na presença de uma fonte de carbono inorgânico. A acidez também é outro fator importante que deve ser mantida em um intervalo de pH de 4,5-6,5 para uma ótima multiplicação (CAI, 1999).

Dentro do gênero *Lactobacillus*, encontramos diferentes espécies com atuação probiótica, inclusive *Lactobacilus acidophilus* NCFM, que é uma bacteria homofermentativa tipicamente do hospedeiro humano. Na literatura, existem diferentes linhagens de *L. acidophilus* NCFM ® entre elas, NCFM, NCK56, NCK45, N2, RL8KR, RL8KS e RL8K, apresentando padrões idênticos de fragmentos de DNA cromossômico (SANDERS; KLAENHAMMER, 2001).

A cepa de *Lactobacillus acidophilus* NCFM foi isolada pela primeira vez a partir de uma amostra fecal humana no início de 1970, no laboratório de pesquisa "North Carolina Food Microbiology" da Universidade do Estado Carolina do Norte, na qual recebeu a denominação de NCFM (SANDERS; KLAENHAMMER, 2001). Essa cepa probiótica era, até recentemente (atualmente a empresa foi adquirida pela DuPont), comercializada pela empresa Danisco (Danisco Cultures Division, Paris) e também a única linhagem desta espécie para a qual o genoma foi sequenciado, documentado e publicado (ALTERMANN et al., 2005).

A cepa probiótica *Lactobacillus acidophilus* NCFM é bem conhecida quanto à sua funcionalidade em manter e restaurar o bem-estar gastrointestinal (OUWEHAND; LAHTINEN, 2009). Vários trabalhos investigaram os mecanismos importantes desses microrganismos associados à produção de bacteriocina, ao metabolismo de diferentes tipos carboidratos (BARRANGOU et al., 2003), à tolerância às tensões fisiológicas do sistema gastrointestinal (ALTERMANN et al., 2005; AZCARATE-PERIL et al., 2004; DANIEL et al., 2006), inclusive a capacidade de adesão às celulas epiteliais e modulação do

sistema imunológico (GOH; KLAENHAMMER, 2010; O'FLAHERTY; KLAENHAMMER, 2010; WEISS; JESPERSEN, 2010).

Os efeitos da cepa *L. acidophilus* NCFM sobre a modulação da microbiota intestinal foi investigado pelos pesquisadores Björklund et al. (2011). Durante o ensaio clínico, 51 vonluntários idosos foram distribuídos aleatoriamente para consumirem suplemento (*L. acidophilus* NCFM combinado ao lactitol) ou placebo, durante um período de 2 semanas. A suplementação simbiótica resultou no aumento de populações de bifidobactérias e lactobacilos endógenos, inclusive de *L. acidophilus* NCFM. Também foi observada uma redução das populações de bactérias do grupo *Blautia coccoides* e *Clostridium* nas fezes dos voluntários avaliados que consumiram o suplemento.

Diante desses resultados, observa-se que a combinação simbiótica de *L. acidophilus* NCFM e prebiótico, quando adicionada a uma dieta habitual, pode contribuir beneficamente ao equilíbrio da microbiota intestinal de pessoas idosas. Esse fato torna interessante o seu consumo, em especial durante o envelhecimento. Nesta fase, as funções do corpo humano passam por diversas transformações, incluindo a redução do metabolismo e do sistema de defesa (DELAROSA et al., 2006), resultando, consequentemente, no maior tempo de trânsito gastrointestinal e na alteração da composição da microbiota (CLAESON et al., 2011; MÄKIVUOKKO et al., 2010; MUELLER et al., 2006; WOODMANSEY, 2007). Com isso, há uma maior incidência para o desenvolvimento de infecções bacterianas (BARTOSCH; MACFARLANE; MCMURDO, 2004).

Em muitos trabalhos *in vitro*, *in vivo* e clinícos com humanos, como os dos pesquisadores Mohamadzadeh et al. (2011), Weiss e Jespersen (2010), Schmidt et al. (2009) e Konstantinov et al. (2008), foi observado que a cepa probiótica *L. acidophilus* NCFM pode melhorar o sistema de defesa do organismo, através da promoção e ativação das respostas imunes importantes para a proteção contra infecções.

A cepa *L. acidophilus* NCFM apresenta boa estabilidade probiótica ao longo do armazenamento, sendo empregada em diferentes matrizes alimentícias, na suplementação de iogurtes (TRAHAN, 2008) bebidas lácteas fermentadas (AZCARATE-PERIL; TALLON; KLAENHAMMER, 2009), bebidas à base de soja (DING; SHAH, 2010) e queijos (IBRAHIM et al., 2010;

LAHTINEN et al., 2012). No entanto, a aplicação de *L. acidophilus* NCFM no desenvolvimento de produtos funcionais ainda carece de mais estudos com objetivo de avaliar, também, o comportamento inserido em novas matrizes alimentícias, como no caso dos sorvetes.

2.2 *Bifidobacterium animalis* subsp*. lactis* HN019

As espécies pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* são bactérias Gram-positivas que se apresentam na forma de bastão de vários tamanhos, como células individuais ou formando cadeias de diferentes tamanhos, com formas bifurcadas em Y ou V. Não formam esporos, não apresentam motilidade e são anaeróbicos restritos, embora algumas espécies sejam tolerantes ao O_2 na presença de CO_2. A temperatura ótima de multiplicação dessas bactérias está na faixa de 37 a 41°C, podendo se multiplicar entre 25 e 45°C.

Dentro desse gênero, encontramos a cepa probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019, originada de produtos lácteos (GOPAL et al., 2001) e comercializada como DR10™ pelas empresas Fonterra, Nova Zelândia e como *Bifido* HOWARU pela Dupont Danisco, EUA.

Essa cepa é considerada segura e bem aceita em vários estudos em humanos (DEKKER et al., 2009; SAZAWALL et al., 2004, 2010; GOPAL; PRASAD; GILL, 2003; GOPAL et al., 2005; WALLER et al., 2011) e o seu consumo pode aumentar o nível de bifidobactérias e lactobacilos residentes e reduzir a contagem de enterobactérias em adultos (AHMED et al., 2007).

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* HN019 é um probiótico com traços relevantes para o uso em humanos direcionados para a atividade gastrintestinal, com excelente capacidade de resistência ao pH baixo e aos ácidos biliares em testes *in vitro* (PRASAD et al.,1999).

Há muitos mecanismos pelas quais a cepa *B lactis* HN019 exerce seus efeitos benéficos ao sistema imune do hospedeiro. Um deles é a modulação da microbiota intestinal, exercida pela a capacidade do probiótico *B lactis* HN019 em aderir e interagir com as células epitélias do intestino (GOPAL et al., 2001).

Em um estudo com objetivo de avaliar a atividade pró e anti-inflamatória de *B lactis* HN019, as células probióticas foram capazes de inibir a adesão de

enteropatogênos, como a *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) e de modular respostas inflamatórias induzidas. Os resultados mostraram que a cepa probiótica HN019 pode ser utilizada como agente de prevenção ou como coadjuvante no tratamento de doenças inflamatórias gastrointestinais (LIU et al., 2010).

Em um estudo utilizando um ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado por placebo, os pesquisadores Sazawal et al. (2010) observaram que a intervenção dietética simbiótica com o probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 e o prebiótico galacto-oligossacarídeos (GOS) resultou na redução significativa da incidência e da prevalência de doenças em crianças avaliadas com idade entre 1 e 4 anos, incluindo a infecção intestinal, doenças que ocasionam febre e infecções respiratórias agudas, além da redução de risco de anemia e deficiência de ferro após a suplementação contínua por 1 ano.

Em outro estudo clínico randomizado com 100 voluntários adultos, com idade média de 44 anos e 64% do sexo feminino, mostrou-se que a dosagem alta da cepa probiótica (17,2 x10^9 ufc) durante 14 dias reduziu significamente oito dos nove sintomas relacionados aos distúrbios gastrointestinais. Já a dosagem baixa da cepa probiótica (8,2 x 10^6 ufc) e o placebo reduziram em sete e em dois dos sintomas avaliados, respectivamente. Diante dos resultados obtidos, observa-se que o consumo da cepa *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 pode ser potencialmente vantajoso em contribuir na diminuição dos sinais e sintomas das doenças gastrointestinais (WALLER et al., 2011).

3. Definição e características de fibras alimentares e prebióticos

As fibras alimentares compreendem uma ampla categoria de carboidratos resistentes à digestão e à absorção no intestino humano, com a fermentação completa ou parcial no intestino grosso, promovendo efeitos fisiológicos complexos, incluindo efeito laxativo e/ou redução dos níveis séricos de colesterol e/ou glicose (AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTIS - AACC, 2001; MELLO; LAAKSONEN, 2009). Normalmente são definidas como parte não digerível do alimento vegetal, tais como: a celulose,

hemicelulose, ligninas, gomas, celuloses modificadas, mucilagens, oligossacarídeos, pectinas**,** frutanos (inulina e oligômeros de frutose) e substâncias associadas às plantas, como ceras, cutina e suberina (AACC, 2001).

As fibras alimentares podem ser classificadas como solúveis, insolúveis ou mistas, podendo ser fermentáveis ou não fermentáveis, sendo que a extensão da fermentação depende de sua estrutura física e química. As fibras solúveis, normalmente são fermentadas rapidamente, enquanto que as insolúveis são lentamente ou apenas parcialmente fermentadas por bactérias anaeróbicas do cólon intestinal (SAAD; BEDANI, 2013).

Vários ingredientes alimentares têm sido propostos como potenciais prebióticos, sendo que os frutanos inulina e oligofrutose são considerados como prebióticos modelos (ROBERFROID, 2008). Devido à sua estrutura química, os prebióticos não são absorvidos no intestino delgado, mas são fermentados e usados como fonte de energia por bactérias endógenas no cólon, preferencialmente pelas bifidobácterias, favorecendo o seu crescimento e sua atividade metabólica (NAZZARO et al., 2012). Dessa forma, os prebióticos não promovem a multiplicação de potenciais patógenos, como os clostrídios produtores de toxinas, os bacteróides proteolíticos e a *Escherichia coli* toxigênica, por exemplo (HAMILTON-MILLER, 2004; MANNING; GIBSON, 2004).

A especificidade das bifidobactérias em utilizar os frutanos, provavelmente, deve-se à produção de inulinase intracelular, enzima necessária para hidrolisar ligações glicosídicas do tipo β b-(2,1) entre as unidades de frutose (ROBERFROID et al., 1999).

Como produto final da fermentação das fibras prebióticas, são obtidos alguns substratos, como o ácido lático e os ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), os quais podem desempenhar várias funções biológicas benéficas ao hospedeiro (NAZZARO et al., 2012). O aumento dos níveis de ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) durante a fermentação e a redução do pH na região luminal aumenta a solubilidade dos sais de cálcio e de magnésio e, com isso, há uma melhora na absorção desses minerais pelo hospedeiro (SCHULZ; AMELSVOORQ; BEATEN, 1993; LOPEZ et al., 1998, MEYER; STASSE-WOLTHUIS, 2006; LAVANDA et al., 2011). Outro efeito

benéfico dos ácidos graxos de cadeia curta, no caso do butirato, é a prevenção do câncer de cólon, pois o butirato é utilizado de maneira eficiente pelas células da mucosa intestinal para a sua manutenção (POMPEI et al., 2008; THAMMARUTWASIK et al., 2009).

Oligofrutose e fruto-oligossacarídeos (FOS) são termos sinônimos, utilizados para denominar frutanos do tipo inulina com grau de polimerização inferior a 10. O termo oligofrutose é o mais frequentemente empregado na literatura para descrever inulinas de cadeia curta, obtidas por hidrólise parcial da inulina da chicória. Já o termo FOS descreve a mistura de frutanos do tipo inulina de cadeia curta, sintetizados a partir da sacarose (CARABIN; FLAMM, 1999; BIEDRZYCKA; BIELECKA, 2004; SAAD, 2006).

Quimicamente, os frutanos do tipo inulina são cadeias lineares de carboidratos, consistindo principalmente de ligações β - (2 → 1)-frutosil-frutose, podendo conter uma molécula inicial de α -D-glicose. Os frutanos do tipo inulina contêm glicose, frutose, sacarose e pequenos oligossacarídeos e, em função da sua configuração β do C2 anomérico em seus monômeros de frutose, resiste à hidrólise pelas enzimas intestinais digestivas de humanos, as quais são específicas para ligações α -glicosídicas (ROBERFROID, 2005).

Até o momento, a raiz da chicória nativa, pertencente a família *Compositae* tem sido a principal fonte de extração industrial de frutanos do tipo inulina. Vários trabalhos têm documentado a planta *Agave tequilana* Weber var. *azul* como fonte de frutanos altamente ramificados com estruturas complexas que combinam as moléculas de frutose com as ligações β (2-1) e β(2-6) com grau de polimerização (DP) variando de 3 a 29 (LOPEZ; MANCILLA-MARGALLI; MENDOZA-DIAZ, 2003; AVILA- FERNANDEZ et al., 2008). Desta forma, a inulina derivada da agave apresenta resistência à hidrólise por enzimas digestivas humanas, sendo fermentada pela microbiota intestinal, com a produção de ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), López; Mancilla-Margalli; Mendoza-Diaz, (2003) e com potencial efeito prebiótico, uma vez que estimula a multiplicação de bifidobactérias e lactobacilos (GOMES et al. 2010).

Constituída de cadeias longas, a inulina é menos solúvel que a oligofrutose e, quando dispersa na água ou no leite, forma microcristais que interagem para dar origem a uma textura cremosa. Consequentemente, é empregada como substituta de gordura em produtos lácteos, patês, molhos,

recheios, coberturas, produtos de panificação e sobremesas congeladas (SAAD; BEDANI, 2013,). Quando utilizada de forma compartilhada com cepas probióticas, pode estimular a multiplicação e a estabilidade desses microrganismos no produto funcional, durante a sua vida de prateleira (AKALIN et al., 2007). Pode, inclusive, manter a viabilidade em alimentos congelados, por apresentar efeito crioprotetor, com a redução do tamanho dos cristais de gelo ao interagir com a água disponível no alimento (FRANCK, 2008).

4. Alimentos probióticos, prebióticos e simbióticos

Os microrganismos probióticos e os ingredientes prebióticos são incorporados em uma variedade de formulações, sendo que seu uso é mais comum em iogurtes e leite fermentados (GRANATO, 2010).

Existem diversas publicações que citam os queijos, musses, sorvetes e os alimentos à base de soja como matrizes alimentícias bem sucedidas para o emprego de probióticos e/ou prebióticos (SAAD; CRUZ; FARIA, 2011) No entanto, o desenvolvimento de novas formulações probióticas é, ainda, bastante complexa, pois envolve a compreensão das condições ambientais e tecnológicas adversas que pode influenciar na funcionalidade da cepa probiótica no produto, no qual foi inserida e após o seu consumo (KLAYRAUNG; VIERNSTEIN; OKONOGI, 2009).

Para garantir a funcionalidade do produto funcional deve-se avaliar alguns fatores importantes envolvidos na estabilidade da cepa probiótica durante o armazenamento, tais como: características do microrganismo, composição das matérias-primas, influência dos aditivos alimentares, como também as condições de fabricação e armazenamento do produto (KLAYRAUNG; VIERNSTEIN; OKONOGI, 2009).

No Brasil, a alegação funcional permitida para alimentos probióticos e prebióticos é restrita à contribuição para o equilíbrio da microbiota intestinal. Para que o alimento seja considerado probiótico, ele deve apresentar, na sua porção diária, de 10^8 a 10^9 UFC de microrganismos viáveis. Quanto aos alimentos prebióticos, a recomendação diária mínima de FOS e de inulina é de 3 g para alimentos sólidos e de 1,5 g para alimentos líquidos (ANVISA, 2008).

Os probióticos e prebióticos, quando incorporados simultaneamente em um alimento, exercem uma interação simbiótica, que favorece a sobrevivência da bactéria probiótica no alimento, bem como nas condições entéricas e gastrintestinais.

Essa 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, G.; STEED; MACFARLANE, S., 2008). Dessa forma, a identificação de um prebiótico que tenha efeitos sinérgicos com um probiótico é, portanto, de elevado interesse comercial para a indústria de alimentos (SU; HENRIKSSON; MITCHELL, 2007).

Alguns exemplos de alimentos simbióticos podem ser vistos nos seguintes trabalhos: o queijo *petit-suisse* adicionado de inulina, oligofrutose, mel e dos microrganismos *L. acidophilus* e *B. animalis* subsp. *lactis* (CARDARELLI et al., 2008); o queijo fresco cremoso adicionado de inulina e *L. paracasei* em co-cultura com *S. thermophilus* (BURITI et al., 2007); as musses de maracujá e goiaba adicionadas de inulina e *L. acidophilus* (BURITI; KOMATSU; SAAD, 2007); as musses simbióticas de goiaba contendo *Lactobacillus acidophilus* La-5 e oligofrutose e formuladas com substituto da gordura láctea, concentrado protéico de soro e inulina (BURITI; CASTRO; SAAD, 2010 a,b); a mousse de chocolate adicionada de inulina e *L. paracasei* (ARAGON-ALEGRO et al., 2007) e o leite enriquecido com o probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (DR10 ™) e prebiótico galacto oligossacarídeos (SAZAWAL et al., 2004).

5. Concentrado protéico de soro de leite (WPC)

O leite contém dois principais grupos de proteínas, ou seja, as caseínas e as proteínas de soro de leite, as quais diferem quanto às suas propriedades físicas e biológicas e somam 6% do total de proteínas do leite. Do total de proteínas presentes no leite, aproximadamente 80% é constituída de caseínas e o restante pelas proteínas do soro, que permanece solúvel após a precipitação das caseínas em pH 4,6 e a 20ºC e que se constituem em uma fonte importante de peptídeos bioativos (DUNKER; ALVARENGA; MORIEL, 2008; SMITHERS, 2008; MADUREIRA et al., 2007).

A composição do soro de leite fresco liberada do coágulo durante a fabricação de queijo possui cerca de 94,25% de água e 5,75% de sólidos, que incluem a lactose em maior proporção e, em seguida, pelos minerais, as gorduras e as proteínas, que representam aproximadamente apenas 13% dos sólidos totais (OLIVEIRA, 2009). As proteínas do soro do leite são constituídas por frações protéicas, em média, 50% de β-lactoglobulina, 25% de α-lactoalbumina e 25% de frações menores que incluem a albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas e lactoferrina (RODRIGUES; TEXEIRA, 2009; LIVDEY, 2010). Essas frações, no entanto, podem variar em tamanho, peso molecular e função (ANTUNES, 2003; SGARBIERI, 2005; LIVDEY, 2010).

Do ponto de vista nutricional, as proteínas do soro são 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).

Essas proteínas de alto valor biológico 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 inatas da mucosa intestinal (RUTHERFURD-MARKWICK et al., 2005; PÉREZ-CANO et al., 2007).

Além disso, as proteínas de soro de leite são ricas em enxofre, contendo aminoácidos como cisteína e metionina. Com uma elevada concentração desses aminoácidos, a função imunológica é melhorada, através da conversão intracelular de glutationa – GSH (MARSHALL, 2004; RODRIGUES; TEXEIRA,

2010), que é um potente antioxidante intracelular, naturalmente encontrado em todas as células de mamíferos (WALZEM; DILLARD; GERMAN, 2002).

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 proteínas, ou como “isolados” quando o teor protéico for superior a 90%. No entanto, esses concentrados protéicos podem apresentar variação na sua composição, conforme o processamento empregado (SURH; WARD; McCLEMENTS, 2006; MADUREIRA et al., 2007).

Os concentrados de proteínas de soro de leite têm sido amplamente utilizados no desenvolvimento de produtos lácteos. Essas proteínas possuem propriedades tecnológicas que podem ser utilizadas na melhoria nutricional dos produtos ou para aplicações específicas em textura de alimentos (como a gelificação, emulsificação, viscosidade, adesão e aeração) (EMAM-DJOME et al., 2008; DANIEL, 2009; HUPPERTZ; PATEL, 2012). Dessa forma, os WPCs são empregados como substitutos de gordura e, por apresentarem alta capacidade de retenção de água, promovem a manutenção da umidade durante o armazenamento de produtos com teor lipídico reduzido (LOBATO-CALLEROS et al., 2007).

Simplesse® é um produto comercial utilizado como substituto de gordura de base protéica, que é formulado a partir das proteínas concentradas do soro de leite ou das proteínas do ovo, sendo obtido por um processo que envolve alto fracionamento e aquecimento (DANIEL, 2009). O Simplesse® apresenta-se na forma de micropartículas esféricas e proporciona ao consumidor do alimento a sensação bucal de cremosidade equiparada à da gordura. Devido as suas características hidrofílicas e hidrofóbicas, possui propriedades emulsificantes e, por se ligar à água, forma géis coloidais, reduzindo a velocidade de derretimento e a sinérese em produtos congelados, incluindo sorvetes, além de fornecer menos calorias do que a gordura (1 a 4 kcal/g) (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION – ADA, 2005; DEIS, 2011).

Em alimentos contendo culturas probióticas, os concentrados proteicos de soro de leite (WPCs) contribuem para a manutenção da viabilidade desses microrganismos. Esse fato é atribuído às proteínas e fosfatos presentes, que aumentam a capacidade tamponante do alimento (ANTUNES; CAZETTO; BOLINI, 2005). Além disso, os WPCs apresentam efeito protetor semelhante na

resistência contra as mudanças de pHs e as enzimas secretadas durante a passagem através do TGI, permitindo que as bactérias probióticas cheguem ao intestino em uma concentração mais elevada de células viáveis (KOS et al., 2000, AKALIN et al., 2007).

Conforme pode ser observado no trabalho de Buriti, Castro e Saad (2010a), a adição do substituto de gordura de base protéica (WPC) melhorou a viabilidade *Lactobacillus acidophilus* La-5 nas musses refrigeradas, que apresentaram populações de La-5 entre 7,7 e 6,2 log UFC/g. A adição do WPC também resultou em efeito protetor para a cepa La-5 quando submetida às condições gastrintestinais simuladas *in vitro,* na substituição parcial da gordura láctea por 2 a 3% pelo concentrado proteico WPC.

6. A polpa de fruta graviola (*Annona muricata* L.)

A Resolução RDC nº 272 de 2005 (ANVISA, 2005a) define a polpa de fruta como o produto obtido por esmagamento das partes comestíveis de frutas carnosas por processos tecnológicos adequados. O consumo de frutas tropicais vem aumentando ano após ano, devido ao seu valor nutritivo e aos seus efeitos terapêuticos. A utilização da polpa de frutas congeladas está em expansão nas indústrias de produtos lácteos, de sorvetes, doces, entre outros, o que aumenta o interesse dos produtores e dos consumidores (KUSKOSKI et al., 2006). Dentre as frutas tropicais, encontram-se as Anonáceas, com mais de 600 espécies, destacando-se a graviola (*Annona muricata* L.), pinha, ata ou fruta-do-conde (*Annona squamosa*), cherimólia (*Annona cherimola*) e atemóia (híbrido entre cherimólia e pinha) (SÃO-JOSÉ et al., 2000).

Como a maioria das frutas tropicais, a graviola tem um excelente potencial para exportação e pode competir no mercado internacional, tanto como polpa congelada, suco ou como misturas com outros sucos (JARAMILLO-FLORES; HERNANDEZ-SANCHEZ, 2000; FRANCO & JANZANTTI, 2005).

A gravioleira é cultivada na Venezuela, em Porto Rico, na Costa Rica e no Brasil, principalmente na região nordeste, sendo seus frutos utilizados na fabricação de suco, sorvetes, compotas, geléias e doces (SACRAMENTO, et

al., 2003). É uma importante fonte de renda para muitos agricultores que a cultivam para mercados de produtos frescos (OKIGBO; OBIRE, 2009). Apresenta fruto composto de até 5 kg de peso, com a superfície verde com auréolas bem marcadas e espinhosas, amadurecendo de setembro a janeiro (**Figura 1**). A fruta de graviola possui polpa branca suculenta e fibrosa, contendo sabor levemente ácido e bem aromático (LIMA; ALVES; FILGUEIRES, 2006). É uma boa fonte de vitaminas do complexo B (TEIXEIRA; NEVES; PENA, 2006).

Figura 1- Graviola (*Annona muricata* L.)
fonte: http://www.brasilescola.com/frutas/graviola.htm

O sabor único da graviola contém 114 compostos voláteis responsáveis por todo perfil aromático, incluindo 44 ésteres, 25 terpenos, 10 álcoois e aldeídos, entre outros compostos (FRANCO; JANZANTTI , 2005).

A parte comestível da polpa de fruta de graviola corresponde a 67,5% do peso total fruta, sendo uma boa fonte de proteínas, fibras, carboidratos, minerais e vitaminas, conforme apresentado na **Tabela 1**. Os açúcares mais importantes são a frutose (1,8%), glicose (2,3%) e a sacarose (6,6%) (Garcia Soto, 2008).

Tabela 1- Valor nutricional (g/100g) da polpa de fruta de graviola (*Annona muricata* L.)

Componentes	**Valor**
Água (g)	78 - 82
Carboidratos (g)	9,8-15,8
Fibras (g)	1,2-1,9
Protéinas (g)	0,4 – 0,6
Lipidios totais (g)	0,1
Açúcares totais (g)	11,5 - 17,9
Açúcares redutores (g)	6,8 - 15,1
Pectinas (g)	0,4 - 0,9
Amido (g)	4,2 - 6,6
Cinzas (g)	0,6
Potássio (mg)	278
Fósforo (mg)	40
Magnésio (mg)	10
Cálcio (mg)	6
Zinco (mg)	0,10
Vitamina C (mg)	22
Vitamina B5 (mg)	12,5
Vitamina B3 (mg)	0,9
Vitamina B1 (mg)	0,7
Vitamina B2 (mg)	0,7
Vitamina B6 (mg)	0,06

Fonte: RAMÍREZ; LOPEZ; GUTÍRREZ, 1998; TACO, 2011; USDA, 2013.

A graviola pertence à classe de frutas tropicais com potencial mercadológico para serem utilizadas, inclusive em bebidas lácteas. Ocorre que, além de ser uma boa fonte natural de antioxidantes (Baskar, Rajeswari & Kumar, 2007), essa fruta contém carboidratos, proteínas, ácido fólico, cálcio, fósforo, ferro, vitamina C, B1 e B2 e fibras (DEMBITSKY et al., 2011).

Neste sentido, a incorporação de polpa de fruta de graviola em alimentos lácteos fermentados pode melhorar a aceitação destes produtos pelos consumidores. Em um estudo, com objetivo de avaliar a qualidade

química e sensorial de iogurtes produzidos com *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus*, a adição de 10% e 15% de néctar de graviola melhorou a qualidade dos atributos sensoriais, principalmente quanto ao sabor e o aroma. Adicionalmente, esses iogurtes apresentaram as maiores intenções de compra, além contribuirem nutricionalmente como fonte de zinco, fósforo e cálcio (LUTCHMEDIAL et al., 2004).

Em estudo realizado por Matos (2009), a utilização de polpa de fruta de graviola no desenvolvimento de bebida láctea com o reaproveitamento do soro de queijo, mostrou ser bastante vantajoso. Essas formulações com 25% de polpa da fruta de graviola apresentaram boa aceitabilidade pelos provadores e foram consideradas mais nutritivas que as bebidas lácteas fermentadas e os leites fermentados sem adição de frutas, em função de sua composição nutricional, (considerável teor de carboidratos, proteínas e minerais).

Do ponto de vista fitoquímico, as plantas da família Annonaceae têm sido intensivamente investigadas devido aos seus vários alcalóides presentes em diferentes partes da planta (caule, raiz, folhas, semente e, em menor concentração, na polpa) (GAJALAKSHMI, VIJAYALAHSMI, DEVI RALESWARI, 2012). As acetogeninas annonáceas são os principais compostos com ampla atividade biológica antitumoral, antifúngica e antiviral (WU et al., 2007; SOLÍS-FUENTES, 2010). Adicionalmente, os taninos e os flavonóides presentes em maior concentração no extrato aquoso da *Annona muricata* possuem atividades antidiabética e hipolipidêmica, consequente à sua ação antioxidante e protetora sobre as células - β pancreáticas, transformando e melhorando o metabolismo da glicose (FLORENCE et al. 2014).

7. Sorvete - Definição e características tecnológicas

No Brasil, a legislação vigente classifica os sorvetes como “gelados comestíveis”, que são alimentos congelados obtidos a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas ou de uma mistura de água e açúcar(es), podendo ser adicionados de outro(s) ingrediente(s), desde que não descaracterizem o produto (ANVISA, 2005b).

De acordo com as informações de mercado da EUROMONITOR INTERNACIONAL (2013), a produção mundial de sorvete no ano de 2010 ultrapassou 16,3 bilhões de litros, sendo que 31% da produção mundial estava localizada na Ásia Pacifica, 29% na América do Norte, 20% na Europa Ocidental, 7% na Europa Oriental e 6% na América Latina.

Em relação ao consumo total de sorvetes, os brasileiros consumiram 1209 milhões de litros em 2012, com um aumento de 79,49% entre 2003 e 2012, conforme os dados da Associação Brasileira das Industriais e do Setor de Sorvetes - ABIS (2013), como podem ser visto na **Figura 2**.

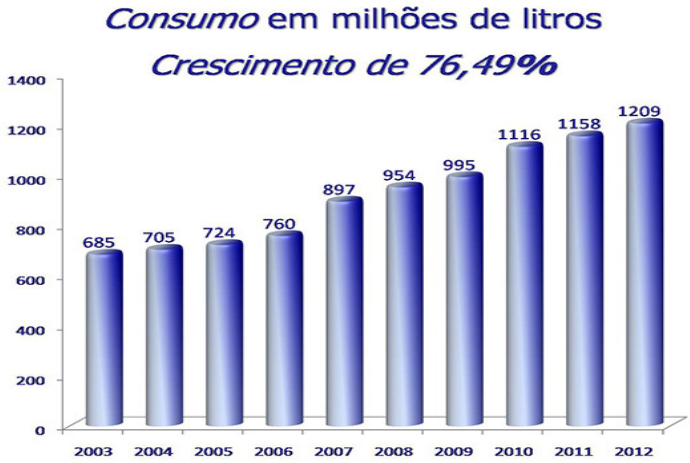


Figura 2. Consumo brasileiro de sorvetes entre os anos 2003 e 2012 (ABIS, 2013).

A composição química do sorvete determina vários parâmetros estruturais e sensoriais importantes para obtenção de um produto final de qualidade, como firmeza, resistência ao derretimento, textura, entre outras características (GRANGER et al., 2005). Desta forma, a seleção dos ingredientes utilizados na composição do 'mix' do sorvete são de extrema importância para definição das características do produto (SOLER; VEIGA, 2001; ALVAREZ; WOLTERS; VODOVOTZ, 2005; GOFF & HARTEL, 2006, 2013).

De acordo com Goff e Hartell (2013), a formulação básica do sorvete apresenta a relação de ingredientes descritos no **Quadro 1**. Na mesma tabela

também é possível encontrar as aplicações e limitações de uso desses ingredientes na composição da mistura do sorvete.

Quadro 1. Aplicações e limitações dos ingredientes utilizados para formulação do 'mix' do sorvete.

Ingredientes	Aplicações	Limitações
Gordura Láctea	Lubrifica a boca e melhora o *flavor*	Custo relativamente mais alto Alto teor calórico
Sólidos não gordurosos do leite (SNGL)/ concentrado de proteínas (WPC)	As proteínas promovem corpo e textura do sorvete através da emulsificação e retenção de água. Promovem desenvolvimento do *overrun* (rendimento do sorvete)	Em alta concentração pode ocorrer *off-flavor* durante a pasteurização. Potencial para arenosidade (cristalização da lactose)
Açúcar (sacarose)	Promove a doçura do produto Baixa o ponto de congelamento	Excesso prejudica o *flavor*. Menor temperatura necessária para congelamento e potencial para a recristalização.
Frutose (xarope de milho)	Menor custo que o açúcar Melhora corpo e a textura	Excesso promove uma textura borrachuda e *off-flavor*.
Estabilizantes	Estabilidade da textura durante a vida de prateleira	Excesso pode promover viscosidade excessiva Alta resistência para o derretimento do produto.
Emulsificantes	Promove a cremosidade do produto. Permite a coalescência parcial dos glóbulos de gordura. Melhora a distribuição das bolhas de ar na matriz do sorvete,	Excesso de viscosidade
Flavorizante ou aromatizante	Melhora aceitabilidade	Elevada intensidade do *flavor* prejudica o sabor e aroma

Adaptado de Goff e Hartell (2013) e Cruz et al. (2011).

A formulação do sorvete apresenta uma elevada concentração de sólidos não gordurosos do leite (SNGL), que varia entre 34 - 36% de proteína do leite, fornecendo um teor de proteína em torno de 2,5 - 4%. Essas proteínas são de excelente valor biológico, contendo todos os aminoácidos essenciais. As proteínas presentes no SNGL possuem alta capacidade de retenção de água, proporcionando o aumento da viscosidade na fase do soro, a cremosidade e a textura macia e compacta dos sorvetes (GOFF; HARTEL,

2013). Em altas concentrações prejudicam a viscosidade e favorecem a cristalização da lactose, promovendo uma textura arenosa ao sorvete.

A gordura favorece o *flavour*, lubrifica a boca e contribui com as propriedades desejáveis para a textura do sorvete (GOFF; HARTEL, 2013). A gordura desempenha várias funções no sorvete: ajuda a estabilizar a espuma, que é responsável, em grande parte, pela textura cremosa do produto, além de diminuir a velocidade de derretimento do sorvete necessário para carrear as moléculas aromáticas lipossolúveis (CLARKE, 2004). Entretanto, as limitações à utilização excessiva de gordura em uma mistura incluem o custo, o *overrun* prejudicado e a diminuição do consumo, devido alto valor calórico (GOFF; HARTEL, 2013).

A sacarose tem como principal função conferir sabor doce, sendo utilizada como padrão de referência do potencial de doçura de outros adoçantes. Ela contribui com o teor de sólidos na fase contínua (soro) do sorvete e regula a formação de cristais de gelo no sorvete por meio da redução do ponto de congelamento do produto (SOLER; VEIGA, 2001; GOFF; HARTEL, 2006).

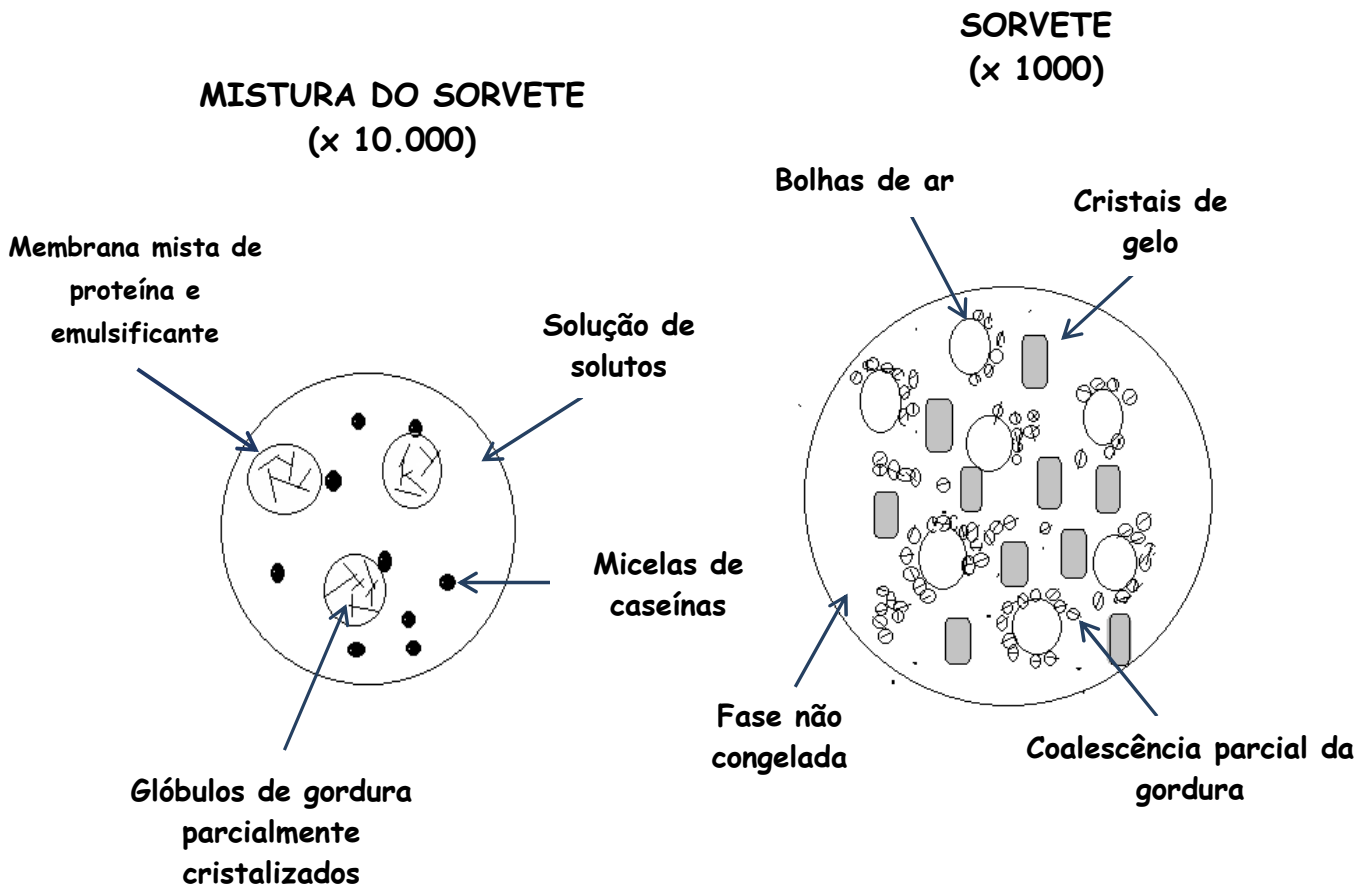
Os estabilizantes são os polissacarídeos que, durante o processamento do sorvete, ajudam na estabilidade da emulsão, prevenindo a liquefação da gordura e mantendo em suspensão os aromatizantes líquidos. No caso específico da goma carragena, esta evita a separação da fase soro, devido à excelente compatibilidade desse polissacarídeo com as proteínas do leite, que durante a estocagem do produto final, evitam o crescimento dos cristais de lactose e retardam a recristalização (crescimento de grandes cristais de gelo que ocorrem especialmente em condições de flutuação de temperatura) (GOFF, 2005). Entretanto, se os estabilizantes forem usados em concentrações elevadas, podem causar alterações indesejáveis, como viscosidade excessiva, o que terá reflexo negativo em atributos intrínsecos de qualidade, como a velocidade de derretimento (**Quadro 1**).

Estabilizantes são utilizados devido a suas propriedades hidrofílicas, que ao reter a água, evitam a formação de cristais grandes que ocorrem principalmente nas flutuação de temperatura e, assim, modificam a viscosidade da mistura. O mecanismo consiste em reduzir a água livre do sistema, ligando-se à água e, consequentemente, imobilizando-a dentro de uma estrutura de

gel. Os estabilizantes melhoram, também, as condições para a formação das microborbulhas de ar durante o *overrun*, conferindo rigidez à estrutura da interface ar-mistura (SANTOS, 2008).

Os emulsificantes são compostos de natureza hidrofílica-hidrofóbica que auxiliam no desenvolvimento da estrutura dos glóbulos de gordura e na distribuição das bolhas de ar na matriz do sorvete, promovendo uma textura suave e adequado ao derretimento, (CRUZ el at., 2011). Durante a homogeinização da mistura do sorvete, a adição do emulsificante reduz a tensão interfacial entre a gordura e a água substituindo as proteínas que estão adsorvidas nos glóbulos de gordura. Desta forma, possibilita a formação de uma membrana de menor espessura, mais resistente a coalescência e melhor estabilização das bolhas de ar oriundas do batimento (GOFF, 2005).

A estrutura complexa dos sorvetes é constituída pelos seguintes componentes: cristais de gelo, bolhas de ar, micelas de gordura e a fase do soro (parte não congelada), nas quais estão dissolvidos os açúcares, sais, proteínas e os estabilizantes (GOFF; HARTEL, 2013), conforme o esquema na **Figura 3**.



Adaptação de Goff e Hartel (2013).

Figura 3- **Ilustração da estrutura do sorvete** contendo cristais de gelo, bolhas de ar e glóbulos de gordura parcialmente coalescidas como fases distintas dentro do soro não congelado contendo materiais dissolvidos tais como: açúcares, sais, dispersões de proteínas do leite, estabilizantes, etc. A superfície dos glóbulos de gordura demonstra a competição das micelas de caseínas adsorvidas, com as proteínas do leite (globulares e parcialmente desnaturadas), como a β-caseína e os emulsificantes. Absorção dos aglomerados glóbulos de gordura parcialmente coalescidos na superfície das bolhas de ar, envolvidas também pelas proteínas e os emulsificantes.

A formulação ou a composição da mistura do sorvete está diretamente relacionada com a o processamento do sorvete começa com a mistura dos ingredientes secos e líquidos, descritos anteriormente no **Quadro 2**. Durante o processamento da calda, a mistura é homogeneizada com a formação de uma emulsão e a distribuição do tamanho dos glóbulos de gordura com a adsorção das proteínas. Posteriormente, após a pausterização, a calda é resfriada e mantida ao processo de maturação por um intervalo de até 24 hs à temperatura entre 0 e 4ºC. Nessa etapa, começa a cristalização da gordura e a completa hidratação de ingredientes secos, como proteínas e estabilizantes (ANDRESEN; NIELSEN, 1998; MARSHALL; ARBUCKLE, 2000). Após a etapa

de maturação, a mistura é submetida ao processo de cristalização com agitação, que se refere ao congelamento parcial do produto simultânea à incoporação de ar. Nesta etapa, a mistura líquida é transformada num produto viscoso com estrutura semi-sólida, constituída de multifaces (GOFF, 2002; GOFF; HARTEL, 2013).

Conforme pode ser visto no **Quadro 2**, o sorvete tradicional apresenta elevada concentração de gordura do leite, mínimo de 10%, o que o torna um produto bastante calórico. Por isso, não é muito apreciado pelos consumidores que necessitam de uma alimentação com restrição de calorias, principalmente com menos gorduras. Na tentativa de atrair este público, o mercado tem introduzido alimentos "*light*" ou baixo teor de gorduras, com a substituição parcial ou total das gorduras por ingredientes alternativos, como as proteínas e/ou carboidratos. Assim, atualmente encontramos diferentes tipos de sorvetes que podem ser classificados conforme a composição final e apresentação deste ao consumidor.

Quadro 2. Diferentes tipos de sorvetes.

Produto	Definição
Sorvete convencional	Constituído de ingredientes lácteos com, no mínimo, 10% de gordura do leite.
Sorvete com teor reduzido de gorduras	Mínimo de 25% de redução do teor de gordura ou 33% de redução calórica, comparado ao produto referência.
Sorvete *light*	Mínimo de 50% de redução de teor de gordura ou 33% de redução calórica, comparado ao produto referência.
Sorvete de baixo teor de gordura	Máximo de 3g de gorduras totais por porção.
Sorvete sem adição de gordura	Máximo de 0,5% de gorduras por porção.

Adaptado de Cruz et al. (2011)

Muitos compostos podem ser utilizados para substituir a gordura por produtos de baixas calorias, sem afetar a sua aceitação ao consumidor. Basicamente, os substitutos de gorduras (*fat replacers*) podem ser divididos em duas classes: substitutos de gorduras (*fat substitutes*) e miméticos de gordura (*fat mimetics*) (ROLLER; JONES, 1996; HORT; COOK, 2007).

"Fat substitutes" são ingredientes similares quanto às propriedades físicas e químicas de gorduras e óleos convencionais, podendo substituí-los completamente na mesma quantidade (1:1). Esses substitutos de gordura são compostos sintetizados quimicamente ou derivados de gorduras e óleos convencionais por modificação enzimática. Apresentam baixa digestibilidade e fornecem zero ou baixíssimas calorias (HORT; COOK, 2007; ADA, 2005).

"Fat mimetics" são ingredientes que podem ser distintamente diferentes sob o ponto de vista de estrutura química das gorduras, utilizados para substituir uma ou mais funções físicas e sensoriais da gordura no alimento. Esses compostos normalmente são os derivados de proteínas, como *Simpless ®*, *Dairy-Lo®* ou de carboidratos, como as gomas (pectina, xantana, carragena), celulose, inulina, entre outros (ARANCIBIA; COSTELL; BAYARRI, 2011; HORT; COOK, 2007).

A inulina é um exemplo de "*fat mimetic*", utilizado para imitar as propriedades funcionais e sensoriais de gordura, além de melhorar a qualidade nutricional dos produtos com teor calórico reduzido. Quando aplicado como substituto de gordura, fornece um paladar semelhante à gordura e textura semelhante aos produtos convencionais (GUVE et al., 2005). As suas propriedades miméticas têm sido atribuídas à sua capacidade de se ligar a água e formar uma rede de gel e, com isso, melhorando a cremosidade de alguns alimentos (FRANCK, 2002, 2008; AKALIN; ERISIR, 2008).

Os "fats mimetics" de base proteica, como WPCs, favorecem a solubilidade, a viscosidade, emulsificação e aeração em sorvetes (EMAM-DJOME et al., 2008). O *Simpless* é um produto comercial derivado do soro do leite, que se apresenta em forma de micropartículas com boa dispersão em água. O *Simpless®* combinado com inulina em sorvetes com baixo teor de gordura e sem adição de gordura foi estudado por Aykan, Sezgin e Guzel-Seydim (2008). Esses pesquisadores observaram melhoria da textura e menor velocidade de derretimento em relação à formulação controle com 4,7% de gordura láctea. No entanto, foi observada uma correlação negativa entre a quantidade de sólidos totais na mistura de sorvete e o *overrun* (%).

8. Sorvetes como carreadores de culturas probióticas e ingredientes prebióticos.

O sorvete é o produto muito apreciado por diferentes grupos de consumidores, incluindo adultos, crianças e idosos (MOHAMMADI, et al., 2011; CRUZ et al., 2009). Por apresentar baixa temperatura de estocagem e pH mais elevado, a sua utilização para incorporação de microrganismos probióticos favorece uma maior manutenção da viabilidade das cepas probióticas frente aos tradicionais lácteos fermentados (TURGUT; CAKMAKCI, 2009; MOHAMMADI, et al., 2011). Em temperatura de manutenção do produto congelado, o sorvete apresenta características físico-químicas mais estáveis, com menor impacto sobre a viabilidade de cepas probióticas durante o armazenamento e, consequentemente, maior tempo de vida de prateleira em relação aos produtos refrigerados (BAŞYIĞIT; KULEAŞAN; KARAHAN, 2006).

Além disso, a composição do sorvete, que inclui proteína do leite, gordura e lactose, entre outros componentes, favorece a multiplicação e/ou manutenção de células probióticas e pode atuar, também, como crioprotetor durante o congelamento. Por essa sua característica peculiar, pode, ainda, atuar como a proteção física das células probióticas durante a passagem pelo trato gastrointestinal (CRUZ et al., 2011).

No entanto, perdas de células probióticas inevitávelmente ocorrem durante as diferentes fases do processamento do sorvete e podem ser minimizadas (MOHAMMADI, et al., 2011; ABGHARI; SHEIKH-ZEINODDIN; SOLEIMANIAN-ZAD, 2011).

Apesar das inúmeras vantagens que determinam o sorvete como uma matriz interessante para incorporação de culturas probióticas, a composição de um sorvete tradicional apresenta concentrações elevadas de gordura de leite entre 10 a 16% e de açúcar 10 a 16% (GOFF; HARTELL, 2006) o que torna o produto bastante calórico. No entanto, o sorvete costuma ser considerado um alimento nutritivo, por apresentar em sua formulação leite e, algumas vezes, frutas, representando fonte de proteínas, vitaminas e minerais. E a adição de culturas probióticas em sorvetes, além de agregar valor ao produto, pode proporcionar um produto com apelo funcional (CRUZ et al., 2011).

Entretanto, para atender o público que buscam uma dieta com restrinção de calorias novas tecnologias têm sido empregadas na melhoria da qualidade nutricional dos alimentos industrializados. No caso dos sorvetes, são utilizados ingredientes com benefícios voltados à saúde na substituição de gordura e açúcares, que ofereçam, além de redução de calorias, uma matriz favorável para adição de compostos funcionais (ALAMPRESE, et. al., 2002; AKALIN, et al., 2007).

Normalmente, esses alimentos são formulados com substitutos de gorduras, empregando-se ingredientes como a inulina e o WPC, por atuarem como excelentes propriedades de emulsificação e agente textura (AKALIN et al., 2007; FRANCK, 2008) no desenvolvimento de alimentos *light* com aceitabilidade similar ou superior aos produtos tradicionais.

A estabilidade probiótica em formulações de sorvetes com restrição de gorduras e açúcares podem ser verificados em alguns trabalhos, como os dos pesquisadores Magariños et al. (2007) e Harami (2008). Os sorvetes probióticos fermentados (AKALIN; ERISIR, 2008) e os sorvetes probióticos adicionados de *Lactobacillus johnsonii* La1 e formulados com diferentes níveis de açúcares e gordura (ALAMPRESE et al., 2005) apresentaram viabilidade probiótica satisfatória durante o período de armazenamento de 240 dias a -28ºC. Adicionalmente, os sorvetes probióticos com cepas de *Lactobacillus acidophilus, L. agilis* e *L. rhamnosus* de origem humana revelaram viabilidade dos probióticos, a qual não foi alterada durante o armazenamento do produto por até 6 meses, ($p < 0,05\%$), independentemente da presença de açúcar ou aspartame em sua formulação (ALAMPRESE et al., 2005).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução no. 16, de 30 de abril de 1999a.** Regulamento técnico de procedimentos para registro de alimentos e ou novos ingredientes. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref>. Acesso em: 7 jan. de 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução no. 18, de 30 de abril de 1999b.** 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> Acesso em: 7 jan. 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 379, de 26 de abril de 1999c.** Regulamento técnico referente a gelados comestíveis, preparados, pós para o preparo e bases para gelados comestíveis. Disponível em: http://<www.anvisa.gov.br/legis/portarias/379_99.htm>. Acesso em: 27 maio. 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 272, de 22 de setembro de 2005a.** Aprova regulamento técnico para produtos de vegetais, produtos de frutas e cogumelos comestíveis. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1883>. Acesso em: 8 jan. 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 266, de 22 de setembro de 2005b.** Aprova regulamento técnico para gelados comestíveis e preparados para gelados comestíveis. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=18825>. Acesso em: 8 jan. 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: **lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. 2008**. Brasília (DF): Ministério da Saúde. [citado: 2009 ago 01]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: agosto, 2012.

AHMED, M.; PRASAD, J.; GILL, H.S.; STEVENSON, L.; GOPAL, P.K. Impact of consumption of different levels of *Bifidobacterium lactis* HN019 on intestinal microflora of elderly human subjects. **Journal of Nutrition Health and Aging**; v.11, p.26-31, 2007.

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.

AKALIN, A.S., ERISIR, D. Effects of inulin and oligofructose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic ice-cream. **Journal of Food Science**, v.73, n.4, p.184–188. 2008.

ALAMPRESE, C., FOSCHINO, R., ROSSI, M., POMPEI, C., CORTI, S. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* CG addition in ice-cream. **International Journal of Dairy Technology**, v.58, n.4, p.200-206, 2005.

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

ALTERMAN, E.; RUSSELL, W.; AZCARATE-PERIL. M.A.; BARRANGOU, R.; BUCK, B.L.; MCAULIFFE, O. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** PNAS, v.102, n.11, p.3906–3912, 2005.

ALVAREZ, V.B.; WOLTERS, C.L.; VODOVOTZ, Y.; JI, T. Physical properties of ice cream containing milk protein concentrates. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n.3, p.862-871, 2005.

ALZAMORA, S.M.; SALVATORI, D.; TAPIA, M.S.; LÓPEZ-MALO, A.; WELTI-CHANES, J.; FITO, P. Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds. **Journal of Food Engineering**, v.67, p.205-214, 2005.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTIS, AACC. The definition of dietary fiver. **Cereal Foods Word**. v. 46, p.112-126, 2001.

AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. Position of the American Dietetic Association: Fat Replacers. **Journal of the American Dietetic Association**, v.105, n.2, p.266-275, 2005.

ANDREASEN, T.G.; NIELSEN, H. Ice cream and aerated desserts. In: EARLY, R. ed. **The technology of dairy products.** 2. ed. London, New York: Blackie Academic, 1998. cap.8, p.301-326.

ANNUNZIATA, A.; VECCHIO, R. Functional foods development in the European market: A consumer perspective. **Journal of Functional Food,** v.3, p. 223–228, 2011.

ANNUNZIATA, A.; VECCHIO, R. Consumer perception of functional foods: A conjoint analysis with probiotics. **Food Quality and Preference,** v.28, p.348-355, 2013.

ANTUNES, A.E.C.; CAZETTO, T.F.; BOLINI, H.M.A. Viability of probiotic microorganisms 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.

ANTUNES, A.J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino.** São Paulo: Ed. Manole, p.142, 2003.

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

ARANCIBIA, C.; COSTELL, E.; BAYARRI, S. Fat replacers in low-fat cellulose dairybeverages: Color, rheology, and consumer perception. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.5, p.2245-2258, May, 2011.

ARSENE-PLOETZE, F.; KUGLER, V.; MARTINUSSEN, J.; BRINGEL, F.; Expression of the pyr operon of *Lactobacillus plantarum* is regulated by inorganic carbon availability through a second regulator, PyrR2, homologous to the Pyrimidine-Dependent Regulator PyrR1. **Journal of Bacteriology**. v.188, n.24, p.8607-8616, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO – ABIA. “Falta regra da ANVISA para vender alimentos funcionais” reportagem da revista **Valor Econômico – SP**. (29/03/2012). Disponível em: <http://www.abia.org.br/anexos2012/42ecee10-dd4e-4dd3-af3b-79829b816a31.pdf>. Acesso em: 10 set. 2013.

ÁVILA-FERNÁNDEZ, A.; RENDÓN-POUJOL, X.; OLVERA, C.; GONZÁLEZ, F.; CAPELLA, S.; PEÑA-ÁLVAREZ, A.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A. Enzymatic hydrolysis of fructans in the tequila production process. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.12, p. 5578-5585, 2009.

AYKAN, V.; SEZGIN, E.; GUZEL-SEYDIM, Z.B. Use of fat replacers in the production of reduced-calorie vanilla ice cream Eur. **Journal of Lipid Science and Technology**, v.110, p. 516–520, 2008.

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.

AZCARATE-PERIL, M.A.; ALTERMANN, E.; HOOVER-FITZULA, R.L.; CANO, R.J.; KLAENHAMMER, T.R.; Identification and inactivation of genetic loci involved with *Lactobacillus acidophilus* acid tolerance. **Applied and Environmental Microbiology***,* v.70, n.9, p.5315–5322, 2004.

AZCARATE-PERIL, M.A; TALLON, R.; KLAENHAMMER, T.R. Temporal gene expression and probiotic attributes of Lactobacillus acidophilus duringgrowth in milk. **Journal of Dairy Science,** v.92, p.870-886, 2009.

BARRANGOU, R.; ALTERMANN, E.; HUTKINS, R.; CANO, R.; KLAENHAMMER, T.R. Functional and comparative genomic analyses of an operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus acidophilus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** - **PNAS,** v.100, n.15, p.8957–8962, 2003.

BARTOSCH, S.; FITE, A.; MACFARLANE, G.T.; MCMURDO, M.E. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70*,* p.3575 – 3581, 2004.

BASKAR, R.; RAJESWARI, V.; KUMAR, T. S. In vitro antioxidant studies in leaves of Annona species. **Indian journal of experimental biology**, v.45, n.5, p.480, 2007.

BAŞYIĞIT, G.; KULEAŞAN, H.; KARAHAN, A. Viability of human-derived probiotic lactobacilli in ice cream produced with sucrose and aspartame. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.33, n.9, p.796-800, 2006.

BIEDRZYCKA, E.; BIELECKA, M. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, n.3/4, p.170-175, 2004.

BJÖRKLUND, M.; OUWEHAND, A.C.; FORSSTEN, S.D.; NIKKILÄ, J.; TIIHONEN, K. Gut microbiota of healthy elderly NSAID users is selectively modified with the administration of *Lactobacillus acidophilus* NCFM and lactitol. The Age (Dordr). **Official Journal of the American Aging Association**, 2011. doi:10.1007/s11357-011-9294-5.

BURDOCK, G. A., CARABIN, I. G., & GRIFFITHS, J. C. The importance of gras to the functional food and nutraceutical industries. **Toxicology**, v.221, p.17–27, 2006.

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, n.4, p.1605-1610, 2007a.

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. Internacional **Journal of Food Microbiology**, v.137, p.121-129, 2010a.

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

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.38, n.2, p.315-317, 2007b.

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

CAI, Y.; OKADA, H.; MORI, H.; BENNO, Y.; NAKASE, T. *Lactobacillus paralimentarius sp*. nov., isolated from sourdough. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.49 n.4, p.1451-1455. 1999.

CARABIN, I.G.; FLAMM, W.G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.30, n.3, p.268-282, 1999.

CARDARELLI, H.R.; BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M. Inulin and oligofructose improve sensory quality and probiotic viability in synbiotic petit-suisse cheese. **LWT – Food Science and Technology**, v.41, p.1037-1046, 2008.

CLAESSON, M.J.; CUSACK, S.; O' SULLIVAN, O.; GREENE-DINIZ, R.; DEWEERD, H.; FLANNERY, E.; MARCHESI, JR.; FALUSH, D.; DINAN, T.; FITZGERALD, G.; STANTON, C.; VAN SINDEREN, D.; O'CONNOR, M.; HARNEDY, N.; O ' CONNOR, K.; HENRY, C.; O 'MAHONY, D.; FITZGERALD, A.P.; SHANAHAN, F.; TWOMEY, C.; HILL, C.; ROSS, R.P.; O ' TOOLE, P.W. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**.**PNAS**, v.108, n.1, p.4586 – 4591, 2011.

CLARKE, C. **The science of ice cream.** Cambrige: Royal Society of Chemistry, 2004. p.177 - 179. (RSC Paperbacks).

CROSS, M. L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic *lactobacilli* and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.34, n.4, p.245-253, 2002.

CRUZ, A.G.; ANTUNES, A.E.C.; SOUSA, A.L.O.P; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I. Ice-cream as a probiotic food carrier. **Food Research International**, v.42, Issue 9, p.1233-123, 2009.

CRUZ, A.G.; ANTUNES, A.E.C.; HARAMI, J.B.; SOUSA, A.L.O.P.; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I. Sorvetes Probióticos e Prebióticos. In: SAAD, S.M.I.;

CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F., eds. **Probióticos e Prebióticos em Alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Varela, 2011.Cap.15, p. 359-388.

CUMMINGS, J.; ANTOINE, J. M.; AZPIROZ, F.; BOURDET-SICARD, R.; SOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. Probiotics. **Best Practice & Research, Clinical Gastroenterology**, v.18, n.2, p.299-313, 2004.

DANIEL, C.; POIRET, S.; GOUDERCOURT, D.; DENNIN, V.; LEYER, G.; POT, B. Selecting lactic acid bacteria for their safety and functionality by use of a mouse colitis model. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.9, p. 5799–5805, 2006.

DANIEL, J.R. Advances in Development of Fat Replacers and Low-Fat Products. In: PASSOS, M.L.; RIBEIRO, C.P. eds. by CRC Press. **Innovation in Food Engineering: New Techniques and Products**. cap. 22, 2009, p. 657-681.

DEKKER, J.W., WICKENS, J.W., BLACK, P.N., STANLEY, T.V., MITCHELL, E.A., FITZHARRIS, E. A., TANNOCK, G. W., PURDIE, G.,CRANE, J. Safety aspects of probiotic bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 in human infants aged 0–2 years. **International Dairy Journal,** v.19, p.149–154, 2009.

DEIS, R.C. Low-Calorie Ingredients: Fat and Oil Replacers. In: Lyn O'Brien-Nabors. eds. Citation Information. **Alternative Sweeteners**, 4. ed. CRC Press, cap. 28, 2011, p. 507-522.

DELAROSA, O.; PAWELEC, G.; PERALBO, E.; WIKBY, A.; MARIANI, E.; MOCCHEGIANI, E.; TARAZONA, R.; SOLANA, R. Immunological biomarkers of ageing in man: changes in both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity. **Biogerontology**, v.7, p.471 – 481, 2006.

DEMBITSKY, V. M.; POOVARODOM, S.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; VEARASILP, S., TRAKHTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. **Food Research International**, v. 44, n.7, p.1671-1701, 2011.

DING, W.K.; SHAH, N.P. Enhancing the Biotransformation of Isoflavones in Soymilk Supplemented with Lactose Using Probiotic Bacteria during Extended Fermentation. **Journal of Food Science**, v. 75, n.3, 2010.

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.

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.

EUROMONITOR INTERNACIONAL. Consumer market sizes. Table 7.12 — Dairy Products and Ice Cream: Per Capita Retail Sales 2011. **International Marketing Data and Statistics**. 37. ed. cap. 7, 2013. Disponivel em: <http://www.euromonitor.com/medialibrary/PDF/Book_Imdas_2013.pdf.> Acesso em 25 de mai. de 2013.

FAO/WHO (2006). Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation, FAO. **Food and Nutrition Paper** No. 85. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

FLORENCE, N. T.; BENOIT, M. Z.; JONAS, K.; ALEXANDRA, T.; DÉSIRÉ, D. D. P.; PIERRE, K.; THÉOPHILE, D. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of ethnopharmacology**. v.151, p. 784-790, 2014.

FORSYTHE, P.; BIENENSTOCK, J. Immunomodulation by Commensal and Probiotic Bacteria. **Immunological Investigations**, v.39, n.4-5, p.429-448, 2010.

FRANCK, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**, v.87, suppl.2, p.287-291, 2002.

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

FRANCO, M. R. B.; JANZANTTI, N. S. Aroma of minor tropical fruits. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, p. 358–371, 2005.

GARCÍA SOTO, A. M. Evaluación del método de propagación y tipo de fertilización sobre la calidad fisico-química de frutos de Guanabana (*Annona muricata* L.). (2008) Trabajo de Grado. Universidad del Zulia. Facultad de Ingeniería. División de Postgrado. Maracaibo, Venezuela, 2008.

GAJALAKSHMI, S.; VIJAYALAKSHMI, S.; DEVI RAJESWARI, V. Phytochemical and Pharmacological properties of *Annona nuricata*: A Review. **International Journal of pharmacy and pharmaceutical science**, v.4, n.2, 2012.

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

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

GOFF, H.D. 2005. **Structure of the ice-cream.** Dairy Science and Technology website. University of Guelph. Disponível em: <http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/icstructure.html>. Acesso em: 31 jan. 2013.

GOFF, H.D.; HARTEL, R.W. **Ice cream and frozen desserts**. In "Handbook of Food Science, Technology and Engineering." Y. H. Hui, ed. Boca Raton. FL: CRC/Taylor & Francis. v. 4, 2006. p.154-1; 154-48.

GOFF, H.D.; HARTEL, R. W. **Ice Cream**. 7. ed., New York, Springer, 462p, 2013.

GOH, Y.J.; KLAENHAMMER, T.R. Functional roles of aggregation-promoting-like factor in stress tolerance and adherence of *Lactobacillus acidophilus* NCFM ®. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.5005-5012, 2010.

GOMEZ, E.; TUOHY, K. M.; GIBSON, G. R.; KLINDER, A.; COSTABILE, A. In vitro evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of Agave fructans. **Journal of applied microbiology**, v.108, n.6, p.2114-2121. 2010.

GOPAL, P.; DEKKER, J.; PRASAD, J.; PILLIDGE, C.; DELABRE, M.; COLLETT, M. Development and commercialization of Fonterra's probiotic strains, Australian **Journal of Dairy Technology**, 60, p.174–183, 2005.

GOPAL, P.; PRASAD, J.; GILL, H.S. Effects of the consumption of *Bifidobacterium lactis* HN019 (DR10TM) and galacto-oligosaccharides on the microflora of the gastrointestinal tract in human subjects. **Nutrition Research**, v.23, p.1313-1328, 2003.

GOPAL, P. K.; PRASAD, J.; SMART, J.; GILL, H.S. In vitro adherence properties of Lactobacillus rhamnosus DR20 and Bifidobacterium lactis DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic Escherichia coli. **International Journal of Food Microbiology**, v.67, p.207-216, 2001.

GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; NAZZARO, F.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, p.292-302, 2010.

GRANGER, C.; LEGER, A.; BAREY, P.; LANGENDORFF, V.; CANSELL, M. Influence of formulation on the structural networks in ice cream**. International Dairy Journal**, Barking, v.15, n.3, p.255-262, 2005.

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.

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

HARAMI, J.B**. Desenvolvimento de cereal em barra com gelado comestível simbiótico.** São Paulo, 133p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, 2008.

HASLER, C.M. Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges a Position paper from the American Council on Science and Health. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 12, p.3772–3781, 2002.

HORT, J.; COOK, D. Formulating low-fat food: the challenge of retaining flavour quality. In: Taylor, A.; Hort, J. eds. **Modifying flavour in food.** Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*,* 2007, p.131-145.

HUPPERTZ, T.; PATEL, H. Advances in Milk Protein Ingredients. In: Ghosh, D.; Bagchi, S.D.; Smarta, R.B. eds **Innovation in Healthy and Functional Foods** by CRC Press**.** cap. 22, 2012, p. 363 -381.

IBRAHIM, F.; RUVIO, S.; GRANLUND, L.; SALMINEN, S.; VIITANEN, M.; OUWEHAND, A.C.; Probiotics and immunosenescence: cheese as a carrier. FEMS **Immunology & Medical Microbiology**, v.59, p. 53–59, 2010.

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

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S. Probiotics, gut inflammation and barrier function. **Gastroenterology Clinics of North America***,* v.34, p. 437-450, 2005.

JARAMILLO-FLORES, M. E.; HERNANDEZ-SANCHEZ, H. Thermal diffusivity of soursop (*Annona muricata* L.) pulp. **Journal of Food Engineering,** v.46, p. 139-143, 2000.

JONES, P.J. Clinical nutrition: 7. Functional foods - more than just nutrition. **Canadian Medical Association Journal**, v.166, n.12, p.1555-1563, 2002.

KLAYRAUNG, S.; VIERNSTEIN, H.; OKONOGI, S. Developments of tablets containing probiotics: effect of formulation and processing parameters on bacteria viability. **International Journal of Pharmaceutics**, v.370, n.1–2, p. 54–60, 2009.

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.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT R. **Ciência Rural,** Santa Maria, v.36, n.4, p.1283-1287, 2006.

KONSTANTINOV, S.R., SMIDT, H., DE VOS, W.M.; BRUIJENS, S.C.M.; SINGH, S.K.; VALENCE, F.; MOLLE, D.; LORTAL, S.; ALTERMANN, E.; KLAENHAMMER, T.R.; VAN KOOYK, Y.S. layer protein A of Lactobacillus acidophilus NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.**PNAS**, v. 105, p.19474-19479, 2008.

LIU, C.; ZHANG, Z.; DONG, K.; GUO, X. Adhesion and immunomodulatory effects of *Bifidobacterium lactis* HN019 on intestinal epithelial cells INT-407. **World Journal of Gastroenterology**.v.16, n.18, p.2283–2290, 2010.

LAHTINEN, S.J.; FORSSTEN, S.; AAKKO, J.; GRANLUND, L.; RAUTONEN, N.; SALMINEN, S.; VIITANEN, M.; OUWEHAND, A.C. Probiotic cheese containing *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM ® modifies subpopulations of fecal *lactobacilli* and *clostridium difficile* in the elderly.Age (Dordr). **Official Journal of the American Aging Association,** v.34, p.133 – 143, 2012.

LAVANDA, I.; SAAD, S.M.I.; LOBO, A.R.; COLLI, C. Prebióticos y su efecto en la biodisponibilidad del calcio. **Revista de Nutrição**, v. 24, n.2, p.333-44, 2011.

LIEVIN-LE MOAL, V.; SERVIN, A.L. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. **Clinical Microbiology Reviews** v.19, p.315–337, 2006.

LIMA, M. A. C.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C. Changes related to softening of soursop during postharvest maturation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília**, v.41, n.12, dez. 2006.

LIVNEY, Y.D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.15, p.73–83, 2010.

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.

LOPEZ, M.G.; MANCILLA-MARGALLI, N.A; MENDOZA-DIAZ, G. Molecular structures of fructans from Agave tequilana *Weber var. azul*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p. 7835–7840, 2003.

LOPEZ, H.W.; COUDRAY, C.; BALLANGER, J.; YOUNES, H.; DEMIGNE, C.; REMSY, C. Intestinal fermentation lessens the inhibitory effects of phytic acid on mineral utilization in rats. **Journal of Nutrition**, v.128, p.1192–1198, 1998.

LUTCHMEDIAL, M.; RAMLAL, R.; BADRIE, N.; CHANG-YEN, I. Nutritional and sensory quality of stirred soursop (*Annona muricata* L.) yoghurt. **International journal of food sciences and nutrition**, v.55, n.5, p.407-414, 2004.

MADUREIRA, A.R.; PEREIRA, C.I.; GOMES, A.M.P.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Bovine whey proteins: overview on their main biological properties. **Food Research International**, v.40, p.1197–1211, 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 microrganisms (*Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12) in ice cream. **International Journal of Dairy Technology**, v.60, n.2, p.128-134, 2007.

MÄKIVUOKKO, H.; FORSSTEN, S.; SAARINEN, M.; OUWEHAND, A.; RAUTONEN, N. Synbiotic effects of lactitol and *Lactobacillus acidophilus* NCFM in a semi-continuous colon fermentation model. **Beneficial Microbes Journal**, v.1, p.131 – 137, 2010.

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

MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey. **Alternative Medicine Review** v. 9, n.2, p.136–156, 2004.

MARSHALL, T.M.; ARBUCKLE, W.S. **Ice cream.** 5. ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. 349p.

MATOS, R.A. **Desenvolvimento e mapa de preferência externo de bebida láctea à base de soro e polpa de graviola (*Annona muricata* L.).** Sudoeste da Bahia, BA, 79f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2009.

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.

MELLO, V.D.; LAAKSONEN, D.E. Dietary fibers: current trends and health benefits in the metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia,** v.53, n.5, p.509-518, 2009.

MENRAD, K. Market and marketing of functional food in europen. **Journal of food Engineering**, v.56, p.181–188, 2003.

MEYER, D.; STASSE-WOLTHUIS, M. Inulin and bone health. **Current Topics in Nutraceutical Research,** v. 4, 211 e 226, 2006.

MOHAMADZADEH, M.; PFEILER, E.A.; BROWN, J.B.; ZADEH, M.; GRAMAROSSA, M.; MANAGLIA, E.; BERE, P.; SARRAJ, B.; KHAN, M.W.; PAKANATI, K.C.; ANSARI, M.J.; O'FLAHERTY, S.; BARRETT, T.; KLAENHAMMER, T.R. Microbes and Health Sackler Colloquium: Regulation of induced colonic inflammation by *Lactobacillus acidophilus* deficient in lipoteichoic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**.**PNAS**.v.108, p. 4623-4630, 2011.

MOHAMMADI, R.; MORTAZAVIAN, A.M.; KHOSROKHAVAR, R.; CRUZ, A.G. Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. **Annals of Microbiology**, v. 61, p.411 – 424 (review), 2011.

MONREAL, M.T.F.D.; PEREIRA, P.C.M.; LOPES, C.A.M. Intestinal microbiota of patients with bacterial infection of the respiratory tract with Amoxicillin. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, v.9, p.292-300, 2005.

MUELLER, S.; SAUNIER, K.; HANISCH, C.; NORIN, E.; ALM, L.; MIDTVEDT, T.; CRESCI, A.; SILVI, S.; ORPIANESI, C.; VERDENELLI, M.C.; CLAVEL, T.; KOEBNICK, C.; ZUNFT, H.J.F.; DORE, J.; BLAUT, M. Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study***.*** **Applied *and* Environmental Microbiology**, v. 72, p.1027 – 1033, 2006.

NAGALINGAM, N. A; LYNCH, S.V. Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 18, n.5, p. 968-980, 2012.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; ORLANDO, P.; COPPOLA, R. Biochemical Traits, Survival and Biological Properties of the Probiotic *Lactobacillus plantarum* Grown in the Presence of Prebiotic Inulin and Pectin as Energy Source. **Pharmaceuticals**, v. 5, p.481-492, 2012.

NICOLI, J.R.; VIEIRA, E.C.; PENNA, F.J.; VIEIRA, L.Q.; RODRIGUES, A.C.P.; NEUMANN, E.; SILVA, A.M.; FILHO, J.V.M.L.; BAMBIRRA, E.A.; ARANTES, R.M.E.; MACHADO, D.C.C. Probióticos: experiências com animais gnotobióticos. In: FERREIRA, C.L.L.F., ed. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. p. 123-133.

O'FLAHERTY, S.J.; KLAENHAMMER, T.R. Functional and Phenotypic Characterization of a Protein from *Lactobacillus acidophilus* Involved in Cell Morphology, Stress Tolerance and Adherence to Intestinal cells. **Microbiology**, v.156, p.3360–3367, 2010.

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

OKIGBO, R. N.; OBIRE, O. Mycoflora and production of wine from fruits of soursop (*Annona Muricata* L.). **International Journal Wine Research**, v. 1, p. 1-9, 2009.

OLIVEIRA, M.N. **Tecnologia de produtos lácteos funcionais**. Livro: Ed. Atheneu. São Paulo, 2009.

OUWEHAND, A.; LAHTINEN, S. Commercially available human probiotic microorganisms – Lactobacillus acidophilus NCFM. In: YUAN KUN LEE, SEPPO SALMINEN. eds. "**Handbook of Probiotics and Prebiotics**" 2. ed., JOHN WILEY & SONS, 2009. cap. 6, p.541-532.

PARK, S.Y.; JI, E.; KO, Y.T.; JUNG, H.K.; USTUNOL, Z.; PESTKA, J.J. Potentiation of hydrogen peroxide, nitric oxide and cytokine prodution in RAW 264.7 macrophage cell exposed to human and commercial isolates of *Bifidobacterium*. **The International Journal of Food Microbiology**, v.46, p. 231-241, 1999.

PERDIGÓN, G., HOLGADO, A.P.R. Mechanisms involved in the immunostimulation by lactic acid bacteria. In: FULLER, R., PERDIGÓN, G. eds**.** **Probiotics: Immunomodulation by the Gut Microflora and Probiotics**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. cap. 3, p.213-233.

PERDIGON, G.; FULLER, R.; RAYA, R. Lactic acid bactéria and their effect on the immune system. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v.2, p. 27-42, 2001.

PÉREZ-ALVAREZ, J.A. Overview of meat products as functional foods. In: J. FERNÁNDEZ-LÓPEZ & J. A. PÉREZ-ALVAREZ. eds. **Technological strategies for functional meat products development**, kerala, india: transworld research network, p. 1–17, 2008.

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.

POMPEI, A.; CORDISCO, L.; RAIMONDI, S.; AMARETTI, A.; PAGNONI, U.G.; MATTEUZZI, D.; ROSSI, M. In vitro comparison of the prebiotic effects of two inulin-type fructans. **Anaerobe**, v.14, p.280-286, 2008.

PRASAD, J.; GILL, H.; SMART, J.; GOPAL, P.K. Selection and characterisation of Lactobacillus and Bifidobacterium strains for use as probiotics. **International Dairy Journal**, v.8, p.993-1002, 1998.

RABOT, S.; RAFTER. J.; RIJKERS, G.; WATZL, B.; ANTOINE, J.M. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: Impact of probiotics on digestive system metabolism. **The Journal of Nutrition**, v.140, p. 677–689, 2010.

RAMÍREZ, F.; LÓPEZ, M.; GUTIÉRREZ, A. Manejo post-cosecha y comercialización de Guanábana (*Annona muricata* L.). Serie de paquetes de capacitación sobre manejo post-cosecha de frutas y hortalizas. Convênio SENA, Reino Unido, 1998.

RAMOS, M.P.P. Influência da ingestão de *Bifidobacterium breve* carreado no leite humano na modulação da microbiota intestinal, na histomorfometria do cólon, na produção de citocinas e de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio em modelo murino. **Tese de Doutorado** - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, 125p, 2006.

RAUD, C. Os Alimentos Funcionais: A nova fronteira da indústria alimentar análise das estratégias da Danone e da Nestlé no mercado brasileiro de iogurtes. **Revista Sociologia Política**, Curitiba, v.16, n.31, p. 85-100, 2008.

RINNE, M.M.; GUEIMONDE, M.; KALLIOMAKI, M.; HOPPE, U.; SALMINEN, J.S.; ISOLAURI, E. Similar bifidogenic effects of prebiotic-supplemented partially hydrolyzed infant formula and breastfeeding on infant gut microbiota. FEMS **Immunology and Medical Microbiology**, v.43, n.1, p.59-65, 2005.

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

ROBERFROID, M.B. An European consensus of scientific concepts of functional foods. **Nutrition**, v.16, p. 689–691, 2000.

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

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

RODRIGUES, L.; TEIXEIRA, J.A.C. Potential Applications of Whey Proteins in the Medical Field. In: PASSOS, M.L.; RIBEIRO, C.P. eds. by CRC Press. **Engineering Aspects of Milk and Dairy Products**, Coimbra. 2009, cap. 10, p. 222- 241.

ROLLER, S.; JONES, S.A. **Handbook of fat replacers.** Weimar: Chips, 1996. 336 p.

ROUZAUD, G.C.M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: functional ingredients for microbial management strategies. In: BILIADERIS, C.G.; IZYDORCZYK, M.S., eds. **Functional food carbohydrates**. CRC Press, 2007. cap. 15, p. 479-509.

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.

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

SAAD, S.M.I.; BEDANI, R. Alimentos funcionais probióticos e prebióticos. In. Tirapegui, J., ed, **Nutrição e Aspectos Atuais,** 3. ed. São Paulo: Atheneu. 2013. cap. 21, p. 241-356.

SAAD, S.M.I; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e prebióticos em alimentos: Fundamentos e aplicações tecnológicas.** São Paulo, 1. ed., editora: Varela, 2011. cap. 15, p. 360.

SACRAMENTO, C. K. D.; FARIA, J. C.; CRUZ, F. L. D.; BARRETTO, W. D. S.; GASPAR, J. W.; LEITE, J. B. V. Physical chemical characterization of fruit of three types of soursop trees (*Annona muricata* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 329 331, agost. 2003.

SALMINEN, S.; Von WRIGHT, A.; MORELLI, L.; MARTEAU, P.; BRASSART, D.; VOS, W. M.; FONDEN, R.; SAXELIN, M.; COLLINS, K.; MOGENSEN, G.; BIRKELAND, S. E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Demonstration of safety of probiotics. **International Journal Food Microbiology**, v. 44, p. 93-106, 1998.

SAMEERA, K.; GANESH, R.; PRASAD, M.P. Gene expression study of dnak gene in *Lactobacillus acidophilus* by Qrt Pcr in response to different stress conditions. **International Journal of Science, Environment and Technology**, v. 2, n. 6, p. 1245 – 1251, 2013.

SANDERS, M.E. and KLAENHAMMER, T.R. The Scientific Basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM Functionality as a Probiotic. **Journal of Dairy Science.** v.84, p.319-331, 2001.

SANDERS, M.E.; MARCO, M. Food formats for effective delivery of probiotics. **Annual Review of Food Science Technology**, v.1, p.65–85, 2010.

SANTOS, G.G. **Características físicas, químicas e aceitabilidade de sorvete de mangaba e reduzido teor energético**. Goiás, 2008. 68p. Dissertação de Mestrado, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos - Universidade Federal de Goiás.

SANZ, T., SALVADOR, A., & FISZMAN, S. M. Evaluation of four types of resistant starch in muffin baking performance and relationship with batter rheology. **European Food Research & Technology**, v.227, p.813–819, 2008.

SÃO-JOSÉ, A.R.; ANGEL, D.N.; BONFIM, M.P.; REBOUÇAS, T. N. H. Cultivo da graviola. In: Semana Internacional de Fruticultura e Agroindústria, 7, 2000, Fortaleza. Cursos. Fortaleza: **Sindifruta, Instituto Frutal**, 35p. 1 CD-ROM. 2000.

SAZAWAL, S.; DHINGRA, U.; SARKAR, A.; DHINGRA, P.; DEB, S.; MARWAH, D.; MENON, V.; KUMAR, J.; BLACK, R. Efficacy of milk fortified with *Bifidobacterium lactis* (DR10™) and prebiotics galacto-oligosaccharide in prevention of morbidity and nutrition status. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.13, p.28, 2004.

SAZAWAL, S.; DHINGRA, U.; HIREMATH, G.; SARKAR, A.; DHINGRA, P.; DUTTA, A. Prebiotic and probiotic fortified milk in prevention of morbidities among children: community-based, randomized, double-blind, controlled trial. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition** JPGN, v.51, n. 3, 2010.

SAVAGE, D.C. Microbial biota of the human intestine: a tribute to some pioneering scientists. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v.2, p.1–15, 2001.

SCHMIDT, E.G.W.; CLAESSON, H.M.; JENSEN, S.S.; RAVN, P.; KRISTENSEN, N.N. Antigen-presenting cells exposed to *Lactobacillus acidophilus* NCFM ® *bifidobacterium bifidum* BI-98, and BI-504 reduce regulatory T cell activity. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 16, Issue 3, p.490-500, 2009.

SCHULZ, A.G.M.; AMELSVOORQ, J.M.M.; BEATEN, A.C. Dietary native resistant starch but not retrograded resistant starch raises magnesium and calcium absorption in rats. **Journal of Nutrition**, v. 123, n.10, p.1724-1731, 1993.

SGARBIERI, V.C., Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, n.1, p.43-56, jan. / mar., 2005.

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.

SIRÓ I, KAPOLNA E, KAPOLNA B, LUGASI. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—a review. **Appetite,** v.51, p. 456–467, 2008.

SLOVER, C.M.; DANZIGER, *L. Lactobacillus*: a review**. Clinical Microbiology Newsletter**, v.30, n.4, p.23-27, 2008.

SMITHERS, G.W. Whey and whey proteins**. International Dairy Journal** v. 18, p.695–704, 2008.

SOLER, M.P.; VEIGA, P.G. **Sorvetes.** Campinas: ITAL/CIAL, 2001. 68 p. (Série Publicações Técnicas de informações de alimentos).

SOLÍS-FUENTES, J. A.; AMADOR-HERNÁNDEZ, C.; HERNÁNDEZ-MEDEL, M. R.; DURÁN-DE-BAZÚA, M. C. Caracterización fisicoquímica y comportamiento térmico del aceite de almendra de guanábana (*Annona muricata*, L). **Grasas y aceites**, v. 61, n.1, p. 58-66, 2010.

STRINGHETA, P.C.; OLIVEIRA, T.T.; GOMES, R.C.; PENHA, M.; AMARAL, 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 Microbiolog**, 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.

TACO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos / NEPA - UNICAMP-Versão II. - 4. ed., Campinas-SP: NEPA-UNICAMP, 2011, 113p.
TEIXEIRA, C. K. B.; NEVES, E. C. A.; PENA, R. S. Estudo da Pasteurização da Polpa de Graviola. **Revista de Alimentos e Nutrição**. Araraquara, v. 17, n. 3, p. 251- 257, jul/set. 2006.

THAMMARUTWASIK, P.; HONGPATTARAKERE, T.; CHANTACHUM, S.; KIJROONGROJANA, K.; ITHARAT, A.; REANMONGKOL, W.; TEWTRAKUL, S.; OORAIKUL, B. Prebiotics – a review. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v.31, n.4, p.401-408, 2009.

TOMAS, M., BRU E, WIESE B, RUIZ HOLGADO A, NADER-MACAS M. Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production by vaginal Lactobacillus salivarius CRL 1328. **The Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p.714-724, 2002.

TRAHAN, C.E. *Lactobacillus acidophilus* NCFM ® Survival in Acidified Yogurts. **MSc Thesis**, North-Carolina State University, 2008.

TRINDADE, E.B.S.M. Avaliação da flora bacteriana intestinal e do estado nutricional de indivíduos infectados pelo HIV-1, suplementados com fibra solúvel e probiótico, Botucatu, Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, 2004.

TURGUT, T.; CAKMAKCI, S. Investigation of the possible use of probiotics in ice cream manufacture. **International Journal of Dairy Technology**, v.62, Issue 3, p.444–451, 2009.

TURRONI, F.; RIBBERA, A.; FORONI, E.; VAN SINDEREN, D.; VENTURA, M. Human gut microbiota and bifidobacteria: from composition to functionality. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, p.35–50, 2008.

USDA- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. National Nutrient Database for Standard Reference Release 26 (2013) Disponível em: http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2459?qlookup=09315&max=25&man=&lfacet=&new=1. Acessado em 07 de jan. de 2014.

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

VINDEROLA, C.G.; MEDICI, M.; PERDIGON, G. Relationship between interaction sites in trhe gut, hidrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous and exogenous bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p.230-243, 2004.

WALLER, P.A.; GOPAL, P.K.; LEYER, G.J.; OUWEHAND, A.C.; REIFER, C.; STEWART, M.E.; ET AL. Dose-response effect of Bifidobacterium lactis HN019 on whole gut transit time and func-tionalgastrointestinal symptoms in adults. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 46, p.1057-64, 2011.

WALZEM, R.L.; DILLARD, C.J.; GERMAN, J.B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n.42, p.353–375, 2002.

WEISS, G.; JESPERSEN, L. Transcriptional Analysis of Genes Associated with Stress and Adhesion in Lactobacillus acidophilus NCFM ® during the Passage through an *in vitro* Gastrointestinal Tract Model. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.18, p. 206-214, 2010.

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.

WOODMANSEY, E.J. Intestinal bacteria and ageing. **Journal of Applied Microbiology,** v.102, p.1178 – 1186, 2007.

WU. L.; LU, Y.; ZHENG, Q.T.; TAN, N.H.; LI, C.M.; ZHOU, J. Study on the spatial structure of annomuricatin, a cyclohexapeptide from the seeds of Annona muricata. **Journal of Molecular Structure**. v. 827, n.1, p.145-148, 2007.

ZIEMER, C.; GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspective and future strategies. **International Dairy Journal,** v.8, p.473-479, 1998.

CAPÍTULO 2

RESUMO

Sobrevivência das cepas probióticas incorporadas em sorvete de graviola com baixo teor de gordura, no produto durante o seu armazenamento e quando submetido a condições gastrointestinais simuladas *in vitro.*

O efeito da adição de inulina (I) e da substituição parcial da gordura do leite (G) pelo concentrado de proteína de soro de leite (WPC) sobre a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* NCFM e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 em sorvetes de graviola (*Annona muricata* L.) com baixo teor de gorduras e sobre a sobrevivência dos probióticos no sorvete submetido a condições gastrointestinal simulada *in vitro* foi investigado. Elevada viabilidade probiótica foi observada para todas as formulações, com populações acima de 8,0 UFC/g, sem diferirem significativamente ao longo do armazenamento de 112 dias ($p > 0,05$). Em geral, quando comparada com a cultura recentemente preparada, a matriz do sorvete favoreceu a sobrevivência das cepas probióticas ao estresse gastrointestinal simulado *in vitro*. Adicionalmente, a resistência de *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 aos sucos gastrointestinais artificiais foi maior em relação a *L. acidophilus* NCFM, uma vez que as populações de NCFM e de HN019 diminuíram, respectivamente, cerca de 1,2 log UFC/g e de 5,2 log UFC/g durante todo o armazenamento de 112 dias. O efeito protetor da inulina e/ou WPC na resistência de *L. acidophilus* aos sucos gastrointestinais artificiais foi observado ao 56º dia e para *B. animalis* subsp. *lactis* ao 2º dia de armazenamento ($p < 0,05$). A utilização de WPC ou do prebiótico inulina pode ser vantajosa para o desenvolvimento de sorvetes simbióticos com baixo teor de gordura, uma vez que a presença desses ingredientes desempenharam um papel importante na proteção dos probióticos contra sucos gastrointestinais.

Palavras-chave: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, Prebiótico, Inulina, Resistência gastrointestinal *in vitro,* Graviola (*Annona muricata* L.), Sorvete reduzido de gorduras.

ABSTRACT

Survival of probiotic strains in low-fat graviola ice-cream during storage and under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions

The effect of the addition of inulin (I) and the partial substitution of the milk fat (MF) by whey protein concentrate (WPC) on *Lactobacillus acidophilus* (NCFM) and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 viability and on probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions in low- fat graviola ice-creams was investigated. High probiotic viability was
observed for all formulations, with means populations above 8.0 CFU/g and did not differ significantly throughout storage 112 days ($p > 0.05$). In general, when compared to a freshly prepared culture, the ice-cream matrix favoured the survival of both probiotic strains to simulated gastrointestinal stress. Additionally, the *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 resistance to the artificial gastrointestinal juices was higher than for *L. acidophilus* NCFM, since the HN019 and NCFM populations decreased approximately 5.2 log CFU/g and 1.2 log CFU/g, respectively, throughout storage. The protective effect of WPC or/and WPC + I on the *L. acidophilus* resistance to artificial gastrointestinal juices was observed on the 56th day and for *B. animalis* subsp. *lactis* on the 2nd day of storage ($p< 0.05$). The use of WPC or inulin may be advantageous in the development of low-fat synbiotic ice-creams, since the presence of these ingredients played an important role in probiotic protection against gastrointestinal juices

Keywords: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, Prebiótic, Inulin, Survival gastrointestinal *in vitro,* Graviola (*Annona muricata* L.), Low fat ice-cream.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o interesse dos consumidores por uma alimentação equilibrada tem incentivado o desenvolvimento por novos alimentos nutritivos e que contenham propriedades funcionais que contribuam para o bem estar do indivíduo. Nessa categoria o sorvete surge como uma excelente alternativa de veículo alimentar para a incorporação de microrganismos probióticos e de ingredientes prebióticos, uma vez que é um produto muito apreciado por crianças, jovens, adultos e idosos (CRUZ et. al., 2009; MOHAMMADI et al., 2011). Adicionalmente, quando formulado com baixo teor de gordura, tende a ser mais atraente do que os sorvetes tradicionais por ser beneficamente mais saudável.

Comparado ao leite fermentado, o sorvete favorece maior viabilidade de células probióticas durante a produção e, especialmente, durante o armazenamento (TURGUT; CAKMAKCI, 2009; MOHAMMADI et al., 2011). Essa vantagem pode ser atribuída ao seu pH, próximo à neutralidade, o qual possibilita uma melhor sobrevivência desses microrganismos. Por ser um produto congelado, o sorvete acaba tornando-se mais estável frente aos produtos refrigerados, tais como iogurtes e leites fermentados. Desta forma, pode garantir uma maior taxa de sobrevivência microbiana por longos períodos de armazenamento (HAYNES; PLAYNE, 2002; BASYIGIT; KULEASAN; KARAHAN, 2006; CRUZ et al., 2011). No entanto, perdas de células probióticas podem ocorrer durante a fase do processamento desse produto e, especialmente, após a sua passagem pelo trato gastrointestinal - TGI.

Os testes de resistência gastrointetinais simulados *in vitro* contribuem para o conhecimento de cepas probióticas, permitindo a seleção de novas estirpes com maior capacidade de colonizar o intestino (CHAMPANHE; GARDNER, 2005). Esses testes, embora não sejam inteiramente adequados para predizer a funcionalidade dos microrganismos probióticos no corpo humano (FAO / WHO, 2006; PINTO et al., 2006), apresentam-se como uma excelente ferramenta para a avaliação da ação protetora do alimento na sobrevivência das cepas probióticas aos sucos gastrointestinais (SANDERS; MARCO, 2010; SCHILLINGER; GUIGAS; HOLZAPFEL, 2005). Vários trabalhos têm relatado que os probióticos, quando incorporados em alimentos

lácteos, resistem melhor à passagem pelo TGI (LAHTINEN et al., 2012; WALLER et al., 2011).

Como estratégia para a obtenção de maiores taxas de sobrevivência de cepas probióticas durante a passagem pelo trato gastrointestinal, tem sido sugerida a coadministração dos probióticos com ingredientes prebióticos (SU et al., 2007; MARTINEZ et al., 2011). Quando existe um sinergismo entre microrganismos probióticos e ingredientes prebióticos em um produto alimentício, definimos esse como alimento simbiótico.

A inulina é um prebiótico de cadeia mais longa (DP), constituída de 10-60 unidades de monômeros de frutose. Já a oligofrutose representa um subgrupo da inulina, apresentando DP < 10 (LAPARRA; SANZ, 2010; SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005). Devido à sua estrutura básica (ligações β(2→1)), a inulina e a oligofrutose são resistentes à hidrólise pelas enzimas digestivas humana (SAAD, 2006; FRANCK, 2008). Desta forma, podem contribuir na proteção física dos probióticos ao estresse conferido pelas condições gastrointestinais (principalmente resultantes da ação dos extratos biliares e do baixo pH gástrico) (SANDERS; MARCOS, 2010).

Além de contribuir com mudanças desejáveis sobre a composição química e com fatores nutricionais, o concentrado protéico do soro de leite, ingrediente amplamente utilizado como substituto de gordura, aparentemente contribui positivamente para a resistência dos microrganismos probióticos às condições adversas durante a passagem pelo sistema gastrointestinal (BURITI; CASTRO; SAAD, 2010; MOHAMMADI et al., 2011).

O efeito protetor dos WPCs é semelhante aos dos produtos lácteos, uma vez que, em virtude de sua composição, podem atuar como tampões, possibilitando a manutenção do pH do meio e, desta forma, favorecer a sobrevivência de células probióticas em quantidades mais adequadas para resultar em benefício ao hospedeiro (AKALIN et al., 2007; RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

Nas sobremesas congeladas, incluindo os sorvetes, as frutas são utilizadas como saborizantes naturais, (GOFF; HARTELL, 2013), sendo vistas como ingredientes saudáveis, fontes de vitaminas, minerais entre outros componentes nutricionalmente benéficos ao consumidor. O sabor único da graviola (*Annona muricata* L.) permite que seus produtos processados tenham

potencial para competir no mercado internacional (FRANCO; JANZANTTI, 2005).

Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da substituição parcial da gordura do leite por WPC e a adição do prebiótico do tipo inulina sobre a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* NCFM e *Bifidobacterium lactis* HN019 em sorvete *light* com polpa de fruta de graviola (*Annona muricata* L.) e sobre a sobrevivência dos probióticos ao trânsito gastrointestinal - TGI simulado *in vitro* durante os 112 dias de armazenamento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Planejamento experimental

Para o desenvolvimento do sorvete funcional com polpa de fruta tropical de graviola (*Annona muricata L.)* e com baixo teor de gordura, foi utilizado um delineamento experimental 2^2, constituído por dois fatores – o concentrado proteico de soro de leite (WPC) como substituto parcial da gordura do leite e o prebiótico inulina, em dois níveis (presença ou ausência) para produção de quatro formulações: F1-controle (- inulina, - WPC); F2 (+ Inulina, - WPC); F3 (- inulina, + WPC) e F4 (+ inulina, + WPC). Para o desenvolvimento do sorvete funcional, foi utilizado o delineamento experimental descrito na **Tabela 1**.

Tabela 1. Delineamento experimental e proporções definidas para os constituintes das 4 formulações do sorvete funcional com baixo teor de gordura e as quantidades codificadas em ausência [-1] ou presença [+1] dos fatores (inulina e o substituto parcial da gordura láctea -WPC) e os respectivos valores reais.

Constituintes	**Quantidade de cada ingrediente em 100 g de sorvete**			
	F1	**F2***	**F3**	**F4***
Inulina	0,00 [-1]	6,00 [+1]	0,00 [-1]	6,00 [+1]
WPC	0,00 [-1]	0,00 [-1]	1,50 [+1]	1,50 [+1]
Gordura láctea	3,00	3,00	1,50**	1,50**
Probióticos***	0,08	0,08	0,08	0,08

* formulações simbióticas com a presença [+1] de 6% de prebiotico (inulina).

** substituição parcial da gordura láctea (1,5%) pelo WPC

*** cepas probióticas (*Lactobacillus acidophilus* NCFM e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019)

Cada formulação foi produzida em triplicata e calculada com base na porção diária estabelecida para o sorvete, que corresponde a 60 ml ou 130 g do produto (ANVISA, 2003).

As combinações de ingredientes e aditivos alimentares para a obtenção de 4 kg de cada formulação do sorvete de graviola (F1 a F4) estão descritas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Ingredientes e respectivas proporções (%) e váriaveis estudadas na produção dos sorvetes (F1 a F4).

Ingredientes (%)	Sorvetes			
	F1	**F2**	**F3**	**F4**
Fixos				
Polpa de graviola [1]	20,00	20,00	20,00	20,00
Leite em pó desnatado [2]	8,00	8,00	8,00	8,00
Sacarose [3]	7,00	7,00	7,00	7,00
Glicose [4]	3,00	3,00	3,00	3,00
Emulsificante Emustab [5]	0,50	0,50	0,50	0,50
Aroma de graviola [6]	0,08	0,08	0,08	0,08
Goma guar [7]	0,08	0,08	0,08	0,08
Goma xantana [8]	0,08	0,08	0,08	0,08
Goma carragena [9]	0,03	0,03	0,03	0,03
Lactobacillus acidophilus NCFM [10]	0,08	0,08	0,08	0,08
Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* HN019 [11]	0,08	0,08	0,08	0,08
Água	49,07	42,07	53,57	47,57
Variáveis				
Creme de leite (25% gordura láctea) *	12,00	12,00	6,00	6,00
WPC **	0,00	0,00	1,50	1,50
Inulina ***	0,00	6,00	0,00	6,00
Total	100,00	100,00	100,00	100,00

[1](*Annona muricata* L., IceFruit-Maisa, Tatuí-SP, Brasi); [2] Leite Molico, Nestlé, Araçatuba - SP, Brasil; [3] Açúcar União, Coopersucar, Limeira-SP, Brasil; [4] NUTRE, São Paulo-SP, Brasil; [5]Emulsificante (monoglicerídeos de ácidos graxos destilados, monoestearato de sorbitana, polioxietileno de monoestearato de sorbitana, Duas Rodas, Jaraguá do Sul-SC, Brasil; [6] Givaudan (Genebra, Suíça); [7,8,9] DuPont Danisco, Redhill, Reino Unido; [10,11] Culturas probióticas liofilizadas DVS (*Direct Set Vat*, DuPont Danisco, Redhill, Reino Unido); * 12% e 6% de creme de leite esterilizado (Nestlé, Araçatuba - SP, Brasil) contendo 25% de gordura láctea, contribui respectivamente, com 3% e 1,5% de gordura láctea nas formulações acima; ** concentrado proteico de soro do leite - WPC (Simplesse ®, CPKelco, Limeira-SP, Brasil); ** fibra prebiótica inulina Beneo ® GR - (ORAFTI, Oreye – Bélgica).

2.2 Elaboração dos sorvetes

2.2.1 Preparo do inóculo

A produção dos sorvetes iniciou-se com o preparo do pré-inóculo. Para isso, foram reconstituídas porções de 40 mL de leite, de acordo com as instruções do fabricante (20 g do leite em pó desnatado / 200 mL de água filtrada). Essas porções foram esterilizadas em autoclave (121°C/ 15 minutos) e, posteriormente, inoculadas com 0,08% de cada cultura probiótica liofilizadas DVS (*Direct Set Vat)* - *Lactobacillus acidophilus* NCFM e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 (DuPont Danisco, Redhill, Reino Unido) para a ativação, com incubação a 37°C durante 120 minutos.

2.2.2 Produção dos sorvetes

O preparo da calda iniciou-se com a mistura dos ingredientes líquidos, seguida da adição da parte dos ingredientes sólidos. Durante o processamento, para evitar a formação de grumos, as gomas (xantana, guar e carragena) foram previamente misturadas com uma parte do açúcar antes de serem adicionadas à parte líquida da mistura. Em seguida, cada formulação foi transferida para o misturador Geiger UMMSK-12 (Geiger, Pinhais, Brasil) para agitação e aquecimento a 50ºC, por 30 segundos (**Figura 1**). Quando a mistura atingiu 40°C, foi adicionado o leite em pó desnatado, o restante do açúcar e a fibra prebiótica inulina, seguida de mistura por mais 2 minutos (**Figura 1**). Posteriormente, os outros ingredientes foram adicionados à mistura: o creme de leite, o substituto da gordura (WPC) e a glicose, seguido de uma nova mistura no misturador Geiser (UMMSK-12) por 20 minutos (**Figura 1**). Nesta fase, ocorreu a redução dos glóbulos de gordura, com a finalidade de melhorar as características do corpo do sorvete (**Figura 1**). Para atender as normas sanitárias exigidas pela ANVISA para o consumo de gelado comestível, a mistura do sorvete foi pasteurizada a 85°C por 25 segundos. Depois do processo de pasteurização, a mistura foi resfriada até 37°C, para a adição dos pré-inoculos com as culturas probióticas (*L. acidophilus* NCFM e *B. animalis*

subsp. *lactis* HN019). Por último, quando a mistura atingiu a temperatura ambiente, foi adicionada a polpa da fruta (previamente pasteurizada), o emulsificante e o aromatizante (*flavour* de graviola). A massa final foi misturada por mais 15 minutos no misturador Geiger (UMMSK-12) e refrigerada a 4°C, para a maturação entre 20-22h. Após o processo de maturação, a mistura refrigerada foi transferida para a produtora de sorvete (Skymsen BSK-16) e batida durante 15 minutos. Nessa etapa ocorreu a cristalização parcial do sorvete (temp. -3 a -4°C) com a incorporação de ar (*overrun*).

O sorvete parcialmente congelado foi embalado em potes plásticos de 55 ml para alimentos (Tries Aditivos Plásticos, São Paulo, Brasil), selados em seladora (Delgo Nr 1968, Delgo Metalúrgica, Cotia, Brasil) e, finalmente, armazenados por 112 dias a -18 ± 3°C em congelador (Metalfrio, mod. VF50R, São Paulo, Brasil).

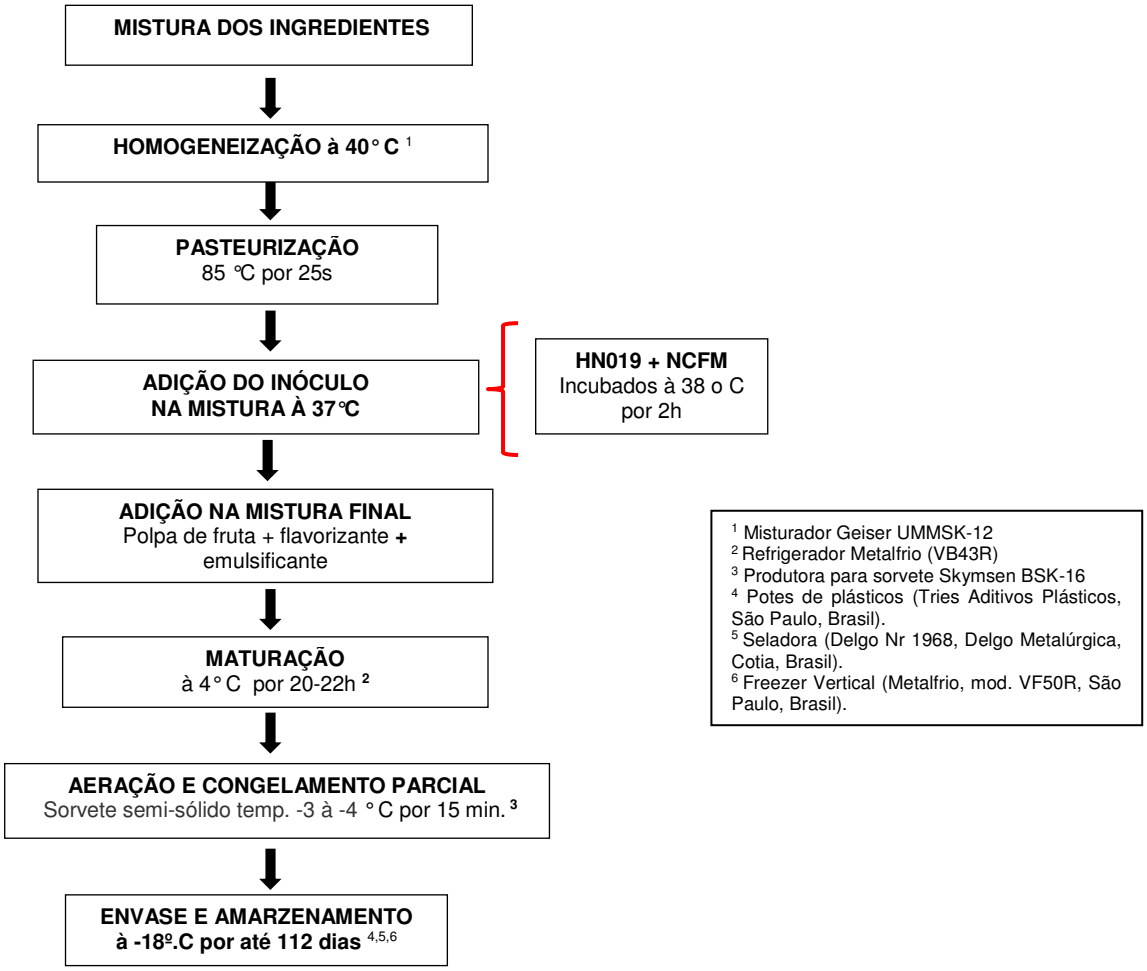


Figura 1. Fluxograma com as principais etapas do processamento das formulações do sorvete de graviola.

2.3 Período de amostragem

As diferentes formulações de sorvete (F1 a F4) foram produzidas em triplicata e armazenadas em congelador a -18±3°C. Amostras dessas produções foram utilizadas para determinação do pH, viabilidade probiótica no produto e a resistência dos probióticos às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*. Essas análises foram realizadas, em duplicata, após 2, 28, 56, 84 e 112 dias de armazenamento. Para verificar os efeitos do processamento sobre as populações de *L. acidophilus* NCFM e *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 também foi analisada a viabilidade probiótica durante a elaboração do produto – dia zero (corresponde ao produto antes do batimento/congelamento, isto é, à calda maturada).

2.4 Determinação de pH e da viabilidade probiótica

Decorridos os dias de armazenamento descritos no item 2.3, os valores de pH dos sorvetes foram determinados com um medidor de pH Orion modelo Three Stars (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, EUA), equipado com eletrodo de penetração para alimentos sólidos e semi-sólidos modelo 2AO4 GF (Analyser, São Paulo, Brasil).

Para a determinação da viabilidade probiótica, porções de 25 g de cada sorvete foram recolhidas em condições assépticas e homogeneizadas com 225 ml de água peptonada 0,1% (w/v), utilizando um homogeneizador Bag Mixer 400 (Interscience, St. Nom, França). Em seguida, foram feitas as diluições decimais seriadas da amostra inicial (10^{-1}) e 1 mL de cada diluição das amostras foi semeado em profundidade (*pour plate*) em meio de cultivo específico para cada microrganismo.

A contagem das populações de *Lactobacillus acidophilus* NCFM foi realizada pela semeadura de cada alíquota em placas estéreis, com posterior adição de ágar De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) formulado com a substituição de glicose por maltose (Difco, Le Pont de Claix, França), de acordo com o International Dairy Federation (IDF, 1995), após 48 horas de incubação (em aerobiose) a 37ºC. Para a determinação das populações do *Bifidobacterium*

animalis subsp. *lactis* HN019, alíquotas das mesmas diluições foram transferidas para placas de Petri estéreis, com posterior adição de ágar MRS-LP, formulado com ágar MRS (Oxoid), suplementado com propionato de sódio (3,0 g/ L, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e cloreto de lítio (2,0 g/ L; Merck, Darmstadt, Alemanha) e, posteriormente, incubadas a 37°C, durante 72 horas, sob condições anaeróbicas (Sistema de anaerobiose Anaerogen, Oxoid), conforme descrito por Lapierre, Undeland e Cox (1992) e Vinderola e Reinheimer (1999, 2000).

2.5 Sobrevivência das culturas probióticas submetidas às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*.

2.5.1 Preparação das culturas probióticas frescas

As culturas frescas de *L. acidophilus* NCFM e *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 (Dupont Danisco) foram semeadas em caldo MRS (Oxoid), a 37°C, por 18 horas, respectivamente, em condições aeróbicas e anaeróbicas (Anaerogen, Oxoid). Posteriormente, as células probióticas foram suspensas por centrifugação (Sorvall Instruments modelo RC 5C, Wilmington, EUA) a 10.000 rpm, em temperatura de 4°C, durante 10 minutos e, posteriomente, ressuspensas em solução estéril de NaCl 0,5% (w/v). As células ressuspensas foram submetidas ao teste do ensaio *in vitro* e utilizadas como controle, com o objetivo de avaliar a proteção conferida pelas diferentes formulações do sorvete de graviola sobre a sobrevivência de *L. acidophilus* NCFM e *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*, conforme descrito no item 2.5.2.

2.5.2 Determinação da resistência dos probióticos durante a passagem pelo trato gastrointestinal simulado *in vitro*

A avaliação da resistência dos probióticos às condições gastrointestinais – TGI simuladas *in vitro* foi realizada de acordo com o método descrito por Liserre, Ré e Franco (2007) e adaptado por Buriti, Castro e Saad (2010), com o ajuste de pH para 2,5 na fase gástrica e com outras modificações necessárias específicas para o produto avaliado e descritas a seguir.

Para todos os períodos de amostragem (descritos anteriormente), 10 ml de cada amostra do sorvete foram diluídos em NaCl 0,85% (w /v) e transferidos para frascos estéreis (4 etapas do ensaio *in vitro* x triplicata de amostras, totalizando 12 frascos para cada período de armazenamento) e, posteriormente, submetidos ao ensaio in vitro. O mesmo procedimento foi realizado para a determinação de resistência das culturas frescas de *L. acidophilus* NCFM e *B. animalis* subsp. *lactis* HN019.

A fase gástrica (2h) do teste *in vitro* foi realizada com o ajuste de pH entre 2,41-2,70, por adição de HCl (1N) e soluções enzimáticas: 0,1 mL de pepsina (Pepsin from Porcine Stomach Mucosa, Sigma-Aldrich Co., LTD. St. Louis, MO, EUA) e de 0,01 mL de lipase (Amano Lipase from *Penicillium camemberti*, Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, EUA). Essas soluções foram previamente diluídas em NaCl 0,85% (w/v) e adicionadas nas amostras para alcançar, respectivamente, as seguintes concentrações: 3 g / L e 1 mg / L. Posteriormente, as amostras foram incubadas a 37ºC, mantendo-se a agitação de 150 rpm por duas horas, em banho metabólico (Dubnoff MA-095, Marconi, Piracicaba, Brasil).

Decorridas as duas horas do ensaio, agora na fase entérica I, as mesmas amostras foram ajustadas para o intervalo de pH entre 5,00 - 5,57 com a adição de bile (Bovine Bile, Sigma, Aldrich) e pancreatina (Pancreatin from Porcine Pancreas, Sigma-Aldrich), previamente dissolvidas em solução alcalina, pH 12 (150 ml de NaOH 1N e 14 g de $PO_4H_2Na.2H_2O$ para 1 L de H_2O destilada), com as respectivas concentrações de 10 g/ L e 0,1 g/L, e novamente incubadas a 37ºC, mantendo-se sob agitação de 150 rpm por mais duas horas.

Para a próxima etapa, que consistiu na fase entérica II, elevou-se o pH das amostras para o intervalo entre 7,01-7,38, com a adição de bile e pancreatina, também previamente diluídas, conforme descrito para a fase entérica I. Essas amostras foram, mais uma vez, incubadas por mais 2 horas a 37ºC, mantendo-se sob agitação de 150 rpm, até a finalização das 6 horas do ensaio *in vitro*.

A contagem de *L. acidophilus* (NCFM) e de *B. animalis* subsp. *lactis* (HN019) sobreviventes às fases TGI simuladas *in vitro* foi realizada com as alíquotas das diluições das amostras, após 0, 2, 4 e 6h que, em seguida, foram semeadas em ágar MRS modificado, com substituição da glicose por maltose (IDF, 1995) e ágar MRS-LP (LAPIERRE et al., 1992; VINDEROLA; REINHEIMER, 1999, 2000), conforme descrito anteriormente, no item 2.4.

2.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. As comparações entre os períodos de armazenamento para cada formulação e entre as formulações para os diferentes períodos de armazenamento foram realizadas através de análises de variância (ANOVA), seguidos do teste de médias de Tukey, após a confirmação da homogeneidade de variâncias. A homogeneidade de variâncias entre as formulações e os diferentes períodos de armazenamento (dias) foi avaliada através do teste de Levene. Nos casos de heterogeneidade de variâncias, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do procedimento de comparação múltipla de Dunn, para as formulações, e o teste de Friedman, para os períodos de armazenamento. O software estatístico utilizado na análise foi o XLSTAT 2013 (Addinsoft, USA) e o nível de confiança adotado nas análises foi de 95%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Valores de pH e viabilidade probiótica

Os valores de pH obtidos para as diferentes formulações do sorvete durante todo armazenamento (112 dias), estão apresentados na **Tabela 3**. O dia zero corresponde ao produto antes do batimento/congelamento, isto é, à calda maturada. Os dias posteriores avaliados correspondem ao sorvete congelado e armazenado em congelador a -18 ± 3°C.

Tabela 3. Valores de pH (Médias ± desvio padrão para n=6), durante a produção e o armazenamento dos sorvetes por até 112 dias a -18 ± 3°C.

Dias*	Sorvetes			
	F1	F2	F3	F4
0	5,53 ± 0,05 ^{Ca}	5,65 ± 0,06 ^{Ba}	5,88 ± 0,04 ^{Aa}	5,72 ± 0,03 ^{Ba}
2	5,54 ± 0,06 ^{Ca}	5,69 ± 0,13 ^{Ba}	5,85 ± 0,07 ^{Aa}	5,67 ± 0,04 ^{Ba}
28	5,46 ± 0,14 ^{Ba}	5,59 ± 0,02 ^{Ba}	5,84 ± 0,05 ^{Aa}	5,70 ± 0,03 ^{ABa}
56	5,52 ± 0,13 ^{Ca}	5,63 ± 0,08 ^{BCa}	5,81 ± 0,05 ^{Aa}	5,68 ± 0,05 ^{Ba}
84	5,50 ± 0,10 ^{Ca}	5,64 ± 0,04 ^{Ba}	5,84 ± 0,07 ^{Aa}	5,72 ± 0,04 ^{Ba}
112	5,53 ± 0.10 ^{Ca}	5,62 ± 0,02 ^{BCa}	5,87 ± 0,05 ^{Aa}	5,72 ± 0,04 ^{Ba}

* Dias correspondem aos períodos de armazenamento das diferentes formulações do sorvete de graviola mantidas a -18 °C

^{A,B,C} Letras maiúsculas sobrescritas distintas em uma mesma linha indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre os diferentes sorvetes estudados no mesmo período de armazenamento. ^{a} Letra minúscula sobrescrita em uma mesma coluna indica que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os diferentes períodos estudados para um mesmo sorvete. **F1-controle (- inulina, - WPC); F2 (+ Inulina, - WPC); F3 (- inulina, + WPC) e F4 (+ inulina, + WPC).**

As diferentes formulações do sorvete de graviola apresentaram valores médios de pH entre 5,46 - 5,88, sem manifestar diferenças significativas ao longo do armazenamento ($p<0,05$). Em produtos probióticos congelados, a estabilidade do pH durante o armazenamento é esperada, uma vez que a multiplicação e o metabolismo desses microrganismos presentes no alimento são reduzidas, impossibilitando uma possível pós acidificação do produto

durante a vida de prateleira (MARSHALL, 2001). Semelhantemente, os pesquisadores Nousia, Androulakis e Fletouris (2011) também observaram o mesmo comportamento para os sorvetes formulados com *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 mantidos congelados entre -15ºC e -25ºC, por até 45 semanas ($p>0,05$). Nesse sentido, como nenhuma das formulações do sorvete funcional reduzido de gordura passou pela etapa de fermentação, a incorporação da polpa de graviola (pH 3,62±0,04) pode ter influenciado nos valores de pH observados das formulações do sorvete funcional.

Ao avaliar a influência da adição de inulina (I) e da substituição parcial da gordura láctea (G) pelo concentrado proteico de soro de leite (WPC) sobre o pH dos diferentes sorvetes de graviola, observou-se que as formulações F3 e F4 obtiveram as maiores médias de pH ($p<0,05$). Possivelmente, essas variações de pH entre os tratamentos são decorrentes do teor de sólidos de origem não-lipídica, com destaque para a adição do WPC. O mesmo comportamento foi observado nas musses simbióticos de goiaba desenvolvidas por Buriti, Castro e Saad (2010). As musses com adição de 4% de WPC mantidas no congelador (-18ºC) apresentaram médias de pH significativamente maiores em relação aos demais tratamentos ($p<0,05$). Segundo Antunes, Casetto e Bolini (2005), a presença de proteínas e fosfatos no WPC pode resultar no aumento da capacidade de tamponamento no meio na qual foi adicionado o ingrediente proteico. Esse fato explicaria as médias de pH observadas nos sorvetes adicionados de WPC desse estudo.

A viabilidade do microrganismo probiótico em um produto probiótico é um pré-requisito essencial para a sua funcionalidade no organismo (BASYIGIT; KULEASAN; KARAHAN, 2006; NOUSIA; ANDROULAKIS; FLETOURIS, 2011) e deve ser mantida desde a fabricação do produto (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008). No entanto, durante o processamento do sorvete e, principalmente, na etapa de congelamento simultânea à incorporação de ar (*overrun*) poderá ocorrer uma redução de até 1 log UFC/g na população probiótica no produto (CRUZ et al., 2011; MOHAMMADI et al., 2011).

Nesse sentido, no presente trabalho, foi avaliada a viabilidade probiótica das diferentes formulações (F1 a F4) na etapa de congelamento do sorvete, que correspondeu ao dia zero 0 (durante a produção dos sorvetes). Nessa etapa, as populações de *L. acidophilus* NCFM e de *B. animalis* subsp. *lactis*

HN019 apresentaram, respectivamente, um declínio de até 0,27 e 0,24 log UFC/g entre as formulações do sorvete de graviola **Tabela 4.**

Um pequeno declínio na contagem bacteriana durante o processamento de sorvetes probióticos também foi observado por Abghari, Sheikh-Zeinoddin e Soleimanian-Zad (2011). Os sorvetes não fermentados e adicionados de cepas de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus rhamnosus* desenvolvidos pelos pesquisadores apresentaram, respectivamente, um decréscimo de 0,28 e de 0,33 log UFC/g, após a obtenção do *overrun* dos sorvetes. Durante o processo de batimento/congelamento do sorvete, a incorporação de ar no produto pode resultar em toxicidade para a maioria das cepas de *Lactobacillus* e, principalmente, para as cepas de *Bifidobacterium* spp. (TALWALKAR; KAILASAPATHY, 2004; CHAMPAGNE; GARDNER, 2005; KAWASAKI et al., 2006; MORTAZAVIAN; SOHRABVANDI, 2006; CRUZ; FARIA; VAN DENDER, 2007; CRUZ et al., 2009; VASILJEVIC; SHAH, 2008). As referidas bactérias, habitantes naturais do intestino humano, são, respectivamente, microaerofílicas e anaeróbicas estritas (TALWALKAR; KAILASAPATHY, 2004). Elas apresentam redução incompleta do oxigênio, com formação de metabólitos tóxicos, como o peróxido de hidrogênio (CHAMPAGNE; GARDNER, 2005; CRUZ; FARIA; VAN DENDER, 2007).

Outros autores, como Magariños et al. (2007), também observaram redução da viabilidade probiótica após a etapa de congelamento e aeração do sorvete. As populações de *L. acidoplilus* La-5 e de *Bifidobacterium* cepa Bb-12 dos sorvetes, desenvolvidos com 4% de gordura, reduziram, respectivamente, 0,6 e 0,75 log UFC/g.

No entanto, é importante destacar que durante a produção do sorvete podem ocorrer outros fatores, como as tensões mecânicas, a condensação de solutos e a formação de cristais de gelo, que também podem ocasionar danos às células probióticas (HOMAYOUNI et al., 2008; MOHAMMADI et al., 2011).

Tabela 4. Viabilidade (média ± desvio padrão para n=6) de *Lactobacillus acidophilus* NCFM e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 (log UFC/g) nas formulações de sorvete de graviola estudadas aos diferentes períodos (dias) de armazenamento -18±3ºC.

Cepa	Dias*	Sorvetes			
		F1	F2	F3	F4
NCFM	0	8,45 ± 0,04 ^{Aa}	8,38 ± 0,03 ^{ABa}	8,34 ± 0,10 ^{Ba}	8,36 ± 0,06 ^{ABa}
	2	8,31 ± 0,16 ^{Aab}	8,21 ± 0,08 ^{Aab}	8,07 ± 0,27 ^{Aab}	8,28 ± 0,06 ^{Aab}
	28	8,21 ± 0,15 ^{Aab}	8,16 ± 0,11 ^{Abc}	8,17 ± 0,14 ^{Aab}	8,26 ± 0,04 ^{Aab}
	56	8,22 ± 0,06 ^{Aab}	8,15 ± 0,07 ^{Abc}	8,13 ± 0,13 ^{Aab}	8,23 ± 0,02 ^{Abc}
	84	8,08 ± 0,19 ^{Ab}	8,07 ± 0,14 ^{Abc}	8,05 ± 0,15 ^{Aab}	8,19 ± 0,08 ^{Abc}
	112	8,12 ± 0.21 ^{Ab}	8,02 ± 0,12 ^{ABc}	7,88 ± 0,16 ^{Bb}	8,12 ± 0,09 ^{Ac}
HN019	0	8,38 ± 0,05 ^{Aa}	8,40 ± 0,06 ^{Aa}	8,43 ± 0,07 ^{Aa}	8,35 ± 0,07 ^{Aa}
	2	8,24 ± 0,19 ^{Aa}	8,19 ± 0,09 ^{Ab}	8,19 ± 0,07 ^{Ab}	8,24 ± 0,08 ^{Aab}
	28	8,15 ± 0,21 ^{Aa}	8,20 ± 0,06 ^{Ab}	8,23 ± 0,09 ^{Ab}	8,19 ± 0,06 ^{Abc}
	56	8,09 ± 0,21 ^{Aa}	8,19 ± 0,04 ^{Ab}	8,16 ± 0,10 ^{Abc}	8,18 ± 0,05 ^{Abc}
	84	8,02 ± 0,32 ^{Aa}	8,09 ± 0,09 ^{Ab}	8,09 ± 0,08 ^{Abc}	8,10 ± 0,04 ^{Ac}
	112	7,99 ± 0,34 ^{Aa}	8,09 ± 0,13 ^{Ab}	8,01 ± 0,13 ^{Ac}	8,11 ± 0,12 ^{Abc}

* Dias correspondem aos períodos de armazenamento das diferentes formulações do sorvete de graviola mantidas a -18 ºC

^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas distintas em uma mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes sorvetes estudados no mesmo período de armazenamento. ^{a,b,c} Letras minúsculas sobrescritas distintas em uma mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes períodos estudados para um mesmo sorvete. **F1-controle (- inulina, - WPC); F2 (+ Inulina, - WPC); F3 (- inulina, + WPC) e F4 (+ inulina, + WPC).**

Até o final do armazenamento, a viabilidade de *L. acidophilus* NCFM e de *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 permaneceu superior a 7,88 log UFC/g nas diferentes formulações de sorvete de graviola, atendendo, desta forma, a exigência da ANVISA, que estabelece para a porção diária de um produto probiótico, uma contagem mínima de 8 a 9 log de UFC de células viáveis (ANVISA, 2008). Desta forma, levando-se em conta que a porção do sorvete corresponde a 60 g, o produto desenvolvido pode oferecer em torno de 10 log UFC por porção (1 bola) **Tabela 4.**

A viabilidade probiótica observada nos sorvetes de graviola foi superior aos valores obtidos por Akalin e Erisir (2008), em sorvete simbiótico com 4% de gordura e armazenados a -18°C por 90 dias. Esses pesquisadores observaram uma contagem de 10^6 UFC/g de La-5 e de Bb-12 ao final de vida de prateleira.

Confirmando que os sorvetes, inclusive aqueles reduzidos de gordura, podem ser bons veículos de culturas probióticas, semelhantemente os pesquisadores Alamprese et al. (2002) estudaram a influência de *Lactobacillus johnsonii* La1 em diferentes formulações de sorvete probiótico, com variações nas quantidades de açúcar (15 a 22%) e de gordura (5 e 10%). Esses autores observaram elevadas taxas de sobrevivência dos probióticos durante o armazenamento de 8 meses, sem decréscimo significativo na população inicial de armazenamento de 7 log UFC/g ($p > 0,05$).

Apesar das variações médias de viabilidade probiótica observadas ao longo do armazenamento ($p < 0,05$), a presença de inulina ou WPC, bem como a combinação desses dois ingredientes, não influenciaram na viabilidade dos probióticos. Esse fato ocorre em virtude dessas variações nas populações de *L. acidophilus* NCFM e de *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 terem sido bem inferiores a 0,2 log UFC/g e, portanto, de pouca importância microbiológica, uma vez que é inerente à análise laboratorial realizada.

3.2 Sobrevivência de *L. acidophilus* NCFM e *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*.

O trabalho proposto também avaliou a resistência de *Lactobacillus acidophilus* NCFM e de *Bifidobacterium lactis* HN019 incorporados às diferentes formulações de sorvete funcional frente às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, durante o armazenamento dos sorvetes a -18±3°C por até 112 dias. Os resultados obtidos fornecem informações importantes sobre a adição do prebiótico inulina e do concentrado proteico (WPC), como também sobre a possível interação destes na resistência dos probióticos durante a passagem pelo trato gastrointestinal - TGI (**Figura 3** e **4**).

Para avaliar a influência da matriz do sorvete sobre a resistência dos probióticos durante a passagem pelo TGI simulado *in vitro,* foi realizado também o teste de resistência das culturas frescas de *L. acidophilus* NCFM e *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 às condições da fase gástrica e entéricas (I e II) simuladas *in vitro* (**Figura 2**).

A fase gástrica consiste em uma primeira barreira a ser superada por microrganismos probióticos, uma vez que essa fase, que se encontra em baixo pH, representa um mecanismo de defesa humano contra possíveis patógenos. Assim, acredita-se que a capacidade dos probióticos resistirem ao ambiente ácido na fase gástrica pode ser atribuída à presença de gradiente constante entre o pH extracelular e o pH citoplasmático. Este, por sua vez, se deve à presença da enzima H^+-ATPase, a qual é utilizada por esses microrganismos para manter a homeostase do pH intracelular (CORCORAN et al., 2005). No entanto, no momento em que o pH interno atinge o valor limite, as funções celulares são inibidas e a célula morre (MIWA et al., 2001).

Alguns trabalhos têm atribuído à atividade da enzima H^+-ATPase um mecanismo importante na resposta à tolerância ao pH baixo em algumas bactérias láticas (COLLADO; SANZ, 2007; AZCARATE-PERIL et al., 2004; CHEN et al., 2009).

Nas fases entéricas, a resistência dos probióticos está associada à sua capacidade em resistir aos ácidos e sais biliares. A bile é um detergente biológico que emusifica e solubiliza os lipídeos, desempenhando um papel essencial na digestão das gorduras. Esta propriedade detergente da bile também confere uma potente atividade antimicrobiana, capaz de perturbar a homeostase celular, afetando os fosfolipídeos e as proteínas da membrana plasmática das bactérias (BEGLEY; HILL; GAHAN, 2006; BOTES; VAN REENEN; DICKS, 2008). No entanto, alguns gêneros bacterianos possuem a capacidade de produzir hidrolase do grupo dos sais biliares (HBS), uma enzima necessária para hidrolizar esses sais (BEGLEY; HILL; GAHAN, 2006).

No ensaio *in vitro* das culturas frescas, as populações de *L. acidophilus* NCFM, ao serem submetidas ao estresse ácido (pH 2,5) da fase gástrica (2h), apresentaram uma redução média de 5,05 log UFC/mL. Após a adição dos sucos entéricos contendo bile e pancreatina, a redução de células probióticas aumentou para 7,2 UFC/mL no final do ensaio (**Figura 2**). Esses resultados estão próximos aos observados pelos pesquisadores Ding e Shah (2007) que, ao avaliarem a sobrevivência de diferentes estirpes probióticas frescas e encapsuladas, incluindo *L. acidophilus* NCFM, observaram que a cepa fresca de *L. acidophilus* NCFM apresentou uma redução de até 6,01 log, quando exposta ao pH 2,0 por 120 minutos. Quando *L. acidophilus* NCFM foi

submetida a 3% de bile conjugado e desconjugado (fase entérica), houve uma redução de até 4 log, após 4 horas de ensaio *in vitro*. Dessa forma, outros autores, como Sanders e Klaenhammer (2001), destacaram que o consumo de lactobacilos, inclusive de *Lactobacillus acidophilus* (NCFM), deve ser feito juntamente com um alimento ou leite, para que favoreça uma maior sobrevivência destes ao TGI *in vivo*. No entanto, é importante destacar que a sobrevivência de bactérias láticas dentro do estômago humano deve estar principalmente relacionada com o pH, o qual pode variar amplamente entre os indivíduos.

Submetida ao mesmo ensaio *in vitro*, a cultura fresca de *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 apresentou uma melhor sobrevivência em relação a *L. acidophilus* NCFM. Nas condições ácidas da fase gástrica (2h), as populações da mesma cepa reduziram, em média, 2,41 log UFC / mL e, após o final do ensaio *in vitro* (fase entérica II, 6h), houve uma redução total de 5,04 UFC / mL (**Figura 2**).

A resistência da cepa pura de *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 às condições de pH ácido e às altas concentrações de bile foi anteriormente estudada pelos pesquisadores Prasad et al. (1999). Segundo os pesquisadores, o probiótico apresentou 80% de sobrevivência ao ser submetido ao pH 3,0, com incubação por 3 horas. Por outro lado, quando submetido a 1% de Oxgall (bile bovina) em caldo MRS, teve uma queda de apenas 0,2 UFC / mL. Esses resultados, assim como aqueles observados no presente trabalho, são surpreendentes, uma vez que a capacidade de superar o baixo pH durante a fase gástrica tem sido mais associada a lactobacilos do que bifidobactérias (LO CURTO et al., 2011; CHEN et al., 2009; CORORAN et al., 2005).

Para os pesquisadores Matsumoto, Ohishi e Benno (2004), algumas cepas de *Bifidobacterium lactis* e de *Bifidobacterium animalis* conseguem aumentar a síntese de H^+-ATPase como resposta adaptativa ao estresse ácido, quando submetidas aos diferentes níveis de pH (3-5), durante 3 horas de ensaio. Adicionalmente, no estudo de Mättö et al. (2006), os pesquisadores observaram que a presença de pepsina na concentração de 1,5 a 3 g/L, utilizada durante a fase gástrica com pH 2,0 e 2,5, auxiliou na sobrevivência das células de *B. animalis* subsp. *lactis* E2010, dando suporte ao papel da

H^+-ATPase, através da regeneração de ATP necessário para a expulsão de H^+ do interior da célula, mantendo, assim, a homeostase do pH intracelular da cepa. Diante disso, no presente trabalho, a resistência observada para *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 no ensaio *in vitro* pode ser atribuída à presença de pepsina na concentração de 3g/L, utilizada na etapa gástrica (2h).

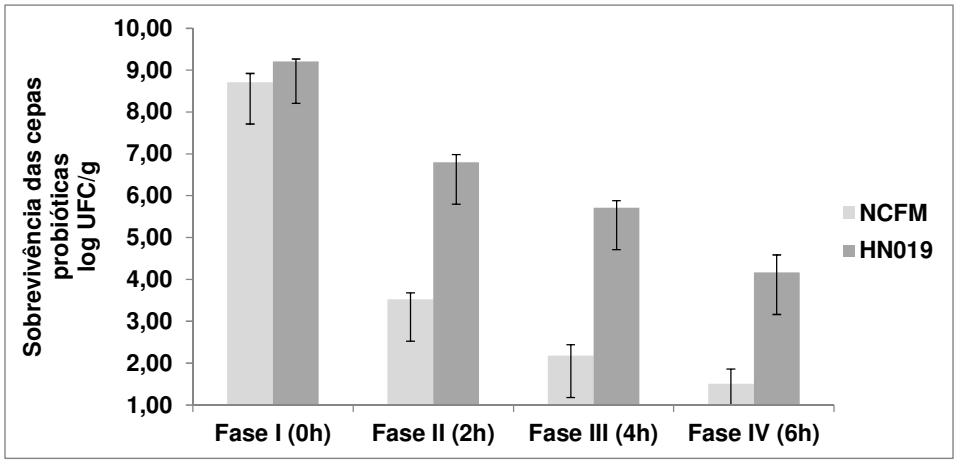


Figura 2 - Sobrevivência das culturas frescas de *L. acidophilus* NCFM e *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 submetidas ao teste de resistência gastrointestinal - TGI simulado *in vitro.*

A matriz alimentícia apresenta-se como um fator de grande importância na proteção dos microrganismos probióticos durante a passagem pelo sistema gastrointestinal - TGI. Essa proteção pôde ser observada para os probióticos adicionados às diferentes formulações do sorvete de graviola que apresentaram uma melhor sobrevivência às condições adversas do TGI simulado *in vitro* (**Figuras 3** e **4**).

Nos resultados obtidos do ensaio *in vitro* dos diferentes sorvetes de graviola, a cepa *L. acidophilus* NCFM, após adição de HCl e pepsina (fase gástrica, 2h), apresentou uma sobrevivência média entre 61,78 e 64,04%. Já, quando submetida às fases entéricas I e II, contendo bile e pancreatina, a sua sobrevivência média final variou entre 40,99 e 45,92% (**Tabela 5**).

Para a cepa de *L. acidophilus* NCFM, foi observada uma elevada sensibilidade à partir da fase gástrica (2h), na qual as populações de *L. acidophilus* NCFM reduziram em até 2,83 log UFC/ g (T4, 112º dia de armazenamento, **Figura 3**). Em outro trabalho, também foi observada a mesma

sensibilidade para a cepa de *Lactobacillus acidophilus* La-5 durante a fase gástrica (BURITI; CASTRO; SAAD, 2010). Nas musses de goiaba refrigeradas e congeladas desenvolvidas por esses pesquisadores, as populações de La-5 reduziram pelo menos 3 log na primeira meia hora do ensaio *in vitro*. Entretanto, deve ser salientado que o pH da fase gástrica empregada pelos autores foi de cerca de 2,0, portanto inferior.

Diferentemente, a cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 frente às condições do TGI *in vitro* apresentou uma excelente viabilidade probiótica, com média de sobrevivência acima de 96,23% na fase gástrica (2h) e após o final do ensaio (6h), mantendo-se com sobrevivência média superior a 90,58%. A redução máxima observada ao longo de todo o ensaio *in vitro* foi de apenas 1,2 log UFC/g (F4, 6h, 112º dia de armazenamento) (**Tabela 6** e **Figura 4).**

Corroborando com esses resultados, no estudo de Bedani, Rossi e Saad (2013) foi observada uma maior resistência de *Bifidobacterium* Bb-12 em relação ao *Lactobacillus* La-5, quando submetidos às mesmas condições do TGI *in vitro*. Nas formulações da bebida de soja fermentada com cultura ABT-4 estudada pelos pesquisadores, a sobrevivência da bifidobactéria aos sucos gastrointestinais artificiais foi maior em relação ao lactobacilo, uma vez que as populações de Bb -12 e La- 5 diminuíram, respectivamente, 0,6 log UFC/ g e 3,8 log UFC / g, durante os 28 dias de armazenamento refrigerado do produto.

Embora, no presente trabalho, a cepa de *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 tenha apresentado excelente sobrevivência às condições do TGI simuladas *in vitro,* é importante destacar que essa resistência pode estar relacionada às características intrínsecas do próprio microrganismo ou ao resultado da ação conjunta com a matriz alimentícia escolhida que, neste caso, foi o sorvete de graviola.

Como podemos observar no trabalho de Ranadheera et al. (2012), as cepas de La-5 e Bb-12 do sorvete de leite de cabra estudada pelos pesquisadores, ao serem submetidas ao ensaio *in vitro*, apresentaram médias de sobrevivência diferentes aos dos trabalhos citados anteriormente. Os autores relataram que as populações de La-5, quando expostas ao pH 2,0 por 180 minutos, tiveram uma redução de 3,56 log UFC/g, enquanto que a cepa Bb-12 reduziu em 2,82 log UFC/g. Ao serem submetidos a 0,3% de sais biliares

por 240 minutos, esses microrganismos, La-5 e Bb-12, apresentaram, respectivamente, um declínio de 1,59 e de 2,21 log UFC/g.

A partir dessas observações, segundo Buriti, Castro e Saad (2010), alguns microrganismos, quando submetidos a um estresse inicial (por exemplo: calor, frio, acidez), as células sobreviventes podem tolerar melhor um ambiente posterior desfavorável. Essa adaptação do microrganismo ao estresse adquirido tem sido ultimamente explorada como forma de melhorar a sobrevivência de cepas probióticas, inclusive das bifidobactérias nas condições adversas encontradas durante o processamento tecnológico ou do trato gastrointestinal (COLLADO; SANZ, 2006). Diante disso, no presente estudo, o estresse inicial ocorrido durante o congelamento do sorvete pode também ter influenciado na resistência do *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 durante o ensaio *in vitro*.

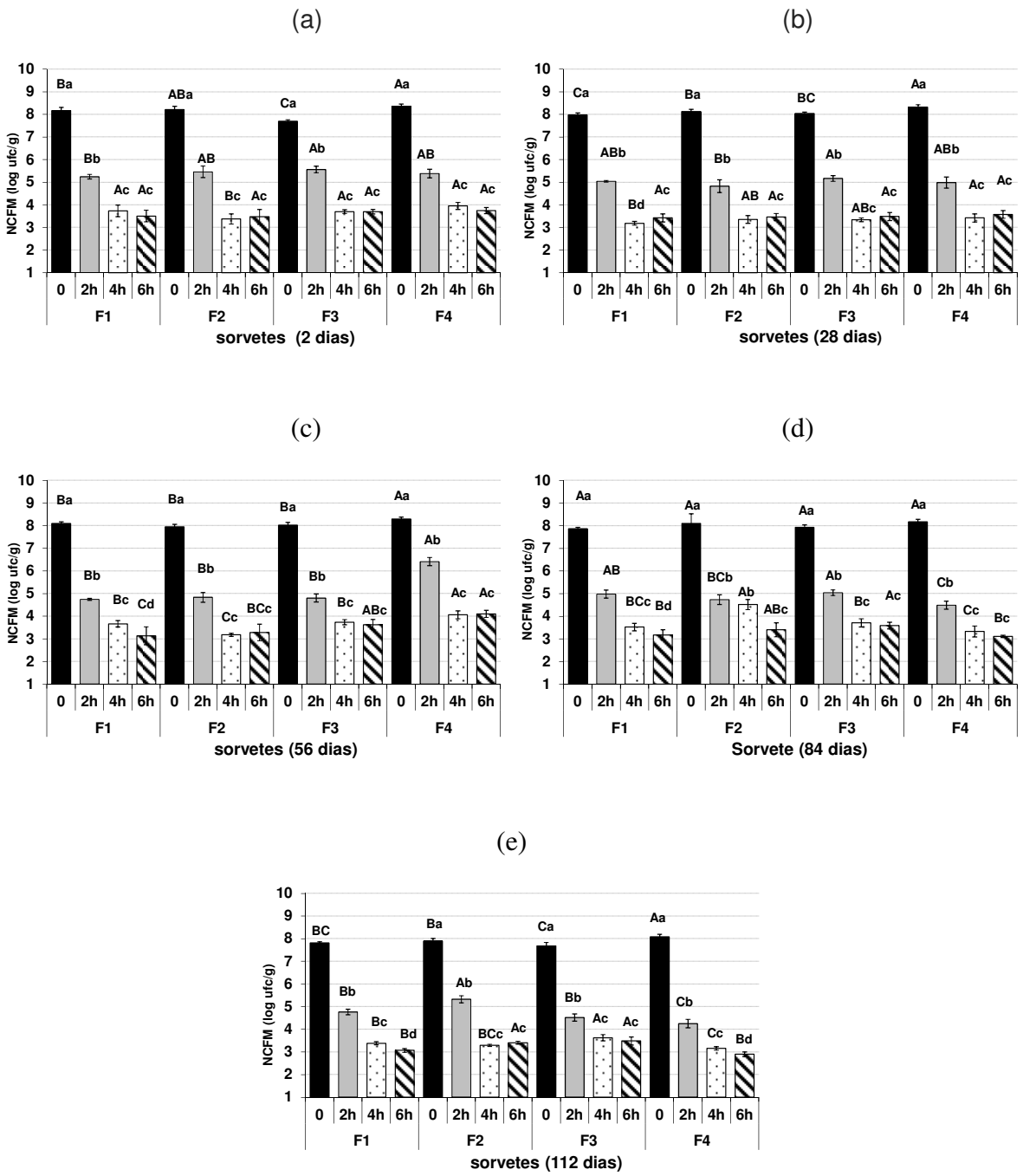


Figura 3 (a, b, c, d, e). Sobrevivência de ***L. acidophilus* NCFM** nas formulações de sorvete (F1 a F4) durante o armazenamento -18±3ºC por até 112 dias, no produto antes de ser consumido, tempo 0 (■) e durante as diferentes fases do trânsito gastrointestinal simulado *in vitro*: fase gástrica 2h (▢) e condições entéricas, 4h (⊡) e 6h (▧). [A,B,C] Letras maiúsculas distintas sobrescritas indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes sorvetes estudados no mesmo período de armazenamento.[a,b,c,d] Letras minúsculas distintas sobrescritas indicam diferenças significativas (p>0,05) entre os diferentes períodos estudados para um mesmo sorvete. **F1-controle (- inulina, - WPC); F2 (+ inulina, - WPC); F3 (- inulina, + WPC) e F4 (+ inulina, + WPC).**

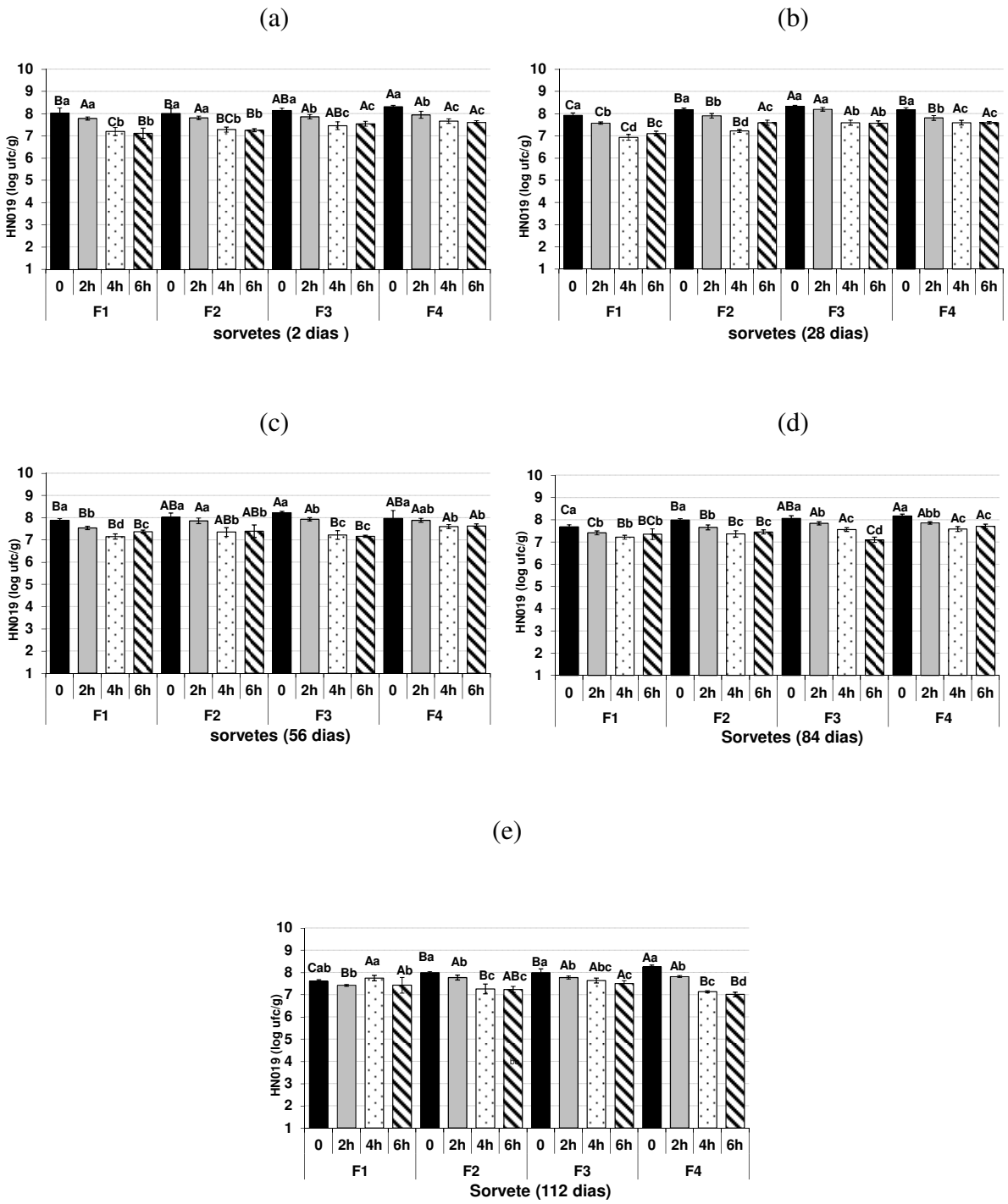


Figura 4 (a, b, c, d, e). Sobrevivência de ***B. animalis* subsp. *lactis* HN019** nas formulações de sorvete (F1 a F4) durante o armazenamentode -18±3º.C por até 112 dias, no produto antes de ser consumido, tempo 0 (■) e durante diferentes fases do trânsito gastrointestinal simulado *in vitro*: fase gástrica 2h (▒) e condições entéricas, 4h (⁘) e 6h (▨). [A,B,C] Letras maiúsculas distintas sobrescritas indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes sorvetes estudados no mesmo período de armazenamento.[a,b,c,d] Letras minúsculas distintas sobrescritas indicam diferenças significativas (p>0,05) entre os diferentes períodos estudados para um mesmo sorvete. **F1-controle (- inulina, - WPC); F2 (+ Inulina, - WPC); F3 (- inulina, + WPC) e F4 (+ inulina, +WPC).**

Tabela 5. Taxa de sobrevivência (%) de *L. acidophilus* NCFM frente às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, incorporados às formulações de sorvete de graviola e reduzido de gordura (F1 a F4), durante o armazenamento de 112 dias a -18±3ºC.

Fase	Dias*	Sorvetes			
		F1	F2	F3	F4
gástrica (2h)	2	64,20 ± 1,45 ^{Ba}	66,50 ± 3,92 ^{Bab}	72,18 ± 1,50 ^{Aa}	64,33 ± 1,93 ^{Bb}
	28	63,36 ± 0,61 ^{ABab}	58,65 ± 3,61 ^{Cc}	63,87 ± 1,66 ^{Ab}	59,62 ± 2,66 ^{BCc}
	56	58,78 ± 0,86 ^{Cc}	60,98 ± 2,04 ^{Bbc}	61,86 ± 2,71 ^{Bb}	77,43 ± 2,15 ^{Aa}
	84	63,26 ± 2,74 ^{Aab}	58,66 ± 4,59 ^{ABc}	63,56 ± 1,79 ^{Ab}	54,94 ± 2,53 ^{Bd}
	112	60,91 ± 1,77 ^{Bbc}	67,47 ± 2,43 ^{Aa}	58,73 ± 1,34 ^{Bc}	52,60 ± 2,93 ^{Cd}
entérica II (6h)	2	42,90 ± 2,82 ^{Ba}	42,20 ± 3,38 ^{Ba}	47,95 ± 1,46 ^{Aa}	44,77 ± 1,97 ^{ABb}
	28	43,38 ± 2,59 ^{Aa}	42,98 ± 2,17 ^{Aa}	43,45 ± 2,00 ^{Ab}	43,08 ± 2,18 ^{Ab}
	56	39,08 ± 4,84 ^{Ca}	41,98 ± 4,85 ^{BCa}	47,61 ± 2,56 ^{ABab}	49,41 ± 1,56 ^{Aa}
	84	40,39 ± 2,70 ^{Ba}	42,01 ± 3,30 ^{ABa}	45,27 ± 2,39 ^{Aab}	38,08 ± 0,70 ^{Bc}
	112	39,19 ± 1,17 ^{Ba}	43,16 ± 0,98 ^{Aa}	45,34 ± 3,20 ^{Aab}	35,79 ± 1,13 ^{Cc}

* Dias correspondem aos períodos de armazenamento das diferentes formulações do sorvete de graviola mantidas a -18 ºC

^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas distintas em uma mesma linha indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre os diferentes sorvetes estudados no mesmo período de armazenamento. ^{a,b,c} Letras minúsculas sobrescritas distintas em uma mesma coluna indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre os diferentes períodos estudados para um mesmo sorvete. **F1-controle (- inulina, - WPC); F2 (+ Inulina, - WPC); F3 (- inulina, + WPC) e F4 (+ inulina, + WPC)**

Tabela 6. Taxa de sobrevivência (%) de *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 frente às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, incorporados às formulações de sorvete de graviola e reduzido de gordura (F1 a F4), durante o armazenamento (dias) a -18±3ºC.

Fase	Dias*	Sorvetes			
		F1	F2	F3	F4
gástrica (2h)	2	97,01 ± 3,60 ^{Aa}	97,67 ± 3,78 ^{Aa}	96,69 ± 1,68 ^{Aa}	95,67 ± 2,30 ^{Aa}
	28	95,64 ± 1,58 ^{Ba}	96,58 ± 1,31 ^{ABa}	98,48 ± 0,95 ^{Aa}	95,56 ± 2,43 ^{Ba}
	56	95,69 ± 1,60 ^{Aa}	97,94 ± 1,30 ^{Aa}	96,35 ± 0,92 ^{Aa}	99,01 ± 5,11 ^{Aa}
	84	96,51 ± 0,79 ^{Aa}	95,92 ± 1,78 ^{Aa}	97,21 ± 1,76 ^{Aa}	96,21 ± 0,65 ^{Aa}
	112	97,57 ± 0,59 ^{Aa}	97,29 ± 1,32 ^{Aa}	97,30 ± 1,92 ^{Aa}	94,70 ± 1,11 ^{Ba}
entérica II (6h)	2	88,66 ± 1,78 ^{Bc}	90,68 ± 2,53 ^{ABa}	92,76 ± 1,91 ^{Aa}	91,52 ± 1,30 ^{ABb}
	28	89,73 ± 0,81 ^{Bbc}	92,79 ± 1,80 ^{Aa}	90,83 ± 1,68 ^{ABab}	92,89 ± 1,62 ^{Aab}
	56	93,60 ± 1,28 ^{Aab}	92,05 ± 2,03 ^{Aa}	87,01 ± 0,89 ^{Bc}	95,74 ± 4,23 ^{Aa}
	84	95,77 ± 3,63 ^{Aa}	93,35 ± 1,53 ^{Aa}	88,04 ± 2,62 ^{Bbc}	94,28 ± 1,78 ^{Aab}
	112	97,60 ± 4,80 ^{Aa}	90,61 ± 1,74 ^{Ba}	93,88 ± 1,70 ^{ABa}	84,91 ± 0,93 ^{Cc}

* Dias correspondem aos periódos de armazenamento das diferentes formulações do sorvete de graviola mantidas à -18 ºC

^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas distintas em uma mesma linha indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre os diferentes sorvetes estudados no mesmo período de armazenamento. ^{a,b,c} Letras minúsculas sobrescritas distintas em uma mesma coluna indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre os diferentes períodos estudados para um mesmo sorvete. **F1-controle (- inulina, - WPC); F2 (+ Inulina, - WPC); F3 (- inulina, + WPC) e F4 (+ inulina, + WPC).**

Entre as formulações estudadas, pôde-se observar, também, o efeito protetor tanto do prebiótico inulina (I) como do concentrado de proteína de soro de leite (WPC) e a combinação desses ingredientes na sobrevivência dos probióticos às condições gastrointestinais - TGI simuladas *in vitro,* durante os diferentes períodos de armazenamento (2, 28, 56, 84 e 112 dias) a -18±3ºC.

A presença de inulina (6%) na formulação F2 contribuiu com o aumento significativo da resistência de *L acidophilus* NCFM durante a fase gástrica (2h) e entérica I (4h), respectivamente, ao 112º e 84º dia de armazenamento do sorvete simbiótico ($p<0,05$). O mesmo comportamento foi observado para *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 após o final do ensaio *in vitro* (fase entérica II, 6h), especificamente ao 28º dia de armazenamento ($p<0,05$) (**Figura 3, 4**). A funcionalidade da inulina no aumento da sobrevivência dos probióticos pode estar relacionada ao seu elevado grau de polimerização por volta de 25 (DP) com alta capacidade de ligar-se água disponível no alimento, formando uma rede de microcristais resistente às enzimas digestivas humanas (BURITI; CASTRO; SAAD, 2010; FRANCK, 2008), podendo contribuir, desta forma, na proteção física dos probióticos ao estresse submetido pelas condições gastrointestinais (SANDERS; MARCOS, 2010).

Ao avaliarmos o efeito do concentrado protéico (WPC) na substituição parcial da gordura láctea na formulação T3 sobre a resistência de *L. acidophilus* NCFM no teste *in vitro*, a presença do ingrediente protéico melhorou significamente a sobrevivência do *Lactobacillus* após a fase entérica II (6h) ao 56º e ao 84º dia de armazenamento ($p<0,05$) (**Figura 3**). O mesmo ingrediente também favoreceu a sobrevivência do probiótico *B. animalis* subsp. *lactis* HN019, após a fase gástrica, particularmente ao 28º E ao 84º dia de armazenamento ($p<0,05$) (**Figura 4**). Segundo alguns autores (AKALIN et al., 2007; RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010), a presença de proteínas e fosfatos nos concentrados de proteínas atuam como tampões, permitindo a manutenção dos valores de pH no produto e, com isso, a sobrevivência de células probióticas em quantidade mais viáveis ao benefício do hospedeiro.

A combinação dos ingredientes WPC e Inulina na formulação F4 aumentou significativamente a sobrevivência de *L. acidophilus* NCFM durante a fase gástrica (2h) e entérica II (4h) ao 56º. dia de armazenamento ($p<0,05$)

(**Figura 3**). Para *B. animalis* subsp. *lactis* HN019, a mesma proteção conferida pela combinação dos dois ingredientes foi significativa até 84º. dia de armazenamento ($p<0,05$), **Figura 4.** Semelhamente, o efeito protetor da combinação desses ingredientes foi observado por Souza (2010) em margarinas probióticas. As formulações adicionadas de inulina e concentrado de caseína (CMP), apresentaram populações de *B. animalis* Bb-12 satisfatórias pelo menos até o 28º dia de armazenamento. No entanto, no sorvete de graviola, a adição do WPC combinado com a inulina teve um efeito negativo no último período de armazenamento (112 dias), para o qual foi possível observar uma redução de até 0,5 log UFC/g em relação ao controle (F1) para *L. acidophilus* NCFM e *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 ($p<0,05$). Uma possível justificativa para esse comportamento seria a ocorrência de mudanças estruturais no produto congelado, devido a uma maior interação desses dois ingredientes (inulina e WPC) no final de vida de prateleira da formulação F4 (112º dia), com ocorrência de injúrias físicas às células probióticas.

Ensaios *in vitro* podem ser úteis, a fim de estimar se a bactéria sobreviveria à passagem pelo TGI. No entanto, a comprovação *in vivo* seria necessária. A extrema complexidade dos sistemas vivos associada à variabilidade de cada indivíduo não conferem aos experimentos *in vitro* a evidência definitiva na validação dos fenômenos probióticos. Somente investigações *in vivo* em humanos são capazes de verificar a eficácia dos probióticos, o que confere mais confiabilidade ao estudo (O'MAY; MACFARLANE et al., 2005).

4. CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que o sorvete probiótico de graviola com redução de gordura apresenta elevada potencialidade como produto funcional, uma vez que as populações de *L. acidophilus* NCFM e de *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 apresentaram viabilidade acima de 10 log/porção diária de 60 g de sorvete.

A adição do prebiótico inulina e a subsituição parcial da gordura láctea pelo concentrado proteico de soro (WPC), como também a combinação desses dois ingredientes, resultaram em efeitos positivos sobre a sobrevivência das bactérias probióticas durante o ensaio *in vitro* para a maioria dos períodos de armazenamento avaliados, com destaque para cepa *B. lactis* HN019, que apresentou sobrevivência média acima de 90% até o final do armazenamento de 112 dias. O sorvete F4, adicionado de 6% de inulina e 1,5% de WPC como substituto parcial da gordura láctea WPC, foi a formulação mais favorável para ser utilizada como veículo das culturas probióticas estudadas, uma vez que, a combinação de inulina e WPC pode agregar maior valor nutricional e funcional ao sorvete probiótico de graviola.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos / ingredientes, substâncias bioativas e probióticos.** 2008 Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 24 mar. 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC nº. 359, de 23 de dezembro de 2003**. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. Disponível em: http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=9058#'. Acesso em: 25 mar. 2013.

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, p.222-227, 2007.

AKALIN, A.S.; ERIŞIR, D. Effects of inulin and oligofructose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic ice cream. **Journal of Food Science**, v.73, n.4, p.184-188, 2008.

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

ANTUNES, A.E.C.; CAZETTO, T.F.; BOLINI, M.A. Viability of probiotic microorganisms during storage, post acidification 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.

AZCARATE-PERIL, M.; ALTERMANN, E.; HOOVER-FITZULA, R.; CANO, R; KLAEN-HAMMER, T. R. Identification and inactivation of genetic loci involved with *Lactobacillus acidophilus* acid tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p. 5315–5322, 2004.

BASYIGIT, G.; KULEASAN, H.; KARAHAN, A.G. Viability of human-derived probiotic lactobacillus in ice cream produced with sucrose and aspartame. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.33, p.796-800, 2006.

BEDANI, R.; ROSSI, E. A.; SAAD, S.M. I Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under in vitro simulated **Gastrointestinal Conditions Food Microbiology**, v.34, p.383-389, 2013.

BEGLEY, M.; HILL, C.; GAHAN, C.G.M. Bile salt hydrolase activity in probiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n. 3, p.1729-1738, 2006.

BOTES, M.; VAN REENEN, C.A.; DICKS, L.M.T. Evaluation of *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 as probiotics using a gastrointestinal model with infant milk formulations as substrate. **International Journal of Food Microbiology**, v.128, p.326–370, 2008.

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

CHAMPAGNE, C.P.; GARDNER, N.J. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, p. 61–84, 2005. (Review).

CHEN, C.C.; CHIU, C.H.; LIN, T.Y.; SHI, H.N.; WALKER, W.A. Effect of Probiotics *Lactobacillus acidophilus* on *Citrobacter rodentium* Colitis: **The Role of Dendritic Cells. Pediatric Research,** v. 65, n.2, p.169-175, 2009.

COLLADO, M.C.; SANZ, Y. Method for direct selection of potentially probiotic Bifidobacterium strains from human feces based on their acid- adaptation ability. **Journal of Microbiology Methods**, v. 66, p.560–563, 2006.

COLLADO, M.C.; SANZ, Y. Induction of acid resistance in *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis:* a mechanism for improving desirable traits of potentially probiotic strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p.1147-1157, 2007.

CORCORAN, B.M.; STANTON, C.; FITZGERALD, G.F.; ROSS, R.P. Survival of probiotic Lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.6, p. 3060-3067, 2005.

CRUZ, A. G.; ANTUNES, A.E.C.; SOUSA, A.L.O.P; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I. Ice cream as a probiotic food carrier. **Food Research International,** v. 42, p.1233-123, 2009

CRUZ, A.G.; ANTUNES, A.E.C.; HARAMI, J.B.; SOUSA, A.L.O.P.; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I. Sorvetes probióticos e prebióticos. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F., Eds. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas.** 1. ed. São Paulo: Livraria Varela, p. 359-388, 2011.

CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F.; VAN DENDER, A.G.F. Packaging system and probiotic dairy foods. **Food Research International,** p.40, p. 725-732, 2007.

DING, W.K.; SHAH, N.P. An Effect of Various Encapsulating Materials on the Stability of Probiotic Bacteria. **Journal of Food Science**, v.74*,* p.100–10*7,* 2009.

FAO, WHO (2006) Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO **Food and Nutrition Paper,** 50p expert consultation on guidelines for the evaluation of probiotics in food. Acessado Jun. de 2013. Disponível no site:http://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf

FRANCK, A. Food Applications of Prebiotcs. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. **Handbook of Prebiotics**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, p.443-445, 2008.

FRANCO, M.R.B., JANZANTTI, N.S. Aroma of minor tropical fruits. ***Flavour* and Fragrance Journal**, v. 20, p.358–371, 2005.

GOFF, H.D; HARTELL, R.W. Ice Cream. 7. ed., editora Springer, 462p, 2013.

HAYNES, I.N.; PLAYNE, M.J. Survival of probiotic cultures in low fat ice cream. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.57, p.10 – 14, 2002.

HOMAYOUNI, A.; AZIZI, A.; EHSANI, M.R.; YARMAND, M.S.; RAZAVI, S.H. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. **Food Chemistry**, v.111, p.50-55, 2008.

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.

KAWASAKI, S.; MIMURA, T.; SATOH, S.; TAKEDA, K.; NIMURA, Y. Response of the microaerophilic *Bifidobacterium* species, *B. boum* and *B. thermolum,* to oxygen. **Applied and environmental microbiology**, v.72, p.6854 – 6858, 2006.

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, p.329-347, 2008.

LAHTINEN, S.J.; FORSSTEN, S.; AAKKO, J.; GRANLUND, L.; RAUTONEN, N.; SALMINEN, S.; VIITANEN, M.; OUWEHAND, A.C. Probiotic cheese containing *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM ® modifies subpopulations of fecal *lactobacilli* and *clostridium difficile* in the elderly. Age (Dordrecht, Netherlands), v.34, p.133 – 143, 2012.

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

LAPIERRE, L.; UNDELAND, P.; COX, L.J. Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.1192 e1196, 1992.

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.

LO CURTO, A.; PITINO, I.; MANDALARI, G.; DAINTY, J.R.; FAULKS, R.M.; WICKHAM, M.S.J. Survival of probiotic *lactobacilli* in the upper gastrointestinal tract using an *in vitro* gastric model of digestion. **Food Microbiology**, v.28, p.1359 e 1366, 2011.

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

MARSHALL, R.T. Frozen desserts. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L., eds. Applied dairy microbiology. 2. ed. **Food science and technology**, New York: Marcel Dekker, 2001. cap.4, p.93-125.

MARTINEZ, R.C.R.; AYNAOU, A.E.; ALBRECHT, S.; SCHOLS, H.A.; DE MARTINIS, E.C.P.; ZOETENDAL, E.G.; VENEMA, K.; SAAD, S.M.I.; SMIDT, H. *In vitro* evaluation of gastrointestinal survival of *Lactobacillus amylovorus* DSM 16698 alone and combined with galactooligosaccharides, milk and/or *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12. **International Journal of Food Microbiology**, v.149 p.152-158, 2011.

MATSUMOTO, M.; OHISHI, H.; BENNO, Y. H+- ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. **International Journal of Food Microbiology**, v.93, p.109–113, 2004.

MÄTTÖ, J.; ALAKOMI, H.L.; VAARI, A.; VIRKAJÄRVI, I.; SAARELA, M. Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. **International Dairy Journal**, v.16, n.9, p.1029-1037, 2006.

MIWA, T.; ABE, T.; FUKUDA, S.; OHKAWARA, S.; HINO, T. Regulation of H+-ATPase synthesis in response to reduced pH in ruminal bacteria. **Current Microbiology**, v.42, p.106–110, 2001.

MOHAMMADI, R.; MORTAZAVIAN, A.M.; KHOSROKHAVAR, R.; CRUZ, A.G. Probiotic ice cream: Viability of probiotic bacteria and sensory properties. **A Review. Annals of Microbiology**, v. 61, p. 411–424, 2011.

MORTAZAVIAN, A.M.; SOHRABVANDI, S. Probiotics and food probiotic products based on **Dairy Probiotic Products**. Eta, Tehran, 2006.

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

O'MAY, G.A.; MACFARLANE, G.T. Health claims associated with probiotics. In: TAMIME, A. Y. **Probiotic Dairy Products**. Oxford, Blackwell Publishing. p.138 – 150, 2005.

PINTO, M.G.V.; FRANZ, C.M.A.P.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W.H. *Lactobacillus ssp*. with *in vitro* probiotic properties from human feces and traditional fermented products. **International Journal of Food Microbiology**, v.109, p. 205–214, 2006.

PRASAD, J.; GILL H.; SMART, J.; GOPAL, P.K. Selection and characterisation of *lactobacillus* and *bifidobacterium* strains for use as probiotics. **International Dairy Journal,** v.8, p.993–1002, 1999.

RANADHEERA, C.S.; EVANS, C.A.; ADAMS, M.C.; BAINES, S.K. *In vitro* analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Research International**, v. 49, p.619-625, 2012.

RANADHEERA, R.D.C.S.; BAINES, S.K.; ADAMS, M.C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v.43, p.1-7, 2010.

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

SANDERS, M.E; MARCO, M. Food formats for effective delivery of probiotics. **Annual Review of Food Science Technology**, v.1, p. 65–85, 2010.

SANDERS, M.E.; KLAENHAMMER, T.R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. American **Dairy Science Association in Savoy**, v.84, p.319-331, 2001.

SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructo-oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, n.16, p. 442-457, 2005.

SCHILLINGER, U.; GUIGAS, C.; HOLZAPFEL, H. *In vitro* adherence and other properties of *lactobacilli* used in probiotic yoghurt-like products. **International Dairy Journal**, v.15, n.12, p.1289-1297, 2005.

SOUZA, C.H.B Desenvolvimento de margarina probiótica e simbiótica viabilidade do probiótico no produto e resistência *in vitro*. Cinthia Hoch Batista de Souza. São Paulo 208 p. Tese (doutorado) Faculdade de Ciências

Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico – Farmacêutica. (2010).

SU, P.; HENRIKSSON, A.; MITCHELL, H. Prebiotics enhance survival and prolong the retention period of specific probiotic inocula in and *in vivo* murine model. **Journal of Applied Microbiology**, n.106, p. 2392-2400, 2007.

TALWALKAR, A.; MILLER, C.W.; KAILASAPATHY, 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, n.6, p.605-611, 2004.

TURGUT, T.; CAKMAKCI, S. Investigation of the possible use of probiotics in ice cream manufacture. **International Journal of Dairy Technology**, v.62, p. 444–451, 2009.

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

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

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

WALLER, P.A.; GOPAL, P.K.; LEYER, G.J.; OUWEHAND, A.C.; REIFER, C.; STEWART, M.E.; MILLER, L.E. Dose-response effect of *Bifidobacterium lactis* HN019 on whole gut transit time and functional gastrointestinal symptoms in adults. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.46, n. 9, p.1057-1064, 2011.

CAPÍTULO 3

Características físico-químicas e aceitação sensorial dos sorvetes probióticos e simbióticos de baixo teor de gordura e adicionados de polpa de fruta de graviola *(Annoma muricata* L*).*

RESUMO:

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da substituição parcial de gordura do leite (G) pelo o concentrado proteico de soro de leite (WPC) e a adição da inulina (I) sobre as propriedades físico-químicas e sensoriais dos sorvetes probióticos e simbióticos de graviola (*Annoma muricata* L). Empregou-se um planejamento fatorial 2^2, para a produção de 4 formulações, em triplicata: F1- controle (- I, - WPC); F2 (+ I, - WPC); F3 (- I, + WPC) e F4 (+ I, + WPC) as quais foram armazenadas e avaliadas por até 112 dias a -18±3ºC. A adição de inulina conduziu ao aumento da dureza instrumental para F2 e F4 no final de armazenamento de 112 dias e para a formulação F3, após o 56º. dia de armazenamento ($p<0,05$). Os resultados mostraram, também, que a presença do WPC e/ ou inulina reduziu a velocidade de derretimento dos sorvetes ao longo do armazenamento ($p<0,05$). No teste de aceitabilidade conduzidos por consumidores, os altos escores médios obtidos (entre 6,8 e 8,0) indicaram que os sorvetes funcionais avaliados foram muito bem aceitos e que não diferiram significativamente durante o armazenamento de até 84 dias. Exceto para F4, a adição do WPC+ I melhorou a sua aceitabilidade após 56º. dia de armazenamento ($p<0,05$). Os resultados obtidos sugerem que a utilização do WPC como substituto parcial da gordura láctea separadamente ou combinada com a inulina pode ser vantajosa no desenvolvimento de sorvete probiótico com baixo teor de gordura, uma vez que a presença desses ingredientes melhorou as características tecnológicas e sensoriais do sorvete funcional reduzido de gordura.

Palavras-chaves: probióticos, prebiótico-, sorvetes, graviola, inulina, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*

ABSTRACT

Sensory acceptability and relatd pfysical features of probiotic and synbiotic low-fat graviola ice-creams.

The influence of partial replacement of milk fat (MF) by whey protein concentrate (WPC) and the addition of the inulin (I) on physical properties and sensory acceptability of the probiotic and synbiotic graviola ice creams was investigated. The ice creams with WPC presented lower hardness in the 7th and 112nd days of frozen storage ($p<0.05$). A 2^2 factorial design was employed and four formulations were produced, in triplicates: F1-control (- I, - WPC), F2 (+ I, - WPC), F3 (- I, + WPC), and F4 (+ I, + WPC). Ice-creams were stored at -18 ± 3 °C and evaluated for up to 112 days.

The addition of inulin led to an incresead hardnes for F2 and F4 at the end of storage of 112 days and for F3 after 56 days of the storage ($p<0.05$). The results also showed that the presence of the WPC and/or inulin reduced the ice-creams melting rates during the whole storage ($p<0.05$). The high mean scores obtained (between 6.8 and 8.0) in the acceptability test indicated that the functional ice-creams evaluated were very well accepted and they did not differ significantly throughout storage of up 84 days. Except for F4, the addition of WPC+I improved the acceptability after the 56th day of frozen storage ($p<0.05$). The results suggest that the use of WPC for the partial replacement of milk fat, separately or combined with inulin, may be advantageous in the development of low-fat synbiotic ice-cream, since the presence of these ingredients improved the technological and sensory features of the low- fat functional ice-cream.

Keywords: probiotics, prebiotic, ice-cream, graviola, inulin, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*.

1. INTRODUÇÃO

Sorvete apresenta uma estrutura semi-sólida constituida por um complexo sistema coloidal (ALVAREZ; WOLTERS; VODOVOTZ, 2005; XINYI et al., 2010). É um produto congelado composto por cristais de gelo, bolhas de ar, glóbulos de gordura agregados e parcialmente coalescidos, todos em fases distintas e cercados por um matriz contínua descongelada constituida por açúcares, proteínas, polissacáridos e sais dissolvidos em água (GOFF, 2002; GOFF, 2008). Apesar das inúmeras vantagens que determinam o sorvete como uma matriz interessante para incorporação de culturas probióticas (MOHAMMADI et al., 2011; CRUZ et al., 2009) a composição de um sorvete tradicional apresenta uma concentração elevada de gordura do leite entre 10 a 12% (GOFF; HARTELL, 2006; GOFF; HARTELL, 2013) o que torna o produto bastante calórico.

Atualmente, existe um grande incentivo para o desenvolvimento de produtos probióticos com baixo teor de calorias. (AKLIN et al., 2007; FRANCK, 2008). Os ingredientes amplamente utilizados como substitutos de gordura - o concentrado proteico do soro de leite e o prebiótico inulina - podem contribuir com mudanças desejáveis sobre a composição química e fatores nutricionais, além de auxiliar na manuntenção de células probióticas durante a vida de prateleira do produto (BURITI et al., 2010; MOHAMMADI et al., 2011).

Os substitutos de gordura são utilizados para proporcionar algumas ou todas as propriedades funcionais das gorduras, além de fornecer menos calorias. Esses ingredientes são utilizados em uma variedade de produtos, da panificação às sobremesas congeladas (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION, 2005). A gordura do leite é um ingrediente multifuncional importante para a formação e estabilização da estrutura dos sorvetes (GRANGER et al., 2005; XINYI et al., 2010) influencia na cremosidade, nas características de textura e auxilia na produção de propriedades de derretimento desejáveis para o produto (MARSHALL; GOFF; HARTEL, 2003).

No entanto, a formação da estrutura de sorvete é dificultada quando o teor de gordura é reduzida e os atributos relacionados à qualidade, como viscosidade, a dureza, a fração de derretimento e sabor, são afetados (EL-NAGAR et al., 2002). Quando o teor de gordura é reduzido, muitas vezes este

componete é substituído por carboidratos e proteínas que podem executar propriedades funcionais semelhantes às gorduras (BENJAMINS et al., 2009).

Em sorvetes com baixo teor de gordura, a inulina tem sido utilizada como um substituto de gordura devido a sua capacidade para estabilizar a estrutura e o sabor (AKALM; KARAGÖZLÜ; ÜNAL, 2008; AYKAN; SEZGIN; GUZEL-SEYDIM, 2008; KARACA et al., 2009). Outros ingredientes, como concentrado protéico de soro (WPC), além de promover o crescimento e estabilidade das bactérias probióticas em produtos alimentares, melhoram a sua viabilidade durante o prazo de validade (AKALIN et al., 2007). No entanto, a funcionalidade desse ingrediente como substituto de gordura dependerá da natureza da suas frações proteicas e das suas interações com os outros componentes do sorvete. Algumas dessas frações proteicas permanecem dissolvidas na fase aquosa, contribuindo com a estabilidade da estrutura do produto e, dessa forma, auxiliando na redução da recristalização do sorvete (ROSSA; BURIN; BORDIGNON-LUIZ, 2012; GOFF; HARTELL, 2013;).

De uma forma geral, o sorvete é um produto que agrada o paladar dos mais diferentes públicos, sendo bem aceitos por crianças, adolescentes e adultos, inclusive idosos (CRUZ et al., 2009). No entanto, quando formulados com baixo teor de gordura contendo microrganismos probioticos e ingredientes prebióticos tendem a ser mais atraentes que os sorvetes tradicionais.

A suplementação de um produto lácteo com a cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 combinada com prebiótico pode melhorar a absorção de ferro e reduzir estado de anemia em crianças com idade pre-escolares (1- 4 anos) Sazawal et al. (2010). Adicionalmente, a incorporação de *Lactobacillus acidophilus* NCFM em sorvetes torna-se também interessante, uma vez, que essa cepa pode influenciar na diminuição da resistência à insulina e de marcadores inflamatórios em indivíduos humanos, conforme pesquisado por Andreasen et al. (2010).

No entanto, a incorporação de bactérias probióticas numa formulação de sorvete não deve afetar a qualidade final do produto. Nesse sentido, os parâmetros físico- químicos envolvidos no controlo da qualidade do produto, tal como a velocidade de derretimento, características sensoriais, devem ser o mesmo ou melhor, quando comparados com um sorvete convencional (Cruz et al., 2009).

Nesse sentido, a proposta deste estudo foi avaliar a influência da adição do prebiótico inulina e da substituição parcial da gordura lactea pelo concentrado de proteinas de soro de leite (WPC) sobre as caracteristicas fisico-químicas e sensorias de sorvetes de graviola (*Annoma muricata* L.) formulados com *Lactobacillus acidophilus* NCFM e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Planejamento experimental

Para o desenvolvimento do sorvete funcional com teor reduzido de gorduras e adicionado de polpa de fruta de graviola, foi realizado um delineamento fatorial 2^2, constituídos de 2 fatores (WPC e Inulina), em 2 níveis (presença ou ausência) para as diferentes formulações do sorvete de graviola.

Para cada delineamento experimental, foram realizados os ensaios com todas as possíveis combinações nos níveis dos fatores (LAWLESS; HEYMANN, 1999; BARROS NETO et al., 2007), totalizando 3 repetições de cada uma das 4 formulações do planejamento experimental, resultando em um total de 12 produções do sorvete funcional com polpa de fruta de graviola com teor reduzido de gordura. Para o desenvolvimento do sorvete funcional, foi utilizado o delineamento experimental descrito na **Tabela 1**. Os ingredientes e suas respectivas quantidades estão descritos na **Tabela 2**.

Tabela 1. Delineamento experimental e proporções definidas para os constituintes das 4 formulações do sorvete funcional com baixo teor de gordura e as quantidades codificadas em ausência [-1] ou presença [+1] dos fatores (inulina e o substituto parcial da gordura láctea - WPC) e os respectivos valores reais.

Constituintes	**Quantidade de cada ingrediente em 100 g de sorvete**			
	F1	**F2***	**F3**	**F4***
Inulina	0,00 [-1]	6,00 [+1]	0,00 [-1]	6,00 [+1]
WPC	0,00 [-1]	0,00 [-1]	1,50 [+1]	1,50 [+1]
Gordura láctea	3,00	3,00	1,50**	1,50**
Probioticos***	0,08	0,08	0,08	0,08

* formulações simbióticas com a presença [+1] de 6% de prebiotico (inulina).

** substituição parcial da gordura láctea (1,5%) pelo WPC.

*** culturas probióticas (*Lactobacillus acidophilus* NCFM *e Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019)

As quatro formulações foram calculadas com base na porção diária estabelecida para sorvetes, que corresponde a 60 g ou 130 mL do produto (ANVISA, 2003). Os ingredientes, como também suas devidas proporções, estão apresentadas para 100 g do alimento funcional (**Tabela 2**). A composição básica das diferentes formulações desenvolvidas para o sorvete de graviola foi definida com base na composição geral para sorvetes descrita por Goff e Hartell (2006, 2013) e dos gelados comestíveis simbióticos com baixo teor de gordura desenvolvidos por Harami (2008).

Tabela 2. Ingredientes e respectivas proporções (%) e váriaveis estudadas na produção dos sorvetes (F1 a F4).

Ingredientes (%)	Sorvetes			
	F1	**F2**	**F3**	**F4**
Fixos				
Polpa de graviola [1]	20,00	20,00	20,00	20,00
Leite em pó desnatado [2]	8,00	8,00	8,00	8,00
Sacarose [3]	7,00	7,00	7,00	7,00
Glicose [4]	3,00	3,00	3,00	3,00
Emulsificante Emustab [5]	0,50	0,50	0,50	0,50
Aroma de graviola [6]	0,08	0,08	0,08	0,08
Goma guar [7]	0,08	0,08	0,08	0,08
Goma xantana [8]	0,08	0,08	0,08	0,08
Goma carragena [9]	0,03	0,03	0,03	0,03
Lactobacillus acidophilus NCFM [10]	0,08	0,08	0,08	0,08
Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* HN019 [11]	0,08	0,08	0,08	0,08
Água	49,07	42,07	53,57	47,57
Variáveis				
Creme de leite (25% gordura láctea) *	12,00	12,00	6,00	6,00
WPC **	0,00	0,00	1,50	1,50
Inulina ***	0,00	6,00	0,00	6,00
Total	100,00	100,00	100,00	100,00

[1] (*Annona muricata* L., IceFruit-Maisa, Tatuí-SP, Brasi); [2] Leite Molico, Nestlé, Araçatuba - SP, Brasil; [3] Açúcar União, Coopersucar, Limeira-SP, Brasil; [4] NUTRE, São Paulo-SP, Brasil; [5]Emulsificante (monoglicerídeos de ácidos graxos destilados, monoestearato de sorbitana, polioxietileno de monoestearato de sorbitana, Duas Rodas, Jaraguá do Sul-SC, Brasil; [6] Givaudan (Genebra, Suíça); [7,8,9] DuPont Danisco, Redhill, Reino Unido; [10,11] Culturas probióticas liofilizadas DVS (*Direct Set Vat*, DuPont Danisco, Redhill, Reino Unido); * 12% e 6% de creme de leite esterilizado (Nestlé, Araçatuba - SP, Brasil) contendo 25% de gordura láctea, contribui respectivamente, com 3% e 1,5% de gordura láctea nas formulações acima; ** concentrado proteico de soro do leite, WPC (Simplesse ®, CPKelco, Limeira-SP, Brasil); ** fibra prebiótica inulina Beneo ® GR - (ORAFTI, Oreye – Bélgica).

2.2 Elaboração dos sorvetes

2.2.1 Preparo do inóculo

A produção dos sorvetes iniciou-se com o preparo do pré-inóculo. Para isso, foram reconstituídas porções de 40 mL de leite, de acordo com as instruções do fabricante (20 g do leite em pó desnatado / 200 mL de água filtrada). Essas porções foram esterilizadas em autoclave (121°C/ 15 minutos) e, posteriormente, inoculadas com 0,08% de cada cultura probiótica liofilizadas DVS (*Direct Set Vat)* - *Lactobacillus acidophilus* NCFM e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 (DuPont Danisco, Redhill, Reino Unido) para a ativação, com incubação a 37°C durante 120 minutos.

2.2.2 Produção do sorvete

Durante o processamento da mistura de cada sorvete, para evitar a formação de grumos, as gomas foram previamente misturadas com uma parte do açúcar, antes de serem adicionadas na parte líquida da mistura. Em seguida, a mistura foi transferida para o misturador Geiser UMMSK-12 (Geiger, Pinhais, Brasil) para agitação e aquecimento a 50ºC, por 30 segundos (Figura 1). Após resfriamento a 40°C, foram adicionados à mistura o leite em pó desnatado, o restante do açúcar, a glicose, WPC e a fibra prebiótica inulina, com posterior mistura por 2 minutos adicionais (**Figura 1**). Posteriormente, o creme de leite foi adicionado à mistura, que foi novamente misturada no misturador Geiger (UMMSK-12), por 20 minutos, para a formação da emulsão (**Figura 1**). Nesta fase, ocorreu a quebra e a redução dos glóbulos de gordura, com a finalidade de melhorar as características do corpo do sorvete (**Figura 1**). Para atender às normas sanitárias exigidas pela ANVISA (2001) para a elaboração de gelado comestível, a mistura do sorvete foi pasteurizada a 85 °C, por 25 segundos. Depois do processo de pasteurização, essa mistura foi resfriada a 37 °C, para a adição dos pré-inóculos com as culturas probióticas (*L. acidophilus* NCFM e *B. animalis* subsp. *lactis* HN019). Por último, quando a mistura atingiu a temperatura ambiente (cerca de 20º C), foram adicionados a

polpa da fruta (previamente pasteurizada), o emulsificante (Emustab) e o aromatizante (*flavour* de graviola). A mistura final foi misturada por mais 15 minutos e refrigerada a 4°C, para a maturação da calda, por um período de 20-22h. No dia seguinte, a calda maturada foi transferida para a produtora de sorvete (Skymsen BSK-16) e batida (cristalização) por 15 minutos, para a incorporação de ar e o congelamento rápido a uma temperatura entre -3 ou -4ºC (produto), de maneira a controlar a formação de cristais de gelo e com obtenção do sorvete com uma consistência semi-sólida, parcialmente congelado. Posteriormente, o produto final foi envasado 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), os quais foram selados com tampa de alumínio, em seladora Delgo No. 1968 (Delgo Metalúrgica, Cotia, Brasil). Em seguida, os sorvetes embalados foram armazenados sob congelamento (-18±3°C) para a realização das análises, conforme definido nos períodos de amostragem, descritos no item 2.3.

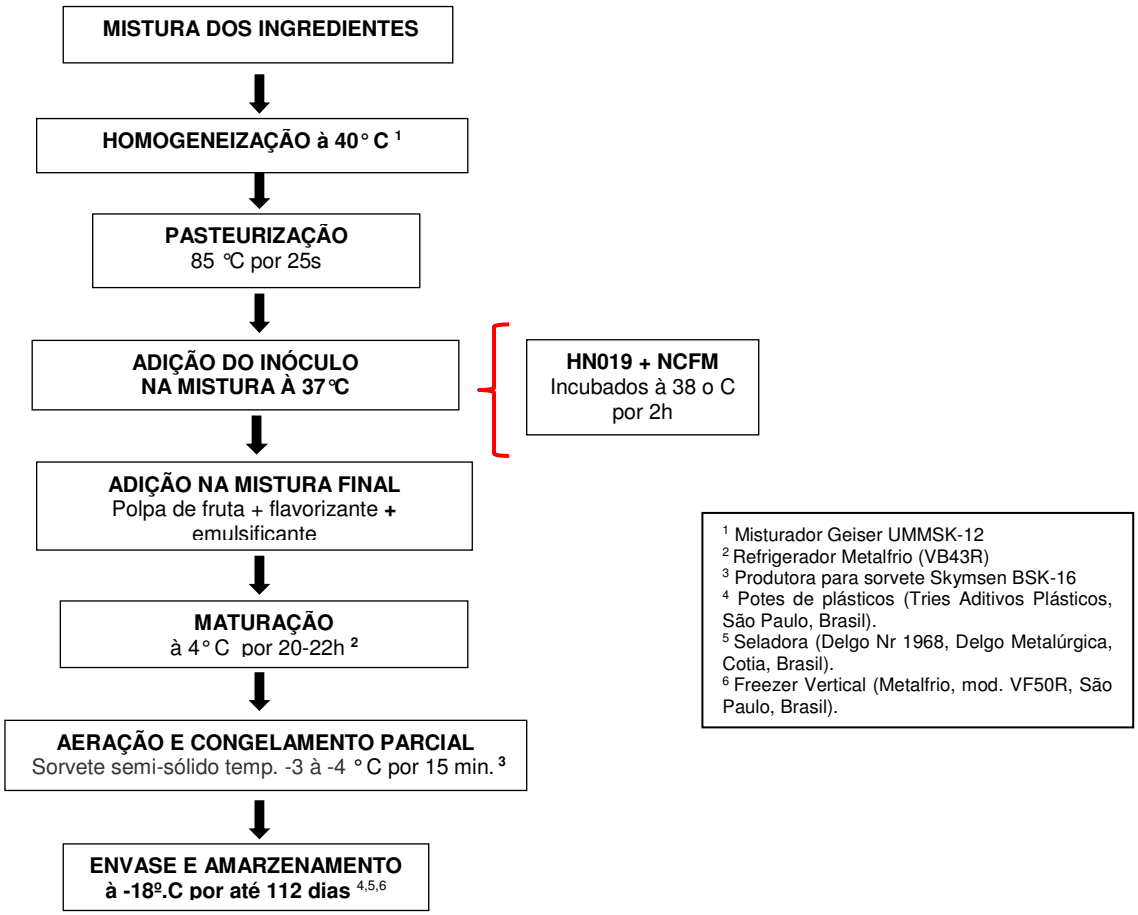


Figura 1. Fluxograma com as principais etapas do processamento das formulações do sorvete de graviola.

2.3 Período de armazenamento

As formulações de sorvete (F1 a F4) foram produzidas em triplicata e armazenadas no congelador a -18±3º C. Amostras provenientes das produções dos sorvetes de graviola foram utilizadas para a determinação dos parâmetros físico-químicos (composição centesimal, perfil lipídico, *overrun*, taxa de derretimento, dureza instrumental) e avalição sensorial, com o monitoramento prévio dos contaminantes microbiológicos. As características físico-químicas foram avaliadas após 7, 56 e 112 dias de armazenamento e a aceitação sensorial após decorridos os 7, 28, 56 e 84 dias de estocagem a -18±3ºC. Os rendimentos (% *overrun*) de cada uma das formulações F1 a F4 foram determinados durante a produção (dia 0), após o congelamento parcial do produto simultâneo com a incoporação de ar. As análises de composição centesimal e de determinação de perfil lípidico foram realizadas a partir de amostras liofilizadas conforme descrito no item 2.4.1.

2.4 Avaliação das características físico-químicas dos sorvetes

2.4.1 Determinação da composição centesimal e cálculo do valor energético total (VET)

Para a determinação da composição centesimal, as amostras, inicialmente mantidas a -18±3º C, foram posteriormente submetidas à liofilização, com exceção das amostras utilizadas para a determinação do teor de sólidos totais. A quantificação de sólidos totais foi determinada a partir de 5g de sorvetes não liofilizados mantidos a 70ºC, em estufa a vácuo (modelo 440/D, Nova Ética, Vargem Grande Paulista, Brasil) de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (2005).

Para determinação das outras analises a liofilização das amostras foi conduzida após o congelamento das amostras a -60ºC, 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 -40ºC. A temperatura final do processo de secagem manteve-se entre 10 e 15ºC.

A partir das amostras liofilizadas foram determinadas as seguintes análises para a composição centesimal dos produtos:

- Fração cinza ou resíduo mineral fixo, foi determinada gravimetricamente pela incineração de 5 g de amostra a 550ºC (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005);

- Proteínas foram realizadas através da análise do conteúdo de nitrogênio total pelo método micro-Kjeldahl, utilizando o fator de conversão 6,37, adaptado de Association of Official Analytical Chemists (2003 a,b);

- Gorduras totais, determinados através do método de Bligh e Dyer (1959).

- Carboidratos (incluindo fibras), calculados pela diferença para se obter 100% da composição total (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005);

Para o cálculo do valor energético total (VET) foram determinados os teores de macronutrientes, os quais foram convertidos em quilocalorias, por meio dos fatores de Atwater e da energia oriunda da inulina [(4 × g proteínas) + (4 × g carboidratos) + (9 × g lipídios totais) + (1,5 × g de frutanos totais)], para determinar o valor energético total (VET) médio de cada uma das 4 formulações do sorvete funcional (ANVISA, 2003; AUERBACH et al., 2007).

2.4.2 Composição dos ácidos graxos

A partir das amostras liofilizadas, conforme descrito no item 2.4.1, foi realizado o processo de obtenção da fração lipídica dos sorvetes, com adaptação da metodologia de Bligh e Dyer (1959). Após a obtenção da fração lipídica, os ácidos graxos foram transformados em ésteres metílicos, segundo a metodologia de Hartman e Lago (1973). A análise foi realizada em

cromatógrafo a gás Varian GC, modelo 430 GC, equipado com injetor automático, detector de ionização de chama e o programa "Varian"s Galixie Chromatography Software (Varian, Midelburgo, Holanda). Foi utilizada coluna capilar de sílica SP-2560 (Sulpeco, USA), com 100 m de comprimento X 0,25 mm de diâmetro interno e contendo 0,2 um de polietilenoglicol dentro da coluna. As condições foram: injeção split, razão de 50:1; temperatura da coluna: arraste: hélio, em pressão isobárica de 37 psi; velocidade linear de 20 cm/s; gás make-up: hélio a 29 mL/ min; temperatura do injetor: 250ºC; temperatura do detector: 250ºC. A composição qualitativa foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos com os respectivos padrões de ácidos graxos. Foram coletadas amostras de dois lotes de produção de cada sorvete. As amostras foram analisadas em triplicata e os valores apresentados corresponderam às médias ± (DP) destes valores.

2.4.3 Incorporação de ar (*overrun*)

A proporção de ar incorporado à mistura durante o batimento e congelamento simultâneo é denominada *overrun*. Essa medição foi realizada durante a elaboração do sorvete, com a pesagem inicial da calda (250 mL) e depois do produto pronto (250 mL) para avaliação do rendimento do sorvete. No trabalho realizado, o *overrun* foi obtido a partir de uma amostra de cada lote produzido, de acordo com Muse e Hartel (2004), através do seguinte cálculo:

$$\text{Overrun (\%)} = \frac{\rho\text{calda} - \rho\text{sorvete}}{\rho\text{sorvete}} \times 100$$

onde ρ = peso em 250mL

2.4.4 Fração de derretimento

A fração de derretimento foi avaliada adaptando o método descrito por Muse e Hartel (2004) e Harami (2008), com a utilização de amostras com 50,0±0,50g de amostras de sorvete de cada lote produzido para as formulações F1-F4.

Durante as análises, as amostras armazenadas a -18 ± 3ºC foram retiradas do congelador e imediatamente dispostas sobre malha metálica de 5 mm de abertura, acomodada sobre o funil e uma proveta volumétrica graduada mantidas em estufa para manutenção da temperatura a 25,0 ± 1,0℃. O tempo de coleta dos primeiros 10,0 mL do produto drenado foi registrado e, a partir de então, medições do volume coletado foram realizadas a cada 3 minutos.

O coeficiente de derretimento foi calculado, considerando-se os volumes drenados e o período de coleta, os quais foram plotados em gráficos bidimensionais, obtendo-se assim, a fração de derretimento em mililitros por minutos (mL/min) a partir do coeficiente de inclinação da equação da reta obtida (CAVENDER; KERR, 2013).

2.4.5 Determinação da dureza instrumental

A avaliação da dureza instrumental (kgf) dos sorvetes em estudo foi realizada pelo o teste de corte do produto em texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems, Haslemere, Reino Unido), adaptando-se o método descrito por Aime et al. (2001) e por (HARAMI, 2008). Para efetuar as medições, os sorvetes acondicionados em potes de 250 mL foram retirados do freezer a -18 ± 3ºC e transportados do congelador para o analisador de textura (TA-XT2) em caixa de isopor com gelo envolta das amostras até o momento da análise. Durante as medições de dureza foi utilizado o *probe* (acessório) Knife Edge - HDP/BS, indicado pelo manual do equipamento. Para a realização da análise, foram adotados os seguintes parâmetros: velocidades de pré-teste, teste e pós-teste 2,0, 3,0 e 10 mm/s, respectivamente, para determinação da força (kgf) necessária para romper a amostra do produto.

2.5 Segurança microbiológica sanitária dos sorvetes

Para a confirmação da segurança microbiológica dos sorvetes foram realizadas as análises dos microrganismos indicadores de contaminação, conforme a legislação vigente para gelados comestíveis e produtos para gelados comestíveis (ANVISA, 2001). A legislação estabelece que gelados comestíveis de base láctea ou não láctea (a base de água ou polpa de frutas) devem ser analisados quanto à presença de coliformes a 45°C/g, estafilococos coagulase positivos/g e *Salmonella spp.*/25g.

Para a contagem de coliformes, utilizaram-se placas de Petrifilm TM (3M Microbiology, St. Paul, EUA), as quais foram incubadas a 45°C durante 24 h.

A determinação de estafilococos coagulase-positivos foi realizada utilizando-se placas PetrifilmTM Staph, incubadas a 37°C por 24h. Para identificação de contaminação por *Salmonella spp*. utilizou-se a metodologia proposta por Andrews et al. (2001).

2.6 Análise sensorial

A avaliação sensorial do presente trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, conforme o ofício: CEP/FCF/136/2010 (ANEXO 1).

A avaliação sensorial das quatro formulações do sorvete funcional (F1-F4) foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, após os períodos de armazenamentos descritos no item 2.3.

Cada sessão de análise sensorial contou com a presença de 30 provadores não treinados que analisaram duas amostras por sessão. O número total de consumidores, levando-se em conta todas as sessões de análise sensorial realizadas (para todas as amostras, em todos os períodos de armazenamento) foi de 240 voluntários. Antes de participarem da análise sensorial, os consumidores após estarem devidamente acomodados nas cabines de análise sensorial do laboratório, foram convidados a ler atenciosamente o Termo de consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO II),

contendo a identificação da pesquisa e dos responsáveis pela mesma, além de apresentar os aspectos legais da pesquisa.

Participaram dessa etapa consumidores adultos (provadores não treinados), entre funcionários, bolsistas, estagiários e visitantes da Universidade de São Paulo. Para a triagem dos consumidores, foram aplicados os seguintes critérios de inclusão: ter entre 18 e 60 anos, de ambos os sexos; ser consumidor habitual de produtos lácteos, como sorvetes, leites, iogurtes e queijos, inclusive de produtos com teores reduzidos de gorduras. Quanto aos critérios de exclusão, considerou-se: possuir histórico de manifestação de alergia, ter intolerância algum tipo de alimento, aditivo alimentar ou possuir doenças crônicas (como diabetes, hipotiroidismo, hipertiroidismo, hipertensão ou outras), estar em tratamento médico, estar gripado, resfriado, com desconforto gastrintestinal ou indisposto e ter entrado em contato, há menos de 1 hora, com materiais, alimentos ou cosméticos de cheiro forte.

A avaliação sensorial foi realizada com aplicação do teste de aceitabilidade, com amostras de aproximadamente 20 g, codificadas com 3 dígitos aleatórios. As amostras foram oferecidas aos consumidores monadicamente para a sua avaliação individual. Para esse fim, foi utilizada uma ficha sensorial (ANEXO III) com uma escala hedônica estruturada de 9 pontos (0 = desgostei muitíssimo, 5 = não gostei nem desgostei, 9 = gostei muitíssimo) para avaliação global dos atributos relacionados ao sabor, textura, aparência e aroma (LAWLESS; HEYMANN, 1999; ROUSSEAU, 2004).

2.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. As comparações entre os períodos de armazenamento para cada formulação e entre as formulações para os diferentes períodos de armazenamento foram realizadas através de análises de variância (ANOVA), seguidos do teste de médias de Tukey, após a confirmação da homogeneidade de variâncias. A homogeneidade de variâncias entre as formulações e os diferentes períodos de armazenamento (dias) foi avaliada através do teste de Levene. Nos casos de heterogeneidade de variâncias, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do procedimento de comparação múltipla de Dunn, para as formulações, e o teste de Friedman, para os períodos de armazenamento. O software estatístico utilizado na análise foi o XLSTAT 2013 (Addinsoft SARL, New York, USA) e o nível de confiança adotado nas análises foi de 95%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Características físico-químicas

3.1.1 Composição centesimal (%) e valor energético dos sorvetes

A composição centesimal e o valor energético (VET) obtidos para as formulações estudadas estão apresentadas na **Tabela 3**. As diferenças encontradas para o teor de umidade (%), carboidratos totais (%) e gorduras (%) na composição centesimal estão diretamente relacionadas com a formulação definida para cada produto.

Tabela 3. Composição centesimal (%) e valor energético total (VET) em Kcal /100g (média ± desvio-padrão) dos sorvetes funcionais.

Composição	Sorvetes			
	F1	F2	F3	F4
Umidade	73,12 ± 0,16	67,39 ± 1,04	72,75 ± 0,09	65,89 ± 0,20
Proteínas	3,19 ± 0,03	3,51 ± 0,26	4,04 ± 0,23	4,16 ± 0,11
Lipídios totais	2,92 ± 0,11	2,96 ± 0,05	1,69 ± 0,05	1,66 ± 0,01
Minerais	0,733 ± 0,037	0,735 ± 0,048	0,827 ± 0,003	0,836 ± 0,007
Carboidratos totais *	20,03 ± 0,27	25,41 ± 1,39**	20,70 ± 0,20	27,45 ± 0,30**
Total	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**
Sólidos totais (%)***	26,88 ± 0,16	32,15 ± 1,04	27,25 ± 0,09	34,11 ± 0,20
Valor energético Total	119,16 ± 0,42	128,48 ± 4,07	114,11 ± 0,62	127,62 ± 0,86

* Carboidratos totais incluindo teor de fibra alimentar totais. ** 5,4g corresponde aos frutanos presente em 6% de Inulina com grau de pureza de 92%, conforme a informação do fabricante (Orafti) para frutanos (Beneo GR) utilizados nas formulações F2 e F4. *** Resíduo seco após a secagem da amostra na análise de umidade. **F1-controle (- inulina, - WPC); F2 (+ Inulina, - WPC); F3 (- inulina, + WPC) e F4 (+ inulina, + WPC).**

Em sorvetes convencionais formulados com leite, os teores de sólidos totais podem variar de 28% a 40% (CLARKE, 2004; GOFF; HARTEL, 2013). Os sólidos totais são todos os ingredientes retirando-se a água e a sua quantidade é definida conforme a composição final do sorvete a ser apresentado ao consumidor. No presente trabalho, foi observado um valor

significativamente mais elevado do teor de sólidos totais para as formulações F2 e F4 que deve-se a adição de 6% de inulina (5,4 g de frutanos) (**Tabela 3**).

Segundo a Portaria nº 27 de 13 de janeiro de 1998 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, os produtos sólidos, prontos para o consumo, contendo o máximo de 3 g de gordura/ 100 g de produto, podem ser considerados alimentos com baixo teor de gordura (ANVISA,1998). Sendo assim, todas as formulações estudadas se enquadram nessa definição, por apresentarem valores de gorduras totais entre 1,66 e 2,96% (**Tabela 3**).

Nas formulações com 1,5% do concentrado proteico WPC (F3 e F4), foi observado um pequeno aumento no teor de proteína e minerais. A adição de 6% de inulina (5,4 g de frutanos totais) nas formulações F2 e F4 aumentou a quantidade de carboidratos totais e os porcentuais energéticos (VET) para 100 g de sorvete (**Tabela 3**). A composição centesimal e o valor energético total para as porções individuais de 60 g dos sorvetes estão apresentados na **Tabela 4.**

Tabela 4. Composição em nutrientes e valor energético total (VET) obtido para as porções* de 60 g (média ± desvio-padrão) para cada formulação do sorvete funcional.

Composição	**Sorvetes**			
	F1	**F2**	**F3**	**F4**
Proteínas	1,92 ± 0,02	2,10 ± 0,16	2,42 ± 0,14	2,50 ± 0,07
Lipidios totais	1,75 ± 0,06	1,77 ± 0,03	1,01 ± 0,03	1,00 ± 0,01
Minerais	0,440 ± 0,022	0,441 ± 0,029	0,496 ± 0,002	0,502 ± 0,004
Carboidratos**	12,02 ± 0,16	15,25 ± 0,83***	12,42 ± 0,12	16,47 ± 0,18***
Valor energético Total (Kcal/60g)	71,50 ± 0,25	77,09 ± 2,44	68,47 ± 0,37	76,56 ± 0,052

* Porção diária estabelecida para o sorvete, que corresponde 60 g ou 130 mL do produto (ANVISA, 2003). ** Carboidratos totais incluindo teor de fibra alimentar totais. *** 3,24 g do total dos carboidratos correspondem aos frutanos presente em 6% de Inulina com grau de pureza de 92%, conforme a informação do fabricante (Orafti) para frutanos (Beneo GR) utilizados nas formulações F2 e F4. **F1-controle (- inulina, - WPC); F2 (+ Inulina, - WPC); F3 (- inulina, + WPC) e F4 (+ inulina; + WPC,).**

Os produtos podem ser desenvolvidos através da substituição de ingredientes (por exemplo, açúcar, gordura, sal e certos aditivos) por outros mais saudáveis que possam oferecer benefícios adicionais, sem modificar a qualidade inicial do produto (LIU; XU; GUO, 2008).

Neste sentido, os valores energéticos totais (VET) observados para as porções de 60 g dos produtos foram inferiores aos sorvetes tradicionais disponíveis no mercado (**Tabela 4**), indicando que a utilização do prebiótico inulina e do substituto de gordura (WPC) na formulação dos sorvetes probióticos pode melhorar a qualidade nutricional desses alimentos e transformarem o produto em uma boa fonte de proteínas e de fibras totais.

3.1.2 Composição em ácidos graxos.

Nas **Tabelas 5** e **6** estão enumerados os diferentes ácidos graxos encontrados nas formulações do sorvete de graviola e suas proporções, em porcentagem na base integral.

Tabela 5. Composição qualitativa de ácidos graxos presentes em 100 g de amostra (média ± desvio-padrão).

Ácidos Graxos		**Sorvetes**			
		F1	**F2**	**F3**	**F4**
Butírico	C4:0	0,30 ± 0,06	0,47 ± 0,18	0,26 ± 0,03	0,28 ± 0,00
Capróico	C6:0	1,56 ± 0,02	1,55 ± 0,03	1,45 ± 0,18	1,24 ± 0,01
Caprílico	C8:0	1,00 ± 0,00	0,99 ± 0,02	0,90 ± 0,13	0,75 ± 0,00
Cáprico	C10:0	2,32 ± 0,00	2,23 ± 0,02	1,93 ± 0,55	1,29 ± 0,01
Laúrico	C12:0	2,76 ± 0,06	2,90 ± 0,39	2,60 ± 0,03	2,61 ± 0,08
Mirístico	C14:0	11,57 ± 0,12	11,40 ± 0,04	10,79 ± 0,22	10,53 ± 0,11
Palmítico	C16:0	35,05 ± 0,01	35,34 ± 0,67	35,00 ± 0,51	35,55 ± 0,10
Palmitoléico	C16:1	1,29 ± 0,05	1,13 ± 0,02	0,55 ± 0,40	0,09 ± 0,13
Esteárico	C18:0	12,53 ± 0,07	12,83 ± 0,06	15,46 ± 0,09	15,50 ± 0,00
Oléico	C18:1n9c	29,94 ± 0,14	29,77 ± 0,32	29,59 ± 0,99	30,67 ± 0,05
Linoléico	C18:2n6c	1,40 ± 0,05	1,28 ± 0,02	1,38 ± 0,07	1,31 ± 0,42
α-Linolênico	C18:3n3	0,29 ± 0,07	0,13 ± 0,05	0,13 ± 0,05	0,19 ± 0,20

F1-controle (- inulina, - WPC); F2 (+ Inulina, - WPC); F3 (- inulina, + WPC) e F4 (+ inulina, + WPC).

A gordura presente no leite é composta principalmente de ácidos graxos saturados e, em uma menor proporção, de ácidos graxos poli-insaturados (CHOO; LEONG; LU, 2010). Os principais ácidos graxos saturados encontrados na gordura do leite e nos produtos lácteos são os ácidos graxos de cadeia longa, do tipo palmítico (C 16:0), esteárico (C 18:0), oléico (C 18:1) e mirístico (C14:0) (LOTTENBERG, 2009; SANTOS; AQUINO, 2008). Esses ácidos graxos foram predominantes em todas as formulações do sorvete estudado, sendo que o ácido graxo palmítico foi encontrado em maior quantidade (**Tabela 5)**.

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 o capróico (C 6:0). Quando livres, esses ácidos graxos são voláteis e conferem aroma característico aos produtos lácteos (SANTOS; AQUINO, 2008). No presente trabalho, os ácidos de cadeia curta foram detectados em todas as formulações do sorvete de graviola que, por serem voláteis e parcialmente solúveis em água, apresentaram teores variáveis de ácido butírico (0,26-0,30%), capróico (1,241-1,56%) e caprílico (0,75-1,00%).

De modo geral, observou-se uma maior quantidade de ácidos graxos saturados, em relação aos mono e poli-insaturados, o que é esperado para um produto de base láctea. A distribuição dos ácidos graxos segundo o grau de insaturação pode ser observada na **Tabela 6**.

Os ácidos graxos insaturados são classificados pelo número de insaturações presente na sua estrutura química, sendo denominados mono-insaturado quando apresenta uma dupla ligação ou poli-insaturados, partir de duas ou mais insaturações.

Esses ácidos graxos pertencem a diferentes séries, definidas pela localização da primeira dupla ligação na cadeia de carbono a partir do terminal metila, identificada pela letra ômega (ω). Dessa forma, esses ácidos graxos são classificados em série ω-3, ω-6 e ω-9 (LOTTENBERG, 2009).

O ácido graxo poli-insaturado mais abundante, pertencente à série ω-6, é o linoleico (C18:2) e o da serie ω-3 é o α- linolênico. Esses dois os ácidos graxos são essenciais ao homem, pois as células dos mamíferos não têm a capacidade de inserir uma dupla ligação (dessaturar) antes do carbono 9 da cadeia dos ácidos graxos, (LOTTENBERG, 2009).

Tabela 6. Composição qualitativa de ácidos graxos (média), agrupados segundo o grau de insaturação, em relação ao total de ácidos graxos presentes nas diferentes formulações do sorvete funcional.

Grau de saturação	Sorvetes			
	F1	F2	F3	F4
Saturados	67,09	67,69	68,38	67,75
Mono-insaturados	31,23	30,91	30,14	30,76
Poli-insaturados	1,69	1,40	1,51	1,50

F1-controle (- inulina, - WPC); F2 (+ Inulina, - WPC); F3 (- inulina, + WPC) e F4 (+ inulina; + WPC).

No presente trabalho, as proporções de ácidos graxos insaturados encontradas nas formulações do sorvete foram de 30,14 a 31,23 % para os ácidos graxos mono-insaturados, oléico (C18:1 n9c) e palmitoléico (C16:1) e de 1,40 a 1,69 % para os ácidos graxos poli-insaturados, constituídos pelos ácidos linoléico (C18:2n6c) e α-linolênico (C18:3n3), conforme mostrado na **Tabela 6**. Essa constatação é interessante sob o ponto de vista nutricional, visto que esses ácidos graxos são essenciais e precisam ser obtidos através da alimentação.

Os ácidos graxos insaturados são componentes estruturais necessários para síntese dos fosfolipídios de membrana e têm um papel importante na fisiologia das membranas celulares, através de mecanismos como sinalização, transdução de sinais e proliferação celular (OLIVEIRA; NUNES-PINHEIRO, 2013). Em humanos, os principais efeitos benéficos associados ao consumo dos ácidos graxos insaturados têm sido atribuído às suas atividades cardioprotetoras, na modulação da resposta inflamatória na parede das artérias (arteriosclerose), por reduzir o infiltrado inflamatório e o acúmulo de placas lipídicas ateromatosas, evitando tromboses (SUDHEENDRAN; CHANG; DECKELBAUM, 2010; CHANG; DECKELBAUM, 2013).

3.1.3 Valores de rendimento dos sorvetes (*overrun*)

O *overrun* é definido como o aumento percentual do volume de sorvete (produto final) em relação à calda ou mistura (produto inicial), ou seja, a quantidade de ar incorporado durante o processo de batimento e congelamento simultâneo da calda para obtenção do sorvete (CRUZ et al., 2011). Na legislação brasileira, a incorporação de ar (*overrun*) é denominada como densidade aparente e, independentemente do tipo de sorvete, deve apresentar o valor máximo de 450 g/L (ANVISA, 2005).

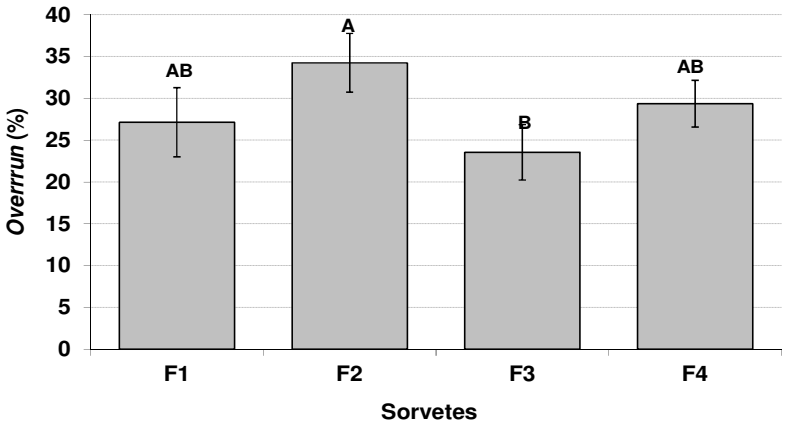


Figura 2. Valores de rendimento (% *overrun*) dos sorvetes durante a etapa batimento/congelamento parcial dos sorvetes. **F1-controle (- inulina, - WPC); F2 (+ Inulina, - WPC); F3 (- inulina, + WPC) e F4 (+ inulina, + WPC).**

A incorporação de ar nos sorvetes proporciona uma textura leve e pode influenciar nas propriedades físicas de textura e de derretimento. No entanto, a qualidade desses parâmetros não é influenciada apenas pela a quantidade de ar incorporado no produto, mas também pela distribuição e pelo tamanho das partículas de ar. Diante da complexidade da estrutura sorvete, a fabricação requer controle cuidadoso, pois inúmeros fatores estão envolvidos no desenvolvimento do *overrun* no sorvete (SOFJAN; HARTEL, 2004; XINYI et al. 2010).

No presente trabalho, as porcentagens de *overrun* (%) das diferentes formulações de sorvete de graviola descritas na **Figura 2** foram próximas ao trabalho de Silva Junior e Lannes (2011), que observaram incorporação de ar

entre 35% e 40% em sorvetes formulados com xarope de glicose e gordura de palma em substituição da sacarose e da gordura hidrogenada, e dos resultados encontrados por Harami (2008) nos gelados comestíveis simbióticos com *Bifidobacterium* Bb-12 e *L. acidophilus* La-5 e reduzidos de gordura que apresentaram *overrun* de 46,94 – 59,47 %.

Para Ferraz et al. (2012), os menores níveis de *overrun* nos sorvetes incorporados de culturas probióticos é desejável para a manutenção de sua viabilidade durante a vida de prateleira. Nesse trabalho, os autores observaram uma redução de até 2 log UFC/g de *L. acidophilus* NCFM (DOWARU ™) adicionado em sorvetes de baunilha elaborados com 60 e 90% de *overrun*.

No presente trabalho, a formulação F2, com 3% de gordura láctea combinada com 6% de inulina, apresentou 34,2% de incorporação de ar (*overrun*), portanto significativamente superior àquela da formulação F3 (1,5% de gordura láctea + 1,5% de WPC), à qual obteve *overrun* de 23,5% ($p<0,05$) (**Figura 2**). Semelhantemente, esse comportamento foi observado nos sorvetes simbióticos desenvolvidos por Akalin e Erisir (2008), que obtiveram a maior média de incorporação de ar (50,6%) para a formulação com 4 % de inulina e de gordura láctea ($p<0,05$). O mesmo também foi observado por Akaln, Karagözlü e Ünal (2008) que obtiveram maior *overrun* (%) no sorvete com teor de gordura reduzido contendo inulina. Por outro lado, os autores obtiveram o menor *overrun* no sorvete com substituição da gordura pelo WPI ($p <0,05$). Esse comportamento também foi constatado em sorvetes com substituição total da gordura por ingredientes proteicos *Litesse* e *Dairy-Lo*, desenvolvidos por Santos e Silva (2012), que apresentaram *overrun* abaixo de 25%.

De acordo com Rechsteiner (2009), a substituição total ou parcial da gordura pode resultar em mudanças indesejáveis no sorvete, como o baixo *overrun*. A afirmação dos autores pode ser explicada com base na constatação de Bolliger, Goff e Tharp (2000) e de Goff e Hartel (2013). Segundo os últimos autores, a incorporação de ar no sorvete é favorecida pela quantidade de gordura desestabilizada presente na mistura e, consequentemente, com a formação de uma microestrutura interna. A referida microestrutura é formada por micelas de lipídios capazes de aprisionar as bolhas de ar no produto final, proporcionando uma textura agradável e leve ao sorvete (SOFJAN; HARTEL, 2004). Adicionalmente, segundo Stanley, Goff e Smith (1996), a alta

viscosidade não favorece a formação de espuma no sorvete, mas sim a estabilidade da estrutura.

Esse fato pode explicar a baixa incorporação de ar, significativamente menor para a formulação F3, com 1,5% de gordura láctea ($p<0,05$). Além disso, não pode ser descartada a importância do processo de congelamento utilizado. Segundo Harami (2008), os valores baixos de *overrun* normalmente são atribuídos à produção do sorvete em congelador em bateladas e não em congelador contínuo, o qual, segundo a pesquisadora, seria mais eficiente na incorporação de ar.

3.1.4 Fração de derretimento dos sorvetes

A aparência do sorvete à medida que ele derrete é extremamente importante na percepção global do consumidor quanto à qualidade do produto. Além disso, a observação do processo de derretimento pode trazer informações importantes quanto a cremosidade, suavidade e riqueza do sorvete. Ao avaliar o tempo de derretimento dos primeiros 10 mL de cada formulação do sorvete de graviola, verificou-se que as formulações F2 (+ inulina, - WPC) e F4 (+ inulina, + WPC), contendo inulina, foram significativamente mais resistentes ao início do derretimento em relação às formulações F1-controle (- inulina, -WPC) e F3 (- inulina, + WPC) ao longo do armazenamento ($p<0,05$), exceto para a formulação F4 no 7º. dia de armazenamento (**Figura 3**).

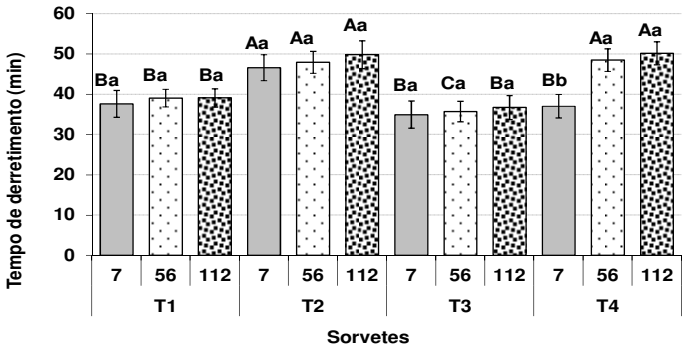


Figura 3. Tempo de derretimento (min) dos primeiros 10 mL dos sorvetes ao longo do armazenamento de 112 dias.

Na **Tabela 7**, podemos observar que as formulações F2 (+ inulina, - WPC); F3 (- inulina, + WPC) e F4 (+ inulina, + WPC,) apresentaram menores taxas de derretimento em relação à F1-controle (- inulina, - WPC) até o 56º dia de armazenamento (p<0,05).

Tabela 7 - Velocidade de derretimento (mL/ min) dos sorvetes durante os períodos de armazenamento (dias) a -18±3º C (media ± desvio-padrão).

Dias*	Sorvetes			
	F1	**F2**	**F3**	**F4**
7	1,26 ± 0,07 ^{Aa}	1,10 ± 0,05 ^{Ba}	1,16 ± 0,07 ^{Ba}	1,13 ± 0,07 ^{Ba}
56	1,24 ± 0,07 ^{Aa}	1,09 ± 0,07 ^{Ba}	1,15 ± 0,04 ^{Ba}	1,10 ± 0,04 ^{Ba}
112	1,22 ± 0,07 ^{Aa}	1,09 ± 0,21 ^{ABa}	1,22 ± 0,09 ^{Aa}	1,07 ± 0,06 ^{Ba}
Média geral	1,24 ± 0,07	1,09 ± 0,13	1,18 ± 0,07	1,10 ± 0,06

* Dias correspondem aos períodos de armazenamento das diferentes formulações de sorvete de graviola mantidas a -18 ºC

^{A,B} Letras maiúsculas distintas sobrescritas em uma mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes sorvetes estudados no mesmo período de armazenamento. ^{a} Letra minúscula sobrescrita em uma mesma coluna indica que não houve diferença significativa (p>0,05) entre os diferentes períodos estudados para um mesmo sorvete. **F1-controle (- inulina, - WPC); F2 (+ inulina, - WPC); F3 (- inulina, + WPC) e F4 (+ inulina; + WPC).**

As formulações F2 e F4, ambas adicionadas de 6% de inulina, tiveram as menores médias de velocidade de derretimento, respectivamente com 1,09 e 1,10 (mL/min). Esses valores foram significativamente menores em relação àqueles da formulação F1- controle (p<0,05). No entanto, ao longo de todo período de armazenamento, não foram observadas mudanças significativas no comportamento da velocidade de derretimento para nenhuma das formulações avaliadas (p>0,05).

As alterações nos valores de fração de derretimento podem ocorrer devido à capacidade da inulina de se ligar à água e à maneira como ela é incorporada à estrutura física do produto durante o processo de congelamento (EL-NAGAR et al., 2002). Esses fatores contribuem para a estabilidade da estrutura da fase aquosa e, consequentemente, podem aumentar a resistência ao derretimento das formulações adicionadas da fibra alimentar prebiótica.

Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por Akin, Akin e Kirmaci (2007), que observaram que os sorvetes adicionados de 15, 18 e 21% de sacarose e com 2% de inulina apresentaram maior resistência para o derretimento, em comparação aos sorvetes sem ou com adição de 1% de inulina.

Em seguida a F2 e F4, a formulação F3 (- inulina, + WPC) apresentou média de taxa de derretimento de 1,18 (mL/ min), sendo significativamente mais resistente ao derretimento durante os 56 dias de armazenamento em relação à formulação F1- controle, com fração de derretimento de 1,24 (mL/ min) ($p<0,05$).

Efeito similar foi observado na avaliação do efeito do isolado protéico do soro de leite (WPI) sobre as propriedades reológicas dos sorvetes pesquisados por Akalm, Karagözlü e Üna (2008). Esses pesquisadores observaram que as formulações reduzidas de gordura (6%) e com baixo teor de gordura (3%), ambas adicionadas de 4% de WPI, apresentaram melhores estabilidades em relação à formulação controle, com 10% de gordura ($p<0,05$). A adição de WPI aumentou a viscosidade, a firmeza do produto e a resistência ao derretimento. Essas características podem ser atribuídas à quantidade elevada de frações protéicas de β lactoglobulina (68–75%) presente no ingrediente proteico WPI. Essa estrutura característica confere ao ingrediente alta capacidade de formação de redes protéicas ao se ligarem às moléculas de água livre (MARSHALL; GOFF; HARTEL, 2003).

3.1.5 Comportamento do parâmetro dureza instrumental dos sorvetes

A dureza instrumental mede a resistência do sorvete à deformação quando uma força externa de compressão é aplicada, com o objetivo de simular o seu comportamento durante o consumo (LIM et al., 2008). O comportamento de dureza no sorvete é influenciado por varios fatores, que incluem o ponto de congelamento, a quantidade de sólidos totais, o *overrun* (%) e a quantidade e os tipos de estabilizadores utilizados para a formação do mix do produto (GOFF; HARTELL, 2013).

Os resultados de dureza instrumental (kgf) dos sorvetes armazenados a -18±3º C estão apresentados na **Tabela 8.** Alterações significativas (p<0,05) foram observadas na análise de dureza instrumental (kgf) para todos os sorvetes armazenados por até 112 dias.

Tabela 8. Valores de dureza instrumental (kgf) obtidos para as diferentes formulações do sorvete funcional (média ± desvio-padrão), durante os períodos de armazenamento (dias) a -18±3º C.

Dias*	Sorvetes			
	F1	**F2**	**F3**	**F4**
7	149,9 ± 19,8 ^{Bb}	166,0 ± 15,3 ^{ABb}	117,9 ± 12,1 ^{Cb}	173,7 ± 14,1 ^{Ab}
56	161,1 ± 7,0 ^{Bb}	175,1 ± 8,0 ^{Ab}	166,1 ± 13,2 ^{ABa}	176,7 ± 9,9 ^{Ab}
112	188,7 ± 6,7 ^{Ba}	191,9 ± 11,4 ^{ABa}	166,4 ± 13,2 ^{Ca}	203,5 ± 13,6 ^{Aa}
Média	166,5 ± 20,6	177,7 ± 15,9	150,1 ± 26,3	184,7 ± 18,3

* Dias correspondem aos períodos de armazenamento das diferentes formulações de sorvete de graviola mantidas a -18 ºC

^{A,B,C} Letras maiúsculas distintas sobrescritas em uma mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes sorvetes estudados no mesmo período de armazenamento. ^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas em uma mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes períodos estudados para um mesmo sorvete. **F1-controle (- inulina, - WPC); F2 (+ inulina, - WPC); F3 (- inulina, + WPC) e F4 (+ inulina, + WPC).**

As principais modificações de textura observadas no sorvete de graviola durante o armazenamento estão relacionadas à presença de inulina nas formulações F2 (+ Inulina, - WPC) e F4 (+ inulina, + WPC), que apresentaram os maiores valores de dureza, respectivamente, de 177,5 e 184,7 kgf. A formulação F2, com a adição apenas de inulina, apresentou maior valor de dureza instrumental (kgf) em relação ao F1-controle no 56º dia de armazenamento. Já a formulação F4, com presença da inulina e WPC, obteve maior valor de dureza (kgf) para todos os períodos de armazenamento avaliados (p<0,05). Resultados semelhantes foram observados por El-nagar et al. (2002) e Alamprese et al. (2002), que relataram aumento da dureza instrumental nos sorvetes adicionados de inulina, em relação aos sorvetes contendo apenas gordura em concentrações superiores àquelas com adição de prebiótico. Similarmente, também foi observado por Criscio et al. (2010), ao

avaliarem a influência da inulina, em diferentes concentrações, sobre diversas características de sorvete. Para as proporções de inulina acima de 5%, a dureza do sorvete dos pesquisadores foi aproximadamente o dobro daquela apresentada pelas formulações controle e com 2,5% de inulina. O mesmo foi observado em sorvetes simbióticos formulados com leite de cabra e polpa de fruta de cajá, (PAULA, 2012). Segundo a autora, as formulações adicionadas com os probióticos *L. rhamnosus* HN001 e *L. paracasei* LBC82, ambas com 5% de inulina, apresentaram valores de dureza instrumental significativamente superiores, em relação às formulações sem adição do prebiótico ($p<0,05$).

De acordo com El-nagar et al. (2002), no momento que a inulina liga-se a água, há uma formação de uma estrutura insolúvel e semi-rígida, que pode proporcionar maior dureza ao produto. Desta forma, a inulina pode atuar como estabilizador da estrutura do sorvete, devido à sua capacidade de ligação às moléculas de água, com a formação de uma rede de microcristais de géis no alimento na qual foi adicionada (AKALIN; ERISIR, 2008; VILLEGAS; COSTELL, 2007).

Nesse sentido, o aumento significativo da dureza instrumental (kgf) observado nas formulações F2 e F4 ($p<0,05$) após 56º dia de armazenamento pode estar relacionado ao elevado grau de polimerização da inulina, com menor solubilidade e alta capacidade de formar gel no produto (BURITI; CASTRO; CASTRO, 2010). No entanto, a insolubilidade da inulina após a sua dispersão no meio aquoso pode reduzir a sua capacidade de se ligar novamente às moléculas de água livres que surgem durante as flutuações de temperatura (EL-NAGAR et al., 2002). Nesse sentido, os sorvetes contendo alto conteúdo de cristais de gelo grandes possuem maiores valores de dureza em relação as formulações com menor conteúdo destes (MUSE; HARTEL, 2004), pois o tamanho dos cristais de gelo formados pela instabilidade termodinâmica dos sorvetes aumenta a dureza do sorvete. De acordo com Regand e Goff (2003), Goff e Hartell (2013), as flutuações de temperaturas podem ocasionar a recristalização do produto durante o armazenamento e, consequentemente, o aumento gradual do tamanho dos cristais de gelo.

Diferentemente dos resultados apresentados no presente estudo, no trabalho de Ahmadi et al. (2012), as amostras de *frozen* iogurte suplementadas com 4 e 8% de FOS apresentaram valores de dureza significativamente

menores em relação a amostra controle (0% de FOS). De acordo com observações desses autores, a solubilidade do prebiótico FOS na fase aquosa do sorvete foi eficiente na manutenção do tamanho dos cristais de gelo frente ao processo de recristalização durante todo o período de armazenamento. Similarmente, esse comportamento foi observado nos valores de dureza instrumental para a formulação F3 com presença de WPC, que se manteve estável após 56 dias de armazenamento ($p>0,05$). Para os autores Yilsay, Yilmaz e Bayizit (2006) e Rossa, Burin e Bordignon-Luiz (2012), a solubilidade das proteínas do soro do leite na fase descongelada do sorvete pode contribuir na redução do tamanho dos cristais de gelo, devido ao baixo ponto de congelamento do produto.

4. Parâmetros microbiológicos sanitários

Não foi detectada a presença de coliformes a 45°C e de *Salmonella* spp., em nenhuma das amostras analisadas. Na determinação de *Staphylococcus aureus* coagulase-positiva foram detectados contagens inferiores a 100 UFC/g nas amostras dos sorvetes. Esse valor está bem abaixo do valor máximo permitido pela legislação nacional vigente para sorvetes e gelados comestíveis que determina um limite de $5X10^2$ UFC/g (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001). Sendo assim, as quatro formulações avaliadas do sorvete funcional com polpa de graviola desenvolvido apresentaram-se de acordo com os padrões legais vigentes aprovados pelo Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos estabelecidos pela ANVISA (2001).

5. Aceitação sensorial dos sorvetes

O desenvolvimento de novos produtos funcionais, ou mesmo nutricionalmente saudáveis, implica em desafios tecnológicos para que esse produto diferenciado apresente aceitação sensorial similar ou mesmo superior aos produtos convencionais.

Diante disso, diferentes testes sensoriais são aplicados durante o desenvolvimento de alimentos probióticos e/ ou prebióticos, com o objetivo de buscar informações que possam contribuir, de forma efetiva, na obtenção de produtos alimentícios com qualidade melhorada (CRUZ et al., 2011b; SAMPAIO; BEHRENS; SILVA, 2011).

Para a avaliação da qualidade dos produtos com adição de microrganismos probióticos ou ingredientes prebióticos, os testes afetivos são os mais indicados, uma vez que estes testes indicam a aceitação do novo produto no mercado (CRUZ et al., 2010; CRUZ et al., 2011b).

Esse tipo de teste avalia o "estado de afetividade" de um produto, isto é, o quanto o produto é aprovado pelos consumidores, através de uma escala hedônica que é utilizada para indicar o grau de aceitação ou não aceitação de um produto (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2007).

Para a análise sensorial do sorvete simbiótico de graviola, foi realizado um teste de aceitabilidade, com escala hedônica de 9 pontos (escores 1= desgostei muitíssimo; 5 = não gostei nem desgostei e 9 = gostei muitíssimo). Dentre os 240 participantes, no total, 56,25 % eram mulheres e 63,75% eram homens. O resultado da análise está representado na **Tabela 9**, na forma de médias de notas.

Tabela 9. Aceitabilidade sensorial (média ± desvio-padrão) obtida para as formulações do sorvete funcional com polpa de fruta de graviola, durante os períodos de armazenamento (dias) a -18±3º C.

Dias*	**Sorvetes**			
	F1	**F2** (np)	**F3**	**F4**(np)
7 (np)	7,13 ± 1,55 Ba	7,97 ± 0,89 Aa	7,20 ± 1,19 Ba	7,50 ± 0,97 ABa
28	7,07 ± 0,98 Aa	7,27 ± 1,51 Aab	7,37 ± 1,33 Aa	7,70 ± 0,84 Aa
56 (np)	7,03 ± 1,38 Ba	7,63 ± 0,72 ABab	7,07 ± 1,53 Ba	7,97 ± 0,76 Aa
84	6,87 ± 1,55 Ba	6,93 ± 1,53 Bb	7,37 ± 1,40 ABa	7,97 ± 1,25 Aa
Média geral	7,03 ± 1,37	7,45 ± 1,26	7,25 ± 1,36	7,78 ± 0,98

* Dias correspondem aos períodos de armazenamento das diferentes formulações de sorvete de graviola mantidas a -18 ºC

A,B Letras maiúsculas distintas sobrescritas em uma mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes sorvetes estudados no mesmo período de armazenamento. a,b Letras minúsculas sobrescritas em uma mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes períodos estudados para um mesmo sorvete. (np) teste não paramétrico utilizado Kruskall-Wallis). **F1-controle (- inulina, - WPC); F2 (+ inulina, - WPC); F3 (- inulina, + WPC) e F4 (+ inulina, + WPC).**

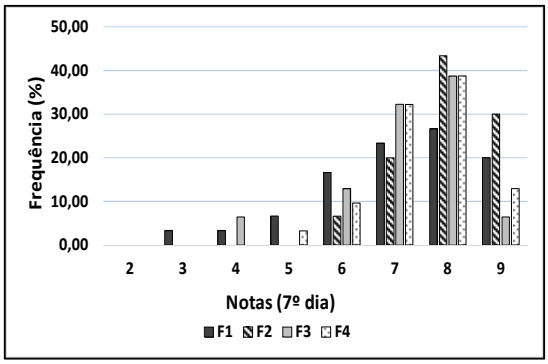
De modo geral, todos os produtos apresentaram valores de aceitabilidade elevados (gostei regulamente a gostei muito), ao longo do armazenamento, com médias de notas variando entre 7,03 e 7,97, exceto F1 e F2 aos 84 dias, quando obtiveram médias de 6,87 e de 6,93, respectivamente, portanto apenas ligeiramente abaixo de 7,0 (**Tabela 9**).

A formulação F2 (+ inulina, - WPC) apresentou maior aceitabilidade em relação a formulação controle F1 (- inulina, - WPC) e que F3 (- inulina, - WPC) ao 7º dia de armazenamento a -18±3ºC ($p<0,05$). Ao avaliar a sua aceitação ao longo do armazenamento, observou-se uma queda significativa nas notas atribuídas pelos provadores ao 84º dia de armazenamento, quando comparados ao 7º dia ($p<0,05$) (**Tabela 9**). Comportamento semelhante foi observado para os gelados comestíveis simbióticos desenvolvidos por Harami (2008). A formulação com adição de inulina apresentou uma tendência à redução de notas a partir 28º de armazenamento. Atribuiu-se esse fato à capacidade da inulina em auxiliar na inibição do crescimento dos cristais de gelo durante as primeiras semanas de armazenamento, tornando-se ineficaz após esse período. Desta forma, as variações de temperatura durante o armazenamento podem levar a alterações na estrutura formada no sorvete, o que poderia alterar negativamente a sua aparência, sendo este o atribuído com maior rejeição para a formulação F2, conforme pode ser visto na **Figura 5.**

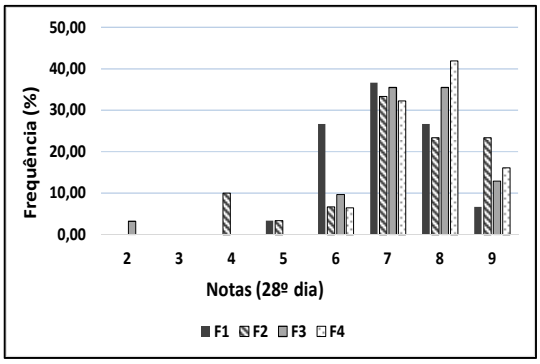
Ao compararmos os tratamentos para cada período avaliado, o sorvete F4, formulado com a combinação de inulina e WPC, apresentou as melhores notas de aceitabilidade, em termos de valores absolutos, nos dois últimos períodos de avaliação sensorial (56º e 84º dia de armazenamento), com notas significativamente superiores às notas atribuídas para a formulação F1- controle ($p<0,05$).

No trabalho de Adapa et al. (2000), sugere-se um bom equilíbrio de gordura, proteína e hidratos de carbono para a produção de sorvetes reduzidos de gordura com uma estrutura desejada. Nos sorvetes desenvolvidos por esses autores, a formulação com baixo teor de gordura que continha 1,5% de gordura e substituto de gordura à base de proteínas e de hidratos de carbono teve a melhor nota de aceitação sensorial. As evoluções das notas para cada período de armazenamento avaliado (7, 28, 56 e 84 dias) dos sorvetes funcionais

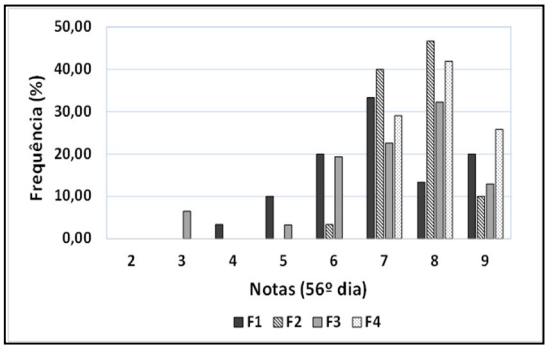
reduzido de gordura e adicionados de polpa de fruta de graviola estão apresentadas nas **Figura 4** (a, b, c e d).



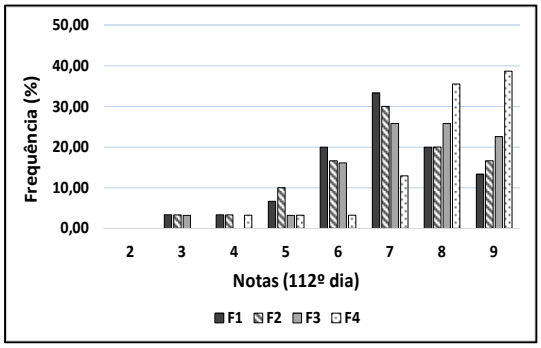
4 (a)



4 (b)



4 (c)



4 (d)

Figura 4. (a, b, c , d) Distribuição das notas atribuídas para as formulações (F1-F4) avaliadas respectivamente no 7º, 28º, 56º e 84ºdia de armazenamento a -18±3 ℃. **F1-controle (- inulina, - WPC); F2 (+ inulina, - WPC); F3 (- inulina, + WPC) e F4 (+ inulina, + WPC).**

Aos consumidores, foi solicitado que apontassem uma característica positiva e uma negativa na amostra avaliada. Os atributos mais citados foram: sabor, textura, aparência, característica da fruta e doçura. A partir desses dados foi construído um gráfico de barras (**Figura 5**), contendo o número de observações positivas acima do eixo X e as negativas abaixo deste eixo.

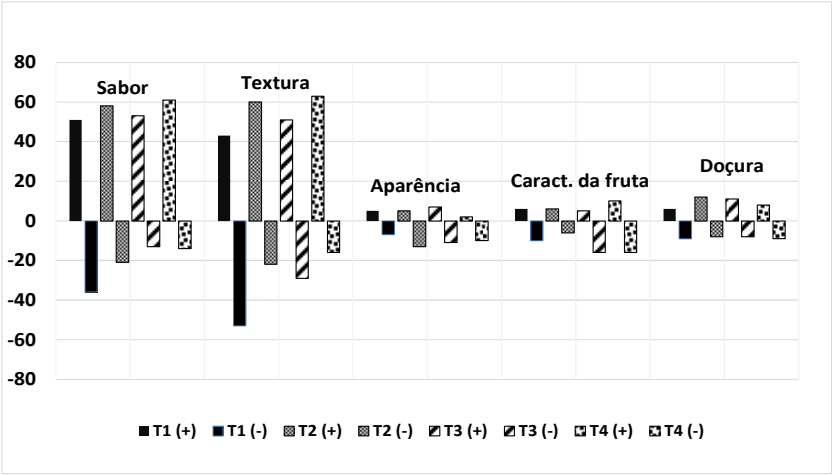


Figura 5. Frequência de citações positiva (+) e negativa (-) atribuídas para as características de sabor, textura, aparência, sabor característico da fruta e doçura dos diferentes sorvetes funcionais de graviola (F1 - F4).

O "sabor" e a "textura" foram os atributos mais citados pelos provadores como característica positiva (+) e negativa (-) nos sorvetes avaliados (**Figura 4)**. A citação desses atributos (sabor e textura) como característica positiva (+) foi mais frequente nas formulações F2 (+ Inulina, - WPC); F3 (- inulina, + WPC) e F4 (+ inulina, + WPC) do que para a formulação F1-controle. O que é esperado, uma vez, que a formulação controle apresentou menor média de aceitabilidade, conforme pode ser visto na **Tabela 9**. No entanto, a citação da "textura" como característica negativa (-) para essa formulação (F1) pode estar relacionado com o aumento da dureza instrumental (kgf) observada no final do armazenamento de 112 dias (**Tabela 8**). As formulações F2 e F4, com presença de inulina, tiveram as maiores citações do atributo "textura" como característica positiva (+). No entanto, os valores de dureza instrumental (kgf), significativamente mais elevados ($p<0,05$) para essas formulações, não resultou na rejeição desse atributo. Além disso, para as mesmas formulações, o atributo "sabor" foi mais frequentemente citado como característica positiva (+) do que para as formulações F1 e F3. Esse fato pode estar atribuído a presença do sabor do leite nas formulações sem adição de inulina, com destaque para a formulação F3, que apresentou maior número de citações negativa (-) para o atributo sabor característico da fruta, conforme pode ser visto na **Figura 4**. Assim sendo, de forma geral, o prebiótico inulina foi o ingrediente que teve maior impacto positivo para a aceitação sensorial dos sorvetes funcionais.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho mostrou que a adição do prebiótico inulina e do concentrado de proteínas de soro de leite (WPC) como substituto parcial de gordura láctea foram significativos para a melhoria de alguns parâmetros físico-químicos e aceitabilidade sensorial dos sorvetes funcionais de graviola com baixo teor de gordura desenvolvidos. As formulações com inulina F2 (+ inulina, - WPC) e F4 (+ inulina, + WPC) tiveram maiores valores de dureza instrumental, resistência ao derretimento e *overrun* frente à formulação controle F1 (- inulina, - WPC). No entanto, o aumento significativo da dureza instrumental observado principalmente para a formulação F4 (+ WPC, + inulina) no final do armazenamento não interferiu na sua aceitação pelos provadores que atribuíram notas superiores a F4 frente às demais formulações, exceto F3. Em face ao exposto, a formulação de sorvete funcional de graviola com teor reduzido de gordura F4, suplementado com inulina e com WPC (+ inulina, + WPC) seria a formulação de escolha para um sorvete com excelentes características sensoriais e manutenção da estabilidade dessas características ao longo de seu armazenamento por, pelo menos, 84 dias.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAPA. S.; DINGELDEIN, H.; SCHMIDT, K. A.; HERALD, T.J. Rheological properties of ice cream mixes and frozen ice creams containing fat and fat replacers. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.2224-2229, 2000.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998**. Aprova o Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/27_98.htm>. Acesso em: 10 out. 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n.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. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm. Acesso em: 30 ago. 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC nº. 359, de 23 de dezembro de 2003.** A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. Disponível em: http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=9058#'. Acesso em: 25 mar. 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n o. 266, de 22 de setembro de 2005**. Aprova regulamento técnico para gelados comestíveis e preparados para gelados comestíveis. Disponível em: http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=18825 Acesso em: 8 jan. 2010.

AHMADI, A.; MILANI, E. MADADLOU, A.; MORTAZAVI, S.A.; MOKARRAM, R.R.; SALARBASHI, D. Synbiotic yogurt-ice cream produced via incorporation of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* (la-5) and fructooligosaccharide. **Journal of Food Science and Technology**, 2012 publicado online em**:** http://www.springerlink.com/content/b1k142821211gn1g/fulltext. Acesso em: 13 mar. 2013.

AIME, D.B.; ARNTFIELD, S.D.; MALCOLMSON, L.J.; RYLAND, D. Textural analysis of fat reduced vanilla ice cream products. **Food Research International**, v.34, n.2/3, p.237-246, 2001.

AKALIN, A.S.; ERIŞIR, D. Effects of inulin and oligofructose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic ice cream. **Journal of Food Science**, v. 73, n.4, p.184-188, 2008.

AKALM, A. S., KARAGÖZLÜ, C.; ÜNAL, G. Rheological properties of reduced-fat and low-fat ice cream containing whey protein isolate and inulin. **European Food Research and Technology,** v. 227, p.889-895, 2008.

AKIN, M.B.; AKIN, M.S.; KIRMACI, Z. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. **Food Chemistry**, v.104, n.1, p.93-99, 2007.

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

ALVAREZ, V. B.; WOLTERS, C. L.; VODOVOTZ, Y.; JI, T. Physical properties of ice cream containing milk protein concentrates. **Journal of Dairy Science, Champaign**, v.88, n.3, p.862-871, 2005.

AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. Position of the American Dietetic Association: Fat Replacers. **Journal of the American Dietetic Association**, v.105, n.2, p.266-275, 2005.

ANDREASEN, A.S.; LARSEN, N.; PEDERSEN-SKOVSGAARD , T.; MOLLER, R.; SVENDSEN, K. D.; JAKOBSEN, M.; PEDERSEN, B. K. Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. **British Journal of Nutrition** v.104, p.1831–1838, 2010.

ANDREWS, W.H.; FLOWERS, R.S.; SILLIKER, J.; BAILEY, J.S. Salmonella. In: DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4. ed. Washington: APHA, 2001. p.357-380.

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

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

AUERBACH, M.H.; CRAIG, S.A.S.; HOWLETT, J.F.; HAYES, K.C. Caloric availability of polydextrose. **Nutrition Reviews**, v.65, n.12, p.544-549, 2007.

AYKAN, V.; SEZGIN, E.; GUZEL-SEYDIM, Z. B. Use of fat replacers in the production of reduced-calorie vanilla ice cream. **European Journal of Lipid Science *and* Technology**. 110, p.516–520, 2008.

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. 480 p.

BENJAMINS, J.; VINGERHOEDS, M. H.; ZOET, F. D.; HOOG, E. H. A.; VAN AKEN, G. A. Partial coalescence as a tool to control sensory perception of emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n.1, p.102 -115, 2009.

BLIGH, E.G. and DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, n.37, p.911–917, 1959.

BOLLIGER, S.; GOFF, H.; THARP, B. Correlation between colloidal properties of ice cream mix and ice cream. **International Dairy Journal**, v. 10, n.04, p. 303-309, 2000.

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

CAVENDER, G. A.; KERR, W. L. Microfluidization of full-fat ice cream mixes: effects of gum stabilizer choice on physical and sensory changes. **Journal of Food Process Engineering**, v. 36, n.1, p. 29-35, 2013.

CHANG, C.L. & DECKELBAUM, R.J. Omega-3 fatty acids: mechanisms underlying 'protective effects' in atherosclerosis. **Current Opinion in Lipidology**, 2013 in press. DOI:10.1097/MOL.0b013e3283616364.

CHOO, S.Y.; LEONG, S.K.; HENNA LU, F.S. Physicochemical and sensory properties of ice- cream formulated with virgin coconut oil. **Food Science and Technology International**, v.16, p.531–541, 2010.

CLARKE, C. The science of ice cream. Cambrige: Royal Society of Chemistry, 2004. p.177-179. (RSC Paperbacks).

CRISCIO, T.D.; FRATIANNI, A.; MIGNOGNA, R.; CINQUANTA, L.; COPPOLA, R.;SORRENTINO, E.; PANILI, G. Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.4555–4564, 2010.

CRUZ, A. G.; ANTUNES, A.E.C.; SOUSA, A.L.O.P; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I. Ice cream as a probiotic food carrier. **Food Research International,** v. 42, p.1233-123, 2009.

CRUZ, A. G.; CADENA, R. S.; WALTER, E. H. M.; MORTAZAVIAN, A. M.; GRANATO, D.; FARIA, J. A. F.; BOLINI, H. M.A. Sensory Analysis: Relevance for Prebiotic, Probiotic, and Synbiotic Product Development. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, p. 358-373, 2010.

CRUZ, A.G.; ANTUNES, A.E.C.; HARAMI, J.B.; SOUSA, A.L.O.P.; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I. Sorvetes probióticos e prebióticos. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F., Eds. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas.** 1. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2011a, cap. 15, p. 359-388.

CRUZ, A.G.; CADENA, R. S.; FARIA, J. A. F.; BOLINI, H. M. A. Análise Sensorial de Produtos Alimentícios Probióticos e Prebióticos. In SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F., eds **Probióticos e prebióticos em alimentos**:

fundamentos e aplicações tecnológicas. São Paulo: Varela, 2011b. cap. 8, p.195-222.

EL-NAGAR, G.; CLOWES, G.; TUDORYCĂ, 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.

FERRAZ, J. L.; CRUZ, A. G.; CADENA, R.S.; FREITAS, M.Q.; PINTO, U.M.; CARVALHO, C.C.; FARIA, J.A.F.; BOLINI, H.M.A. Sensory acceptance and survival of probiotic bacteria in ice cream produced with different overrun levels. **Journal of Food Science**, v. 71, n.1, p.S24-S28, 2012.

FRANCK, A. Food Applications of Prebiotcs. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. **Handbook of Prebiotics**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, p.443-445, 2008.

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

GOFF, H.D. & HARTEL, R. W. Ice cream and frozen desserts. In: Hui, Y. H., ed. **Handbook of Food Science, Technology and Engineering**. Boca Raton. FL: CRC/Taylor & Francis. vol. 4, 2006, p.154-1 to 154- 48.

GOFF, H.D. 65 years of ice cream science. **International Dairy Journal**, v.18, n.7, p.754-758, 2008.

GOFF, H.D.; HARTELL, R. W. Ice Cream. 7. ed., New York, Springer, 462p, 2013.

GOFF, H.D. 2005. Structure of the ice-cream. Dairy Science and Technology website. University of Guelph. Disponível em http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/icstructure.html. Acesso em 31 jan. 2013.

GRANGER, C.; LEGER, A.; BAREY, P.; LANGENDORFF, V.; CANSELL, M. Influence of Formulation on the Structural Networks in Ice Cream. **International Dairy Journal,** v. 15, p.255–262, 2005.

HARAMI, J.B**.** Desenvolvimento de cereal em barra com gelado comestível simbiótico. São Paulo, 133p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, 2008.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl from lipids. Laboratory Practice, London, v. 22, n.3, p. 475-473, 1973.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. (IAL). **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde. 2005, 1018p.

KARACA, O. B., GÜVEN, M., YASAR, K., KAYA, S., & KAHYAOGLU, T. The functional, rheological and sensory characteristics of ice creams with various fat replacers. **International Journal of Dairy Technology**, v.62, n.1, p.93-99, 2009.

LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. **Sensory evaluation of food**: **principles and practices**. Gaithersburg: Aspen, 1999. 827p (Chapman & Hall food science book).

LIM, S.-Y.; SWANSON, B. G.; ROSS, C. F.; CLARK, S. High Hydrostatic Pressure Modification of Whey Protein Concentrate for Improved Body and Texture of Low-fat Ice cream. **Journal Dairy Science**, v.91, p.1308–1316, 2008.

LIU, H.; XU, X. M.; GUO, S. D. Comparison of full-fat and low-fat cheese analogues with or without pectin gel through microstructure, texture, rheology, thermal and sensory analysis. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, p.1581-1592, 2008.

LOTTENBERG, A. M.P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n.5, 2009.

MARSHALL, R. T.; GOFF, H.D.; HARTEL, R.W. Composition and properties. In Ice Cream 6 ed.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, 2003, p.11–54.

MEILGAARD, M.C.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory Evaluation Techniques**, 4 ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2007, 448p.

MOHAMMADI, R.;MORTAZAVIAN A. M. ; KHOSROKHAVAR, R. ; CRUZ, A. G. Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. **Annals of Microbiology***,* v.61, p.411 – 424, 2011 (review).

MUSE, M.R.; HARTEL, R.W. Ice cream structural elements that affect melting rate and hardness. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.4, p.1-10, 2004.

OLIVEIRA, M.L.M.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S. Cellular and molecular biomarkers involved in immune-inflammatory response modulated by unsaturated fatty acids. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.2, p.113-124, 2013.

PAULA, C. M. Utilização de bactérias do grupo *Lactobacillus casei* no desenvolvimento de sorvete potencialmente probiótico de leite de cabra e polpa de cajá (*Spondias mombin*). São Paulo-SP, 84p. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 2012.

RECHSTEINER, M. S. Desenvolvimento de amidos fosfatos de bata-doce e mandioca e aplicação como substituto de gordura em sorvetes. Botucatu-SP, 152p. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Agronômicas- Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita filho”, 2009.

REGAND, A.; GOFF, H. D Structure and ice recrystallization in frozen stabilized ice cream model systems. **Food Hydrocolloids**, p. 17:95–102, 2003.

ROSSA, P. N.; BURIN, V. M.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Effect of microbial transglutaminase on functional and rheological properties of ice cream with different fat contents. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, p.224-230, 2012.

ROUSSEAU, B. Sensory evaluation techniques. In: NOLLET, L.M.L., ed. Handbook of food analysis. 2. ed. New York, Basel: Marcel Dekker, 2004. **Food science and technology,** cap.2, v.138, p. 21-37.

SAMPAIO, K. L.; BEHRENS, J. H.; SILVA, M. A. A. P. Influência da Expectativa do Consumidor na Aceitação de Produtos Probióticos e Prebióticos In SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F., eds **Probióticos e prebióticos em alimentos**: fundamentos e aplicações tecnológicas. São Paulo: Varela, 2011. cap. 9 p. 223-237.

SANTOS, G.G.; SILVA, M.R. Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomez) ice cream prepared with fat replacers and sugar substitutes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n.3, p. 621-628, 2012.

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, p. 241-292, 2008.

SAZAWAL, S.; DHINGRA, U.; HIREMATH, G.; SARKAR, A.; DHINGRA ,P.; DUTTA, A.; DUTTA, A.; MENO, V. P.; BLACK , R E. Effects of *Bifidobacterium lactis HN019* and Prebiotic Oligosaccharide Added to Milk on Iron Status, Anemia, and Growth Among Children 1 to 4 Years Old. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition** (JPGN), v. 51, n. 3, p. 341-346, 2010.

SILVA JUNIOR, E. & LANNES, S. C. S. Effect of different sweetener blends and fat types on ice cream properties. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n.1, p. 217-220, 2011.

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

SOLER, M.P.; VEIGA, P.G. Sorvetes. Campinas: ITAL/CIAL, 2001. 68 p. (Série Publicações Técnicas de informações de alimentos).

STANLEY, D. W.; GOFF, H.D.; SMITH, A. K. Texture-structure relationships in foamed dairy emulsions. **Food Research International**, v.29, n.1, p.1-13, 1996.

SUDHEENDRAN, S., CHANG, C.C. & DECKELBAUM, R.J. N-3 vs. saturated fatty acids: effects on the arterial wall. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 82, p.205-209, 2010.

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.

XINYI, E.; PEI, Z.J.; SCHMIDT, K. A. Ice cream: foam formation and stabilization—a review**. Food Reviews International**, v**.** 26, p.122–137, 2010.

YILSAY, T.O.; ·YILMAZ, L.; BAYIZIT, A. A. The effect of using a whey protein fat replacer on textural and sensory characteristics of low-fat vanilla ice-cream. **European Food Research and Technology**, v.222, p.171-175, 2006.

Anexo I- Controle do pH (média ± desvio padrão) durante os testes de sobrevivência às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, após 2, 28, 56, 84 e 112 dias de armazenamento a -18±3º C.

Armazenamento (Dias)	Tempo do teste (horas)	Controle de pH do Ensaio *In Vitro*			
		F1	F2	F3	F4
2	0h	5,56 ± 0,01	5,55 ± 0,03	5,50 ± 0,01	5,59 ± 0,05
	0-2h	2,53 ± 0,02	2,47 ± 0,10	2,56 ± 0,06	2,56 ± 0,02
	2-4h	5,00 ± 0,14	5,12 ± 0,22	5,33 ± 0,03	5,57 ± 0,03
	4-6h	7,08 ± 0,02	7,17 ± 0,06	7,21 ± 0,01	7,25 ± 0,03
28	0h	5,58 ± 0,02	5,57 ± 0,02	5,60 ± 0,01	5,47 ± 0,03
	0-2h	2,60 ± 0,03	2,51 ± 0,01	2,59 ± 0,04	2,53 ± 0,03
	2-4h	5,19 ± 0,03	5,00 ± 0,14	5,26 ± 0,01	5,34 ± 0,04
	4-6h	7,13 ± 0,02	7,08 ± 0,02	7,23 ± 0,01	7,21 ± 0,01
56	0h	5,58 ± 0,02	5,58 ± 0,03	5,59 ± 0,02	5,50 ± 0,01
	0-2h	2,48 ± 0,03	2,53 ± 0,02	2,53 ± 0,01	2,70 ± 0,01
	2-4h	5,25 ± 0,03	5,12 ± 0,22	5,36 ± 0,02	5,45 ± 0,05
	4-6h	7,20 ± 0,03	7,17 ± 0,06	7,24 ± 0,01	7,38 ± 0,01
84	0h	5,58 ± 0,01	5,61 ± 0,01	5,59 ± 0,02	5,52 ± 0,01
	0-2h	2,52 ± 0,06	2,48 ± 0,07	2,59 ± 0,02	2,54 ± 0,04
	2-4h	5,08 ± 0,01	5,23 ± 0,01	5,21 ± 0,04	5,26 ± 0,07
	4-6h	7,17 ± 0,04	7,03 ± 0,02	7,19 ± 0,04	7,27 ± 0,07
112	0h	5,67 ± 0,01	5,62 ± 0,00	5,68 ± 0,01	5,56 ± 0,06
	0-2h	2,51 ± 0,02	2,54 ± 0,03	2,56 ± 0,05	2,52 ± 0,09
	2-4h	5,36 ± 0,05	5,40 ± 0,04	5,40 ± 0,03	5,32 ± 0,09
	4-6h	7,29 ± 0,02	7,01 ± 0,03	7,29 ± 0,01	7,19 ± 0,03

Anexo II- Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP. Protocolo aprovado em reunião 29/11/2010.

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF/136/2010
Protocolo CEP/FCF/561
CAAE: 0022.0.018.000-10

I – Identificação:

Projeto de Pesquisa:	Sorvete simbiótico. Desenvolvimento de produto de baixa caloria e avaliação da resistência dos probióticos 'in vitro'.
Pesquisador Responsável:	Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad
Instituição:	Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF-USP/SP
Área Temática Especial:	-
Patrocinadores:	FAPESP

II - Sumário Geral do Protocolo:

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

Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo desenvolver um sorvete simbiótico com polpa de fruta e de baixo teor energético, elaborado com a adição de culturas probióticas (Lactobacillus acidophilus NCFM e Bifidobacterium lactis HN019) e do prebiótico inulina. Serão realizados delineamentos fatoriais com 4 formulações, totalizando 24 ensaios, avaliando a influência do concentrado proteíco de soro de leite e da inulina sobre viabilidade probiótica aos diferentes períodos de armazenamento e sob às condições gástricas e entéricas simuladas in vitro, incluindo também a avaliação da aceitabilidade sensorial do novo produto.

Os objetivos do presente estudo são:

O projeto apresenta como objetivo geral, desenvolver um sorvete funcional com polpa de fruta tropical (graviola) e com teor reduzido de calorias (substituição da gordura láctea e/ou sacarose) processado com as culturas probióticas de Lactobacillus acidophilus NCFM e Bifidobacterium lactis HN019, com e sem a presença do prebiótico inulina.

Para tanto, serão desenvolvidos objetivos específicos:

Avaliar o efeito do congelamento (–18±3°C) sobre a sobrevivência dos probióticos e as características tecnológicas de cada formulação, com objetivo de estabelecer a formulação

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) - 3091-3622 - Fone / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: cepfcf@usp.br

mais adequada, a fim de se obter um sorvete de baixa caloria com boa viabilidade probiótica e aceitação sensorial.

Verificar a resistência *in vitro* dos probióticos nos produtos ao longo do seu armazenamento, às condições gástricas e entéricas simuladas e o efeito da adição dos ingredientes – gordura láctea, WPC (concentrado protéico de soro de leite), edulcorantes e prebiótico (inulina) - sobre essa resistência.

Descrição da Casuística:

Será realizada a análise sensorial das formulações constantes no projeto, tendo a previsão de até 1080 voluntários adultos saudáveis (provadores não treinados), podendo ser alunos de graduação e de pós- graduação, docentes e funcionários da Universidade de São Paulo ou outros voluntários que queiram participar do estudo.

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

III – Situação do Protocolo: APROVADO em reunião de 29/11/2010.

O pesquisador deverá:

- Comunicar ao CEP:
  - Eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
  - A interrupção do projeto;
- Apresentar relatório parcial em julho/2012 e relatório final em dezembro/2013.

São Paulo, 30 de novembro de 2010.

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

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) - 3091-3622 - Fone / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: cepfcf@usp.br

Anexo III-Termo de consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

Nome do Provador: ..... Data de Nascimento: ...../...../.....
Documento de Identidade nº: .....Órgão emissor: ..... Sexo: ( ) M ( ) F
Endereço: ..... Apto: .....
Bairro: ..... Cidade: ..... CEP: .....
Endereço eletrônico (*e-mail*): ..... Telefone: .....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa: Sorvete simbiótico. Desenvolvimento do produto de baixa caloria e avaliação da resistência dos probióticos *in vitro*.
2. Pesquisador: Profª. Drª. Susana Marta Isay Saad
3. Cargo/Função: docente Departamento da FCF/USP: **Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica**
4. Avaliação do Risco da pesquisa: Risco Mínimo (X) Risco Médio ( ) Risco Baixo (X) Risco Maior ( ). **5.** Duração da Pesquisa: 4 anos (análise sensorial – 2 anos)

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PROVADOR OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

Justificativa, objetivos e procedimentos

Você está sendo convidado para participar da análise sensorial de um produto semelhante ao sorvete com polpa de fruta de graviola. Este produto tem como característica, além da presença de leite como sua principal matéria prima e microrganismos que contribuem com a função intestinal e/ou fermentam o produto. O desenvolvimento sorvete de graviola de baixo teor calórico e com adição de probiótico e/ou prebiótico é feito pela doutoranda Graziela Leal Sousa, sob orientação da Profª. Drª. Susana Marta Isay Saad. O produto foi elaborado e acondicionado, de acordo com as Boas Práticas de Fabricação de Alimentos, nos laboratórios do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica FCF/USP. Participarão deste estudo no mínimo 30 pessoas para cada sessão (4 formulações x 3 períodos de armazenamento x 2 delineamentos), conforme item **4.4** poderão participar até 720 voluntários adultos (provadores não treinados). Caso você tenha interesse em participar, acomode-se junto a uma das cabines do Laboratório de Análise Sensorial (B16).

O produto a ser avaliado nesta análise é feito à base de leite. As formulações são constituídas também por sacarose (açúcar), polpa de graviola, gomas, edulcorantes, aroma e microrganismos que contribuem com a função intestinal e/ou fermentam o produto (*Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Bifidobacterium* HN019). Todos os ingredientes da formulação são utilizados em produtos disponíveis para consumo humano, ou seja, são de grau alimentício.

Para participar desta análise, você: deve ter entre 18 e 60 anos, gostar de produtos lácteos *light* em açúcar e gordura, tais como sorvetes, bebidas lácteas, iogurtes, sobremesas, e ser consumidor regular destes produtos. Você não deve participar se possuir histórico de manifestação de alergia, intolerância ou outro tipo de restrição (como doença crônica ou tratamento médico com uso de medicamentos que podem interagir com os ingredientes); não deve estar gripado, resfriado ou indisposto ou ter entrado em contato há menos de 1 hora com materiais, alimentos ou cosméticos de cheiro forte. Atendendo a essas condições você poderá participar da análise sensorial do produto.

Você receberá uma amostra e uma ficha de avaliação. A amostra contém aproximadamente 50 g, apresentada na forma gelado semi-sólido. Prove a amostra e registre na ficha sua opinião com relação ao produto de uma maneira geral fazendo um "x" em um lugar na escala de 1 a 9, onde, 1 = desgostei

muitíssimo e 9 = gostei muitíssimo. Em seguida, escreva o que você mais gostou e o que menos gostou na amostra.

Desconfortos e riscos

Os riscos de sua participação neste estudo são mínimo. Não foram encontradas evidências de risco ou desconforto relacionado à análise sensorial em estudos deste tipo. Pelo fato do sorvete de graviola de baixo teor calórico possuir, em sua composição os microrganismos probióticos e prebioticos que auxiliam na função intestinal e os ingredientes, tais como fibra alimentar e os edulcorantes em quantidades que são reconhecidamente seguros, sendo que os possíveis desconfortos (gases e dores abdominais) são mínimos.

Benefícios esperados

Não há nenhum benefício direto. Porém, você contribuirá para o desenvolvimento de alimentos com características sensoriais adequadas às expectativas de futuros consumidores.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

Caso você não queira continuar participando da pesquisa, a qualquer momento você pode desistir, sem que haja qualquer penalidade. Havendo qualquer dúvida com relação aos procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa você deve comunicar ao grupo de pesquisa a qualquer momento. É assegurado que todas as informações pessoais serão confidenciais, o sigilo e privacidade também são garantidos, mesmo que os resultados sejam publicados em periódicos científicos.
Não haverá remuneração financeira aos participantes das análises sensoriais.

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Graziela Leal Sousa e Susana Marta Isay Saad.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 CEP 05508-000 São Paulo-SP.
Telefone: (11) 3091-2379

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

.....

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

"Estou ciente do objetivo do teste, sou consumidor de produtos à base de leite e de edulcorantes, não apresento reação alérgica ou intolerância aos ingredientes, tenho entre 18 e 60 anos, não tenho nenhuma doença crônica (como diabetes, hipotiroidismo, hipertiroidismo, hipertensão ou outras), não estou fazendo tratamento médico (tomando algum medicamento) e aceito participar dessa análise."
Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

_____ _____

Assinatura do sujeito de pesquisa Assinatura do pesquisador responsável

Profª. Drª. Susana Marta Isay Saad

Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – Bloco 13A
CEP 05508-900 São Paulo – SP
(11) 3091-3677 - cepfcf@usp.br

Anexo IV- Modelo da ficha de avaliação sensorial utilizada no presente trabalho.

Ficha para teste de aceitação – produto semelhante ao sorvete com polpa de fruta de graviola e com teor reduzido de calorias.

Nome: _____
Data: ___/___/_____

Amostra: _____

Você recebeu uma amostra de um produto semelhante ao sorvete com polpa de fruta de graviola. Por favor, prove a amostra e avalie de maneira geral (aparência, sabor e textura) usando a escala abaixo o seu grau de aceitação relacionado ao produto.

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

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

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

Obrigado pela participação!

Anexo V - Ficha do aluno.

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9133 - 3559562/1 - Graziela Leal Sousa

Email:	glsouza@usp.br
Data de Nascimento:	01/12/1978
Cédula de Identidade:	RG - 29.847.241-7 - SP
Local de Nascimento:	Estado do Piauí
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Ciências dos Alimentos - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2006
Mestrado:	Mestre em Ciência dos Alimentos - Área: Bromatologia - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2008

Curso:	Doutorado
Programa:	Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área:	Tecnologia de Alimentos
Data de Matrícula:	07/07/2009
Início da Contagem de Prazo:	07/07/2009
Data Limite para o Depósito:	04/11/2013
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Susana Marta Isay Saad - 07/07/2009 até o presente. E.Mail: susaad@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 07/07/2009
Prorrogação:	120 dias Periodo de 07/07/2013 a 04/11/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 26/08/2011
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Ingressou no Doutorado em 07/07/2009 Prorrogação em 12/06/2013 Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2013

Aluno matriculado nas normas vigentes a partir de 01/07/2009
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2013
Impresso em: 02/11/13 18:30:05

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9133 - 3559562/1 - Graziela Leal Sousa

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
MAE5755 - 6/1	Métodos Estatísticos Aplicados às Ciências Biológicas (Instituto de Matemática e Estatística - Universidade de São Paulo)	17/08/2009	04/12/2009	120	0	96	R	N	Concluída
FBA5896 - 6/1	Tópicos em Ciência dos Alimentos e Nutrição II	02/09/2009	10/11/2009	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5739 - 3/1	Desenvolvimento de Alimentos *Funcionais*	03/03/2010	13/04/2010	30	2	100	A	N	Concluída
FBT5781 - 3/3	Culturas Probióticas: Aplicações Tecnológicas	04/05/2010	15/06/2010	60	4	92,3	C	N	Concluída
FBT5776 - 4/4	Tópicos Especiais de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica II	16/08/2010	29/08/2010	30	2	83	A	N	Concluída
EDM5105 - 1/1	Docência no Ensino Superior e Complexidade: Contextos, Formação e Práticas (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	20/08/2010	30/11/2010	120	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBT5715 - 6/4	Complementos de Matemática Aplicada para Biotecnologia	*05/04/2011*	*31/05/2011*	*120*	*8*	*80*	C	N	Concluída
FBT5773 - 6/2	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	07/04/2011	16/06/2011	30	2	90	A	N	Concluída
FBA5844 - 2/1	Tópicos em Biotecnologia de *Alimentos*	10/10/2011	16/10/2011	30	0	0	-	N	Matrícula *cancelada*
FBC5800 - 4/1	Temas Avançados em Ciências e Tecnologia Farmacêutica I	17/10/2011	23/10/2011	30	2	80	A	N	Concluída
FBT5708 - 1/2	Cristalização Aplicada a Fármacos e Alimentos	18/09/2012	22/10/2012	45	3	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	25	25
Estágios:			
Total:	0	25	25

Créditos Atribuídos à Tese: *167*

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2013
Impresso em: 02/11/13 18:30:05

Anexo VI- Curriculum lattes.

http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4732814H1