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

**Desenvolvimento de cereal em barra com
gelado comestível simbiótico**

Juliana Bolfarini Harami

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientadora:

Prof. Dra. Susana Marta Isay Saad

São Paulo

2008

DEDALUS - Acervo - CQ

30100015117

Ficha Catalográfica

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

H254d Harami, Juliana Bolfarini
Desenvolvimento de cereal em barra com gelado comestível
simbiótico / Juliana Bolfarini Harami. -- São Paulo, 2008.
113p.

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

Orientador: Saad, Susana Marta Isay

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

664 CDD

Juliana Bolfarini Harami

Desenvolvimento de cereal em barra com gelado comestível simbiótico

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a. Dr^a. Susana Marta Isay Saad
Orientadora/Presidente

Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli
1º examinador

Prof. Dr. Elizeu Antonio Rossi
2º examinador

São Paulo, 06 de março de 2009.

DEDICATÓRIA

A meus pais, Jurema e Persio, pelo apoio sem questionamentos, mesmo quando todas as dúvidas eram minhas.

À minha orientadora Susana Saad pela orientação durante o mestrado e para a minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por a cada dia fortalecer minha fé.

Aos amigos, Flávia, Cíntia, Regina, Raquel, Roberta, Daniel, Lucas, Elieste, Alexandre, Haissa, Ana Carolina, Bruno, Chiu e Maurício, que com tanto carinho me receberam e de maneira fundamental contribuíram para a concretização deste trabalho.

À Profa. Dra. Inar Castro e ao Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli, por colaborarem na realização deste trabalho e por supervisionarem meus estágios junto ao Programa de Aperfeiçoamento de Ensino.

Ao Prof. Dr. Elizeu Antonio Rossi, por despertar seus alunos para estruturar uma vida profissional baseada no caráter e em sólidos conhecimentos.

Aos técnicos Alexandre, Gledson, Nilton, Ivani e Fátima, que me auxiliaram tanto na condução dos processos e análises realizados durante meu trabalho, quanto para o bom andamento das tarefas do dia-a-dia.

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

Às empresas Danisco, Clariant, Beraca, Ray Ingredients, Givaudan, Ferla, Cerealle, Kerry, Marquipan, Apiário Ísis, CP Kelco e Christian Hansen que prestativamente forneceram parte dos ingredientes utilizados neste trabalho.

À Leila Aparecida Bonadio e Adriana de Almeida Barreiros, pela atenção e colaboração na correção das referências bibliográficas.

A todos que direta ou indiretamente participaram na elaboração e finalização deste trabalho.

Se um dia tudo lhe parecer difícil, lembre-se de que você nasceu para conseguir através de seus esforços tudo o que desejar e que os esforços nunca se perdem, somente dignificam as pessoas.

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS	1
1.2 A MICROBIOTA GASTRINTESTINAL	2
1.3 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS.....	3
1.3.1 Mecanismos de ação propostos para a atuação dos microrganismos probióticos sobre a saúde gastrointestinal humana	4
1.3.2 O potencial probiótico de <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium</i> spp., com destaque à ação benéfica de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 e <i>Bifidobacterium animalis</i> Bb-12 para a saúde do hospedeiro	6
1.3.3 Possíveis efeitos adversos / colaterais causados por probióticos	8
1.4 AS FIBRAS ALIMENTARES E OS PREBIÓTICOS	9
1.4.1 Prebióticos e os potenciais benefícios à saúde.....	12
1.4.2 Possíveis efeitos adversos causados por prebióticos	13
1.5 ALIMENTOS FUNCIONAIS PROBIÓTICOS.....	14
1.5.1 Desafios tecnológicos para a obtenção de alimentos funcionais probióticos ...	15
1.6 ALIMENTOS FUNCIONAIS PREBIÓTICOS – A INULINA COMO INGREDIENTE PREBIÓTICO E SUA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS	18
1.7 ALIMENTOS SIMBIÓTICOS	19
1.8 REDUÇÃO DO TEOR DE GORDURA EM ALIMENTOS: A UTILIZAÇÃO DE UM SUBSTITUTO DE GORDURA DE BASE PROTÉICA.....	19
1.9 SOBREMESAS LÁCTEAS CONGELADAS: OS “GELADOS COMESTÍVEIS” COMO POTENCIAIS ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	21
1.9.1 O desenvolvimento de sobremesas lácteas congeladas probióticas e simbióticas	24
1.10 BARRA DE CEREAL: UM NOVO CONCEITO DE “ALIMENTO SAUDÁVEL” ..	26
1.11 O CONTEXTO PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO ALIMENTÍCIO FUNCIONAL.....	29
2. OBJETIVOS	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 DESCRIÇÃO DO PRODUTO ALIMENTÍCIO DESENVOLVIDO.....	33
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
3.3 ENSAIOS PRELIMINARES.....	34
3.3.1 Definição da porção do produto	34
3.3.2 Ensaios preliminares para a definição das formulações e das etapas do processo de produção.....	35
3.3.2.1 Ensaios preliminares para porção gelado comestível	35
3.3.2.2 Definição da quantidade e condições de incorporação de <i>L. acidophilus</i> La-5 e <i>B. animalis</i> Bb-12 ao produto.	38
3.3.2.3 Testes realizados com a porção “cereais em barra”	39
3.3.3 Ensaios realizados para a seleção dos meios de cultura utilizados durante o estudo	39

3.4 ENSAIOS DEFINITIVOS	41
3.4.1 Ingredientes	41
3.5 REPETIÇÕES, CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E PERÍODOS DE AMOSTRAGEM.....	48
3.5.1 Repetições.....	48
3.5.2 Condições de armazenamento	48
3.5.3 Períodos de amostragem.....	48
3.6 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS	49
3.6.1 Parâmetros físico-químicos	49
3.6.1.1 Preparo das amostras e metodologias utilizadas na determinação da composição centesimal do produto desenvolvido.....	49
3.6.1.2 Cálculo do valor energético total (VET)	51
3.6.1.3 pH	51
3.6.1.4 <i>Overrun</i> – Incorporação de ar.....	51
3.6.1.5 Fração de derretimento	51
3.6.1.6 Avaliação do parâmetro dureza a partir da análise de textura instrumental .	52
3.6.2 Determinação dos parâmetros microbiológicos	54
3.6.2.1 Contagem dos microrganismos probióticos no leite pré-enriquecido e no produto final.....	54
3.6.2.2 Determinação dos parâmetros microbiológicos sanitários.....	55
3.7 ANÁLISE SENSORIAL	56
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	59
4.1 Parâmetros físico-químicos	59
4.1.1 Composição centesimal.....	59
4.1.2 Valores de pH obtidos	61
4.1.3 Incorporação de ar (<i>overrun</i>)	62
4.1.4 Fração de derretimento	63
4.1.5 Comportamento do parâmetro dureza da análise instrumental de textura	66
4.2 PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS	69
4.2.1 Parâmetros microbiológicos sanitários	69
4.2.2 Viabilidade dos microrganismos probióticos nos leites pré-enriquecidos e na porção gelado comestível.....	69
4.3 ANÁLISE SENSORIAL	78
5. CONCLUSÃO	86
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABELAS

Página

Tabela 1. Matriz de planejamento fatorial para a elaboração da porção gelado comestível do produto desenvolvido.	34
Tabela 2. Sobremesas lácteas congeladas compostas de ingredientes diversificados, disponíveis no mercado brasileiro para consumo em porção individual.	36
Tabela 3. Delineamento experimental e proporções definidas para os constituintes das formulações da porção gelado comestível para os tratamentos T1, T2, T3 e T4.	42
Tabela 4. Proporção dos ingredientes utilizados nos ensaios definitivos realizados para a porção gelado comestível do produto em estudo.....	42
Tabela 5. Proporção dos ingredientes utilizados nos ensaios definitivos realizados para a porção cereais em barra do produto em estudo.....	43
Tabela 6. Composição centesimal, teor de sólidos totais e valor energético total obtidos (média $\pm$ desvio padrão) para a porção gelado comestível T1, T2, T3 e T4 e para a porção barra de cereais.	59
Tabela 7. Composição em nutrientes e valor energético total obtidos para as porções* de 70g para cada formulação da sobremesa láctea congelada (média $\pm$ desvio padrão).	60
Tabela 8. Valores de pH obtidos (média $\pm$ desvio padrão) para os diferentes tratamentos da porção gelado comestível (T1 a T4), no dia 0 (após resfriamento da calda), no dia 1 (após maturação da calda por 20 a 22h) e ao final do período de armazenamento (168 dias) do produto.	61
Tabela 9. Valores de <i>overrun</i> (média $\pm$ desvio padrão), obtidos para os diferentes tratamentos da porção gelado comestível (T1 a T4), após agitação e congelamento simultâneos por 25 minutos a -8 a -9°C em produtora para sorvetes.....	62
Tabela 10. Fração de derretimento (média $\pm$ desvio padrão) obtida para os diferentes tratamentos da porção gelado comestível (T1 a T4), após 14 dias de armazenamento sob congelamento ($-18\pm 3^{\circ}\text{C}$).....	63
Tabela 11. Valores de dureza (média $\pm$ desvio padrão) obtidos para os diferentes tratamentos da porção gelado comestível (T1 a T4), armazenados sob congelamento ($-18\pm 3^{\circ}\text{C}$) por 14 dias.....	67
Tabela 12. Populações de <i>Lactobacillus acidophilus</i> obtidas (média $\pm$ desvio padrão) para os diferentes tratamentos da porção gelado comestível (T1 a T4) durante o processamento ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$) - dia 0 (após resfriamento) e dia 1 (após maturação por 20 a 22 horas) - e durante o armazenamento ($-18\pm 3^{\circ}\text{C}$) por até 168 dias.	71
Tabela 13. Populações de <i>B. animalis</i> obtidas (média $\pm$ desvio padrão) para os diferentes tratamentos da porção gelado comestível (T1 a T4) durante o processamento ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$) - dia 0 (após resfriamento) e dia 1 (após maturação por 20 a 22 horas) - e durante o armazenamento ($-18\pm 3^{\circ}\text{C}$) por até 168 dias.	71
Tabela 14. Resultados de aceitabilidade sensorial (média $\pm$ desvio padrão) para os diferentes tratamentos da sobremesa láctea congelada avaliados durante o armazenamento a $-18\pm 3^{\circ}\text{C}$, por até 84 dias	79

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Página

Quadro 1. Exemplos de produtos alimentícios adicionados de bactérias probióticas e potencialmente probióticas descritos na literatura.....	17
Quadro 2. Cronograma dos períodos de amostragem adotados para a realização das análises físico-químicas e microbiológicas.	48
Figura 1. Principais mecanismos de ação envolvidos na proteção e manutenção da saúde do hospedeiro por parte dos microrganismos probióticos.....	6
Figura 2. Sobremesa láctea congelada desenvolvida, com dimensões aproximadas de 8,5 x 3,5 x 2,5 cm e 70 g por porção (50 g de gelado comestível e 20 g de barra de cereal).....	33
Figura 3. Fluxograma utilizado na elaboração da porção gelado comestível da barra de cereais com gelado comestível simbiótico.....	45
Figura 4. Fluxograma utilizado na elaboração da porção barra de cereais da barra de cereais com gelado comestível simbiótico.....	46
Figura 5. Fluxograma utilizado na elaboração do cereal em barra com gelado comestível simbiótico.....	47
Figura 6. Modelo da ficha de avaliação sensorial utilizando escala hedônica estruturada de nove pontos.	57
Figura 7. Amostra da sobremesa láctea congelada e ficha de avaliação sensorial apresentadas aos provadores.	57
Figura 8. Representação gráfica do efeito da adição da inulina sobre o parâmetro velocidade de derretimento, avaliado para a porção gelado comestível da sobremesa láctea congelada desenvolvida. Os valores são expressos pela média e através de barras verticais com intervalo de confiança de 0,95.....	64
Figura 9. Representação gráfica do efeito da adição de um substituto de gordura sobre o parâmetro velocidade de derretimento, avaliado para a porção gelado comestível da sobremesa láctea congelada desenvolvida. Os valores são expressos pela média e através de barras verticais com intervalo de confiança de 0,95.	64
Figura 10. Representação gráfica do efeito da interação da adição da inulina e de um substituto de gordura sobre o parâmetro velocidade de derretimento, avaliado para a porção gelado comestível da sobremesa láctea congelada desenvolvida. Os valores são expressos pela média e através de barras verticais com intervalo de confiança de 0,95.	65
Figura 11. Representação gráfica do efeito da adição da inulina sobre o parâmetro dureza avaliado para a porção gelado comestível da sobremesa láctea congelada desenvolvida. Os valores são expressos pela média e através de barras verticais com intervalo de confiança de 0,95.	68
Figura 12. Representação gráfica do efeito da adição de um substituto de gordura sobre o parâmetro dureza avaliado para a porção gelado comestível da sobremesa láctea congelada desenvolvida. Os valores são expressos pela média e através de barras verticais com intervalo de confiança de 0,95.....	68
Figura 13. Representação gráfica do efeito da interação da adição da inulina e de um substituto de gordura sobre o parâmetro dureza avaliado para a porção gelado	

comestível da sobremesa láctea congelada desenvolvida. Os valores são expressos pela média e através de barras verticais com intervalo de confiança de 0,95. 68

Figura 14. Representação gráfica do efeito do período de armazenamento, a $-18 \pm 3^{\circ}\text{C}$, sobre a população de *L. acidophilus* La-5 adicionada à porção gelado comestível da sobremesa láctea congelada desenvolvida. Os valores são expressos pela média e através de barras verticais com intervalo de confiança de 1,00. 74

Figura 15. Representação gráfica do efeito do período de armazenamento, a $-18 \pm 3^{\circ}\text{C}$, sobre a população de *B. animalis* Bb-12 adicionada à porção gelado comestível da sobremesa láctea congelada desenvolvida. Os valores são expressos pela média e através de barras verticais com intervalo de confiança de 1,00. 74

Figura 16. Representação gráfica do efeito da interação entre o período de armazenamento, a $-18 \pm 3^{\circ}\text{C}$, e a adição da inulina sobre a população de *B. animalis* Bb-12 adicionada à porção gelado comestível da sobremesa láctea congelada desenvolvida. Os valores são expressos pela média e através de barras verticais com intervalo de confiança de 1,00. 75

Figura 17. Distribuição dos provadores, de acordo com o sexo e idade (total = 600 avaliações). 78

Figura 18. Distribuição das notas atribuídas aos diferentes tratamentos avaliados após 7 dias de armazenamento da sobremesa láctea congelada a $-18^{\circ}\text{C} \pm 3$ 80

Figura 19. Distribuição das notas atribuídas aos diferentes tratamentos avaliados após 28 dias de armazenamento da sobremesa láctea congelada a $-18^{\circ}\text{C} \pm 3$ 80

Figura 20. Distribuição das notas atribuídas aos diferentes tratamentos avaliados após 84 dias de armazenamento da sobremesa láctea congelada a $-18^{\circ}\text{C} \pm 3$ 80

Figura 21. Evolução das notas de aceitabilidade para os diferentes tratamentos da sobremesa láctea congelada, medidas através das análises sensoriais durante o período de armazenamento do produto (7, 28 e 84 dias). Os valores estão expressos pela média e barras verticais com intervalo de confiança de 0,95. 81

Figura 22. Número de observações para os atributos mais preferidos (barras dispostas acima do eixo x) e menos preferidos (barras dispostas abaixo do eixo x) mencionados pelos provadores, considerados todos os tratamentos e períodos de armazenamento estudados para a sobremesa láctea congelada. 83

RESUMO

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

Os alimentos funcionais suplementados com microrganismos probióticos e ingredientes prebióticos se destacam por seus impactos positivos sobre a saúde do consumidor, representando uma categoria em ascensão: os produtos alimentícios simbióticos. O presente trabalho objetivou desenvolver um produto alimentício, para consumo em porções individuais, a partir da associação de uma barra de cereais a um gelado comestível com baixo teor de gordura e adicionado dos microrganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* Bb-12, suplementado ou não com o ingrediente prebiótico inulina, verificar a viabilidade dos probióticos, avaliar a aceitabilidade sensorial do produto e suas características físico-químicas durante o seu armazenamento a -18°C. Utilizando um planejamento fatorial 2², foram produzidos (em triplicata) quatro tratamentos da porção gelado comestível, todos adicionados de probióticos: T1 (controle), T2 (adição de inulina), T3 (teor reduzido de gorduras) e T4 (adição de inulina e teor reduzido de gorduras). Os produtos foram armazenados a -18°C por até 168 dias. Os parâmetros avaliados na porção gelado comestível foram: pH (antes e após a maturação da calda e após 168 dias de armazenamento), *Overrun* (após o congelamento), viabilidade dos probióticos (na mistura final e após 1, 2, 7, 14, 21, 28, 84 e 168 dias), dureza instrumental (texturômetro TA-XT2) e fração de derretimento (após 14 dias). Os quatro tratamentos do produto final (barra de cereal em conjunto com a porção gelado comestível) foram avaliados sensorialmente por provadores não treinados, após 7, 28 e 84 dias de armazenamento, utilizando-se teste de aceitabilidade, com escala estruturada de nove pontos. As análises para determinação da composição centesimal da porção gelado comestível e da barra de cereais foram realizadas, para cada porção individualmente. As populações de *L. acidophilus* e *B. animalis* foram superiores a 7 log UFC/g, por até 168 dias nas formulações suplementadas com inulina e/ou substituto de gordura e a adição de inulina contribuiu para a manutenção da viabilidade de *B. animalis* ao longo do armazenamento. A adição e/ou substituição de ingredientes da formulação do gelado comestível não interferiu nos parâmetros físico-químicos pH e *overrun*. Para a dureza e a velocidade de derretimento, foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$). Entretanto, tais diferenças não se refletiram na aceitação do produto pelo consumidor, uma vez que não foi verificada diferença para a aceitabilidade sensorial entre os quatro tratamentos avaliados, com notas sempre superiores a 7 e sem a interferência do período de armazenamento sobre essa aceitabilidade. O presente trabalho mostrou que a associação de uma barra de cereais a um gelado comestível probiótico não fermentado, com 1,5% de gordura láctea e adicionado de 8% de inulina, é tecnologicamente viável para disponibilizar ao consumidor uma alternativa de alimento funcional simbiótico para consumo em porções individuais.

Palavras chave: Probióticos. Prebióticos. Barras de cereais. Gelado comestível.

ABSTRACT

Harami, J.B. **Development of a frozen dessert associating a cereal bar and a synbiotic ice cream bar.** 2008. 113p. Master Degree Dissertation, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Functional foods supplemented with probiotic microorganisms and prebiotic ingredients are increasingly popular as they improve consumer health, and these foods nowadays form a new group of food products called synbiotic products. The present study aimed to develop a food product for consumption in individual portions, associating a cereal bar and a low fat ice cream bar containing the probiotic microorganisms *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12, supplemented or not with the prebiotic ingredient inulin, to verify the viability of the probiotics and to evaluate the sensory acceptability of the products and their physical-chemical characteristics during storage at -18°C. Employing a 2² design, four trials of the ice cream portion were produced in triplicate, all of them supplemented with probiotics: T1 (control), T2 (with inulin), T3 (with reduced fat content) and T4 (with inulin and reduced fat). The products were stored at -18°C for up to 168 days. The parameters evaluated in the ice cream portion included: pH (before and after the aging of the mix, and after 168 days of storage); overrun (after the freezing stage); viability of the probiotics (in the final mixture and after 1, 2, 7, 14, 21, 28, 84, and 168 days); instrumental hardness (TA-XT2 texturometer); and melting rate (after 14 days). The four trials of the final product (cereal bar associated with ice cream bar) were submitted to sensory evaluation by an untrained panel, employing the acceptability test, with a 9-point structured hedonic scale, after 7, 28, and 84 days of storage. The compositional analyses of the ice cream and cereal bars were carried out individually for each portion. The populations of *L. acidophilus* e *B. animalis* were above 7 log CFU/g, for up to 168 days for the formulations supplemented with inulin and/or fat substitute, and the addition of inulin contributed to the maintenance of the viability of *B. animalis* throughout storage. The addition and/or substitution of ingredients in the ice cream formulations did not significantly affect pH and overrun. As for hardness and melting rate, significant differences were observed ($p < 0.05$). However, such differences did not influence the product acceptance by the consumer, as no differences for sensory acceptability between the four trials evaluated was observed, and scores were always above 7, without any interference of the storage period on this acceptability. The study showed that the association of a cereal bar and a low fat non-fermented probiotic ice cream, containing 1.5% milk fat and supplemented with 8.0% inulin, is technologically feasible to provide consumers with a synbiotic functional food product, as an option for consumption of individual portions.

Keywords: Probiotics. Prebiotics. Cereal bar. Ice cream.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

A Nutrição, a partir dos conceitos de prevenção às deficiências primárias, vem evoluindo para o estabelecimento de diretrizes para uma alimentação balanceada na promoção do estado de bem-estar, saúde e na redução do risco de doenças (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION, 2004).

A dieta é o principal foco das estratégias para se manter uma boa saúde durante a vida, reduzindo o risco para a ocorrência precoce de patologias, como distúrbios gastrointestinais, doenças cardiovasculares, câncer e osteoporose, assim como para proporcionar um envelhecimento com qualidade de vida (WEISBURGER, 2000; MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002; GUTKOSKI *et al.*, 2007). Nesse contexto, nunca antes o foco sobre os benefícios à saúde, promovido pelos alimentos ou por seus componentes, esteve tão evidente (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION, 2004).

Embora a complexa relação entre alimento e a saúde seja ainda pouco compreendida, estudos recentes em áreas multidisciplinares trazem novas promessas de avanços no aprimoramento destes conhecimentos (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002; LIONG, 2007). Evidências conectando patologias relevantes, como as doenças cardiovasculares, à dieta, assim como os benefícios e prejuízos que nutrientes específicos acarretam à saúde, apresentam cada vez mais comprovação científica (PARADA & AGUILERA, 2007).

Os alimentos funcionais podem ser definidos como aqueles que, além da nutrição básica, podem proporcionar benefícios à saúde (STANTON *et al.*, 2005; CASTRO & TIRAPEGUI, 2006). Esses alimentos devem apresentar características nutricionais adequadas, de modo que sejam relevantes para o bem estar e/ou na redução dos riscos de doenças, sendo que estes efeitos devem ter sido demonstrados e comprovados em uma ou mais funções alvo do organismo (ROBERFROID, 2005a, PRADO *et al.*, 2008).

Um alimento funcional deve exercer seus efeitos quando consumido em quantidades normalmente encontradas na alimentação convencional. Portanto, os nutracêuticos, que são produtos preparados a base de compostos alimentares e comercializados na forma de cápsulas, pílulas, pós, xaropes, entre outros, não podem ser considerados alimentos funcionais (ROBERFROID, 2005a, PRADO *et al.*, 2008).

No Brasil, a partir do reconhecimento do interesse pelo uso da alimentação como determinante importante para a saúde, da estreita relação entre alimentação – saúde – doença, dos efeitos benéficos de compostos não nutrientes, entre outros, como fatores

que vêm estimulando a produção de novos alimentos, a legislação pertinente considera (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA, 1999a, 1999b):

- Alegação de propriedade funcional: aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano;

- Alegação de propriedade de saúde: aquela que afirma, sugere ou implica a existência da relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde.

Saúde e bem estar dos consumidores são as maiores diretrizes da indústria de alimentos moderna (PARADA & AGUILERA, 2007). O desenvolvimento de alimentos funcionais vem se destacando pelo crescente interesse dos setores comercial, acadêmico e governamental durante as últimas décadas e as previsões são de que a demanda por nutracêuticos e alimentos funcionais continue crescendo, estimulada por novos produtos e pelo aumento do número de consumidores conscientes sobre os assuntos relacionados à saúde (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2005; REDGWELL & FISCHER, 2005; JONES & JEW, 2007).

1.2 A MICROBIOTA GASTRINTESTINAL

A microbiota intestinal é o principal foco de muitos alimentos funcionais desenvolvidos atualmente, devido à atuação do intestino na interface entre a dieta e os eventos metabólicos que dão alicerce à manutenção da saúde do hospedeiro (SALMINEN *et al.*, 1998b; ZIEMER & GIBSON, 1998; ANGUS *et al.*, 2005).

O trato gastrointestinal humano consiste da boca (cavidade oral), faringe, esôfago, estômago, intestino delgado e cólon. A microbiota gastrointestinal do humano adulto é um complexo ecossistema composto por 300 a 500 espécies bacterianas. A parte superior do intestino é escassamente povoada e a partir do íleo a população de bactérias aumenta gradualmente, atingindo 10^{11} - 10^{12} unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) no cólon, sendo a maioria constituída por microrganismos anaeróbios, incluindo os grupos dos clostrídios, eubactérias, bacteroides e bifidobactérias (GUARNER & MALAGELADA, 2003; ISOLAURI *et al.*, 2004; QUIGLEY & QUERA, 2006).

As bactérias presentes no intestino podem ser transitórias ou nativas, sendo estas classificadas por sua atividade potencialmente prejudicial ou promotora da saúde (MARSHALL, 2001; ISOLAURI *et al.*, 2004; PICARD *et al.*, 2005). Uma microbiota saudável pode ser definida como a microbiota normal que conserva e

promove o bem estar e a ausência de doenças, especialmente do trato gastrointestinal (ISOLAURI *et al.*, 2004; O'HARA & SHANAHAN, 2007). 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).

Fatores como *stress*, dieta desbalanceada, tratamento com antibióticos, infecções, intoxicações alimentares e o avanço da idade podem interferir na homeostase gastrointestinal (HOLZAPFEL *et al.*, 1998). A correção das propriedades da microbiota autóctone desbalanceada pode ser realizada por microrganismos probióticos (ISOLAURI *et al.*, 2004; SLOVER & DANZIGER, 2008). Tal conclusão estimula a utilização de alimentos e ingredientes que estimulam a multiplicação e a atividade de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (PUUPPONEN-PIMIÄ *et al.*, 2002; ANGUS *et al.*, 2005; SLEATOR & HILL, 2008).

1.3 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

“Probiótico” é derivado do grego, o qual traz o significado de “para a vida” para este termo, sendo que o primeiro indício da aplicação deste conceito para microrganismos benéficos à saúde ocorreu por volta de 1907. Nesse período, Henry Tissier observou que crianças com diarreia apresentavam, em suas fezes, um baixo número de bactérias caracterizadas por uma morfologia peculiar – as bifidobactérias. Ele constatou que essas bifidobactérias eram abundantes em crianças saudáveis e sugeriu que essas bactérias poderiam ser administradas para pacientes com diarreia, com a finalidade de auxiliar na reestruturação de uma microbiota intestinal saudável (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

Diversas definições para probióticos foram publicadas nos últimos anos (SANDERS, 2003). Esses microrganismos foram classicamente definidos como: suplementos alimentares à base de microrganismos vivos que afetam benéficamente o hospedeiro, promovendo o balanço de sua microbiota intestinal (FULLER, 1989). A definição atualmente aceita refere-se aos microrganismos probióticos como microrganismos vivos que, administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

Os microrganismos benéficos, no entanto, para serem considerados probióticos, além de atuarem favoravelmente no produto alimentício ao qual foram adicionados, devem atender aos seguintes requisitos: sobreviver à passagem através do trato digestivo e também possuir a capacidade de se desenvolver no intestino. Isso significa que eles devem resistir ao pH baixo, suco gástrico e pancreático e à bile do trato gastrointestinal (SAARELA *et al.*, 2000; BEZKOROVAINY, 2001; PUPIN, 2002; GOEL *et al.*, 2006). Outras características que os microrganismos probióticos devem apresentar são: aderência ao epitélio intestinal, ter origem na microbiota intestinal humana sadia, apresentar capacidade de estabilizar a microbiota intestinal e possuir propriedades antígeno-tóxicas e não-patogênicas (GOLDIN, 1998; LEE *et al.*, 1999; SAARELA *et al.*, 2000; GUARNER *et al.*, 2005).

As principais bactérias potencialmente benéficas à saúde pertencem ao grupo das bactérias lácticas (SALMINEN *et al.*, 1998b; SANZ *et al.*, 2007). Além das bactérias lácticas (lactobacilos, estreptococos, enterococos, lactococos) e das bifidobactérias, outros microrganismos vêm sendo estudados quanto ao seu potencial probiótico, como o gênero *Bacillus* e de algumas leveduras como a cepa *Saccharomyces boulardii* (CZERUCKA *et al.*, 2007; LIONG, 2007). Porém, são as cepas das bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* que constituem o principal grupo de bactérias aplicadas e estudadas como probióticos (SALMINEN *et al.*, 1998b; ANURADHA & RAJESHWARI, 2005; SANZ *et al.*, 2007; SAXELIN 2008).

1.3.1 Mecanismos de ação propostos para a atuação dos microrganismos probióticos sobre a saúde gastrointestinal humana

A utilização tradicional dos probióticos tem sido direcionada à saúde gastrointestinal para: melhorar o quadro de intolerância à lactose; aumentar a resistência natural às doenças infecciosas; reduzir o risco de ocorrência de diarreias, alergia alimentar e das doenças inflamatórias intestinais; auxiliar na prevenção da constipação; melhorar o equilíbrio da microbiota intestinal, entre outras aplicações (McFARLAND, 2000; GOEL *et al.*, 2006; LIONG, 2007; DOUGLAS & SANDERS, 2008; LOMER *et al.*, 2008; SARKAR, 2008). São, também, exploradas as funções dos probióticos sobre o câncer, redução dos níveis de colesterol sérico, diabetes, artrite reumatóide, saúde dental, vaginites e infecções do trato urinário (McFARLAND, 2000; GOLDIN & GORBACH, 2008; REID, 2008a; SLEATOR & HILL, 2008).

Numerosos estudos clínicos, incluindo pesquisas adequadamente planejadas e controladas realizadas com humanos, vêm sendo realizados para a compreensão dos

mecanismos envolvidos nos potenciais efeitos positivos dos probióticos para a saúde (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002; LIONG, 2007). Os mecanismos propostos, pelos quais os probióticos podem proteger o hospedeiro de potenciais patógenos, são:

- Imunomodulação - resposta rápida e adequada do sistema imune a agressões infecciosas (ZIEMER & GIBSON, 1998; O'HARA & SHANAHAN, 2007; SANZ, *et al.*, 2007), impedindo a proliferação de microrganismos potencialmente patogênicos, através do estímulo da resposta imune por promoção da resistência não-específica (MOGENSEN *et al.*, 2000; ISOLAURI *et al.*, 2002; PICARD *et al.*, 2005; CLAVEL & HALLER, 2007; SAAVEDRA, 2007);
- Proteção contra microrganismos invasores, promovendo a “exclusão competitiva” - os probióticos, por serem constituintes da barreira de defesa da mucosa intestinal, competem pelos mesmos sítios de adesão com bactérias potencialmente patogênicas e utilizam os nutrientes necessários para a multiplicação de microrganismos indesejáveis (ADLERBERTH *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2000; GUARNER & MALAGELADA, 2003; GIBSON, *et al.*, 2005; STANTON *et al.*, 2005; SAAD, 2006; SANZ, *et al.*, 2007).
- Redução das faixas de pH a níveis abaixo dos ideais para a multiplicação de patógenos, através de produtos do metabolismo como os ácidos orgânicos e ácidos graxos de cadeia curta (PICARD *et al.*, 2005). Como exemplos podem ser citados o ácido láctico, o qual possui um efeito inibitório significativo na invasão das células epiteliais humanas por patógenos (MAKRAS *et al.*, 2006), e os ácidos acético, propiônico e butírico, como produtos finais importantes do metabolismo fermentativo do cólon (MORTENSEN & CLAUSEN, 1996; CUMMINGS & MACFARLANE, 2002; MACFARLANE *et al.*, 2006).
- Efeitos antagônicos a partir da produção e secreção de compostos antimicrobianos, como frações da parede celular, proteínas de superfície, ácidos nucleicos, proteínas e peptídeos inibitórios (ADLERBERTH *et al.*, 2000; ROLFE, 2000; GUARNER & MALAGELADA, 2003; GIBSON, *et al.*, 2005; PICARD *et al.*, 2005; STANTON *et al.*, 2005; SANZ *et al.*, 2007).
- Outros fatores, como a inibição da produção ou da ação de toxinas patogênicas (NICOLI *et al.*, 2003) e efeitos antiinflamatórios (ISOLAURI *et al.*, 2002; HEDIN *et al.*, 2007).

A **figura 1** ilustra, resumidamente, os principais mecanismos de ação propostos para a atuação dos probióticos contra bactérias potencialmente patogênicas.

Figura 1. Principais mecanismos de ação envolvidos na proteção e manutenção da saúde do hospedeiro por parte dos microrganismos probióticos.

Fonte: FUSTER & GONZÁLEZ-MOLERO (2007).

1.3.2 O potencial probiótico de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* spp., com destaque à ação benéfica de *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* Bb-12 para a saúde do hospedeiro

As cepas pertencentes às espécies *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium adolescentis* e *Bifidobacterium longum* estão entre as mais estudadas em meio aos microrganismos considerados probióticos. Conseqüentemente, essas cepas compõem o principal grupo de bactérias probióticas comercializadas para o consumo humano (SALMINEN *et al.*, 1998b; LIONG, 2007; MEURMAN & STAMATOVA, 2007; SANZ *et al.*, 2007).

O gênero *Lactobacillus* abrange um heterogêneo grupo de bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos e que normalmente não apresentam mobilidade. São espécies anaeróbias facultativas, em forma de bastão, mas que apresentam ampla variedade de características morfológicas, metabólicas e de multiplicação (RAY, 2004).

Os lactobacilos homofermentativos típicos do hospedeiro humano são representados por três grupos: o grupo "*Lactobacillus acidophilus*", que compreende as cepas de *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, e *L. johnsonii*, o grupo "*Lactobacillus salivarius*" e o grupo "*Lactobacillus casei*" que abrange as cepas de *L. casei*, *L. paracasei*, *L. zeae* e *L. rhamnosus* (HOLZAPFEL & SCHILLINGER, 2002; CHAMPAGNE *et al.*, 2005).

Em destaque, *L. acidophilus* apresenta considerável interesse para a medicina e para a indústria, uma vez que essa espécie é conhecida por cumprir importante papel na saúde e nutrição humana, devido à sua influência sobre a microbiota intestinal (HOLZAPFEL & SCHILLINGER, 2002; CHAMPAGNE *et al.*, 2005). Cepas do grupo *L. acidophilus* são amplamente aplicadas como culturas *starter* para a produção de leites fermentados, mas apenas *L. gasseri*, *L. johnsonii* e algumas cepas de *L. acidophilus* e *L. crispatus* são utilizadas como probióticos (KLEIN, 1998).

As bifidobactérias estão se destacando como importante grupo de microrganismos residentes no intestino, devido aos sucessivos estudos sobre sua eficácia na prevenção e tratamento de um amplo espectro de desordens gastrintestinais em humanos e/ou animais (CHAMPAGNE *et al.*, 2005; PICARD, *et al.*, 2005).

Naturalmente presentes na microbiota intestinal dominante, *Bifidobacterium* spp. representam cerca de 25% das bactérias fecais cultiváveis em adultos e cerca de 80% em crianças saudáveis (PICARD, *et al.*, 2005). Nos primeiros dias após o nascimento, recém-nascidos possuem a microbiota intestinal predominantemente constituída por bifidobactérias. Com o passar dos anos e com as mudanças dos hábitos alimentares, a tendência é que as bifidobactérias sejam substituídas por outros microrganismos e sua população tende a decrescer em idosos (SALMINEN & ISOLAURI, 2006).

As espécies pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* são bactérias Gram-positivas que se apresentam como bastões de vários formatos e tamanhos, como células individuais ou formando cadeias de diferentes tamanhos. Não formam esporos, não apresentam mobilidade e são anaeróbias, embora algumas espécies sejam tolerantes ao O₂ na presença de CO₂. A temperatura ótima de multiplicação dessas bactérias está na faixa de 37 a 41°C, podendo se multiplicar entre 25 e 45°C. Normalmente não se multiplicam em valores de pH acima de 8,0 ou abaixo de 4,5 (RAY, 2004).

Um número considerável de benefícios à saúde vem sendo divulgado para bactérias pertencentes aos grupos *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. Esses benefícios incluem efeitos antimutagênicos, propriedades anticarcinogênicas, melhoria do metabolismo da lactose, redução do colesterol sérico, estímulo do sistema imune e tratamento de infecções bacterianas, como as causadas por *Helicobacter pylori* (BOUHNİK *et al.*, 1992; KULLEN *et al.*, 1997; COCONNIER *et al.*, 1998; SCHAAFSMA *et al.*, 1998; DUEZ *et al.*, 2000; BEZKOROVAINY, 2001; LORCA *et al.*, 2001; CANDUCCI *et al.*, 2002; CHATTERJEE *et al.*, 2003; HAMILTON-MILLER, 2003; METTS *et al.*, 2003; RESTA-LENERT & BARRETT, 2003; TOMÁS *et al.*, 2003; JOHNSON-HENRY *et al.*, 2004; GOTTELAND *et al.*,

2005, 2006; MAINVILLE *et al.*, 2005; PICARD *et al.*, 2005; DABIZA *et al.*, 2006; CHIODA *et al.*, 2007). Devido a esses potenciais benefícios à saúde, esses microrganismos estão sendo amplamente incorporados a produtos alimentícios, principalmente aqueles de base láctea (LIONG, 2007; SHAH, 2007).

Entretanto, no processo de desenvolvimento de um alimento funcional que se apresente como probiótico, é relevante que os produtos contenham cepas corretamente caracterizadas, com o propósito de compreender os fatores que direcionam os efeitos ao hospedeiro e a funcionalidade dos microrganismos probióticos adicionados (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002; CHAMPAGNE *et al.*, 2005). Deve ser salientado que o efeito de uma bactéria é específico para cada cepa, não podendo ser extrapolado, inclusive para outras cepas da mesma espécie (GUARNER & MALAGELADA, 2003).

Ao encontro dessa necessidade, estudos com cepas probióticas específicas vêm sendo realizados e seus efeitos clínicos sobre a redução do risco de doenças de origem intestinal ou extra-intestinal têm sido comprovados e extensivamente revisados (HAMILTON-MILLER, 2003).

As cepas La-5 de *L. acidophilus* e Bb-12 de *B. animalis* subsp. *lactis* representam microrganismos probióticos cujo potencial benéfico para a saúde humana é reconhecido cientificamente, tanto por estudos *in vitro* e *in vivo* (FÁVARO-TRINDADE & GROSSO, 2002; HANSEN *et al.*, 2002; SLAČANAC *et al.*, 2004; COMMANE *et al.*, 2005; SAARELA *et al.*, 2005, 2006; SCHILLINGER *et al.*, 2005; NILSSON *et al.*, 2006; MEDELLIN-PEÑA *et al.*, 2007) quanto por estudos realizados em humanos (ISOLAURI *et al.*, 2000; JUNTUNEN *et al.*, 2001; SHEU *et al.*, 2002; CHOURAQUI *et al.*, 2004; JAIN *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2004a; OUWEHAND *et al.*, 2004; LAAKE *et al.*, 2005; ABD EL-GAWAD *et al.*, 2006; BAKKER-ZIERIKZEE *et al.*, 2006; DINKÇI *et al.*, 2006; LARSEN *et al.*, 2006; MÄTTÖ *et al.*, 2006; RAUTAVA *et al.*, 2006; WILDT *et al.*, 2006; RAFTER *et al.*, 2007; SAARELA *et al.*, 2007).

1.3.3 Possíveis efeitos adversos / colaterais causados por probióticos

Existe uma demanda por estabelecer os efeitos de uma cepa probiótica sobre o hospedeiro e sobre outros elementos da microbiota que são importantes para o metabolismo do hospedeiro. Isso inclui, não apenas os benefícios positivos para a saúde, mas também a demonstração de que cepas probióticas não causam efeito nocivo (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002; CANNON *et al.*, 2005; SLOVER & DANZIGER, 2008).

As bactérias produtoras de ácido láctico em alimentos são consideradas microrganismos comensais com baixo ou nenhum potencial patogênico (MÄKELÄINEN *et al.*, 2003). Os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* não incluem espécies patogênicas de relevância e o predomínio das bifidobactérias nas fezes de bebês recém nascidos é reconhecido, por proporcionar proteção contra infecções (HARMSSEN *et al.*, 2000; WASSENAAR & KLEIN, 2008).

A utilização segura das bifidobactérias e lactobacilos também pode ser embasada no longo histórico de consumo de leites fermentados e no conhecimento que vem sendo acumulando sobre a taxonomia e fisiologia desses microrganismos. Conseqüentemente, é atribuído o *status* GRAS (*Generally Regarded as Safe*) a muitos produtos contendo microrganismos probióticos (ISHIBASHI & YAMAZAKI, 2001; FARNWORTH, 2008; LIONG, 2008).

Por outro lado, casos em que microrganismos pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium* foram isolados de sítios de infecção, sugerem que probióticos podem se translocar. Contudo, exceto no caso específico dos pacientes imuno-deprimidos, a translocação dos probióticos em humanos saudáveis é dificultada e, caso ocorra, os efeitos deletérios são raros (LIONG, 2008).

Esses fatos vêm ao encontro da conclusão apresentada por BORRIELLO *et al.* (2003) de que lactobacilos e bifidobactérias utilizados como probióticos não comprometem a saúde do consumidor.

Particularmente com relação à cepa *B. animalis* Bb-12, em estudos realizados para avaliar a administração deste microrganismo para adultos saudáveis (LARSEN *et al.*, 2006), para bebês (WEIZMAN & ALSHEIKH, 2006) e a administração conjunta com *L. acidophilus* La-5 para pacientes pós-cirúrgicos (ANDERSON *et al.*, 2004) e com a saúde debilitada (JAIN *et al.*, 2004), não foram observados efeitos prejudiciais ou adversos causados por esse microrganismo.

1.4 AS FIBRAS ALIMENTARES E OS PREBIÓTICOS

Fibra alimentar é a parte comestível de plantas ou carboidratos análogos que são resistentes à digestão e à absorção no intestino humano, com 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 CHEMISTS, AACC, 2001).

As fibras alimentares incluem a celulose, hemicelulose, ligninas, gomas, celulosas modificadas, mucilagens, oligossacarídeos, pectinas, frutanos (inulina e oligômeros de frutose) e substâncias associadas às plantas, como ceras, cutina e suberina. Portanto, as fibras alimentares compreendem todos os polissacarídeos não amiláceos resistentes à digestão no intestino delgado e que são fermentados no intestino grosso (AACC, 2001).

A polidextrose é reconhecida como fibra alimentar e apresenta efeitos fisiológicos associados às fibras alimentares. É obtida a partir da polimerização da dextrose, na presença de ácido cítrico e de pequena quantidade de sorbitol. Esse ingrediente é composto principalmente de ligações cruzadas entre polímeros de glicose com todos os tipos de ligações glicosídicas, predominando as ligações 1-6, com grau médio de polimerização de 12. A polidextrose é um ingrediente de baixo teor calórico (1 kcal/g), que pode proporcionar o corpo e a textura do açúcar e, algumas vezes, da gordura, aos produtos aos quais é adicionada. (CHINACHOTI, 1995; CRAIG *et al.*, 2000; 2001; JIE *et al.*, 2000; AUERBACH *et al.*, 2007).

Assim como a polidextrose, a inulina e a oligofrutose são metabolizados como fibras alimentares e apresentam os mesmos efeitos fisiológicos atribuídos a estas (HOEBREGS, 1997; CRAIG *et al.*, 2000).

Oligofrutose e frutooligossacarídeos (FOS) são termos sinônimos utilizados para denominar frutanos do tipo inulina com grau de polimerização inferior a 10. Seus nomes derivam de oligossacarídeos (carboidratos com menos de 10 subunidades de monossacarídeos), compostos predominantemente de frutose. O termo oligofrutose é mais freqüentemente empregado na literatura para descrever inulinas de cadeia curta, obtidas por hidrólise parcial da inulina da chicória. O termo FOS tende a descrever misturas de frutanos do tipo inulina de cadeia curta, sintetizados a partir da sacarose. Os FOS consistem de moléculas de sacarose compostas de duas ou três subunidades de frutose adicionais, adicionadas enzimaticamente através de ligação β (2 $\rightarrow$ 1) à subunidade frutose da sacarose (CARABIN & FLAMM, 1999; BIEDRZYCKA & BIELECKA, 2004; SAAD, 2006).

Prebióticos são ingredientes fermentados seletivamente, permitindo que ocorram alterações específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo, assim, benefícios à saúde e ao bem-estar do hospedeiro (ROBERFROID, 2007).

Os oligossacarídeos prebióticos estão presentes naturalmente no leite materno (RASTALL *et al.*, 2005) e podem ser obtidos por extração de materiais

vegetais ou microbiológicos, por síntese enzimática ou hidrólise de polissacarídeos (GULEWICZ *et al.*, 2000). São exemplos a lactulose, a oligofrutose, os FOS (fruto-oligossacarídeos) e outros oligossacarídeos que são fontes de carboidratos fermentáveis para bactérias benéficas no cólon (VAN LOO, 2004).

A inulina é um dos carboidratos polidispersos não digeríveis, que cumpre todos os critérios para ser considerada um ingrediente prebiótico, uma vez que, em virtude de sua estrutura química específica (subunidades de frutose, ligadas entre si e ligadas a uma glicose terminal, com grau de polimerização médio de 10 ou mais), resiste às condições de acidez estomacal, às enzimas digestivas e à absorção intestinal (CARABIN & FLAMM, 1999; DELZENNE & ROBERFROID, 1994; BIEDRZYCKA & BIELECKA, 2004; SAAD, 2006, ROBERFROID, 2007).

Além do acesso dos probióticos ao intestino por administração direta, pela suplementação da dieta com bactérias vivas, outra via para aumentar o número de bactérias benéficas na microbiota intestinal é através da utilização de prebióticos (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002; GIBSON *et al.*, 2005).

Por atingir o colón praticamente inalterada, a inulina é fermentada pela microbiota intestinal anaeróbia, produzindo ácidos graxos de cadeia curta e gases, estimulando seletivamente a multiplicação e/ou atividade das bactérias intestinais, como as bifidobactérias, associadas à saúde e ao bem estar do consumidor (DELZENNE & ROBERFROID, 1994; GIBSON *et al.*, 2005; ROBERFROID, 2007).

Enquanto o aspecto e a composição das fibras alimentares parecem óbvios a uma primeira análise, a caracterização química desses compostos é bastante complexa (AACC, 2001).

As metodologias atuais recomendadas para a quantificação do teor de fibras alimentares (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, AOAC, 2000b;c) continuam adequadas e são utilizadas para quantificar fibras alimentares na maioria dos produtos alimentícios. As metodologias tradicionais quantificam os compostos insolúveis em misturas compostas por quatro partes de álcool e uma parte de água, como a celulose, hemicelulose, lignina, gomas, mucilagens, oligossacarídeos, pectinas, ceras, cutina e suberina. Esses métodos não são adequados para a análise de alimentos que contém quantidades significativas de fibras alimentares solúveis nessas soluções alcoólicas (FILISSETTI-COZZI & LAJOLO, 1991; AACC, 2001).

Em virtude da conformação de suas moléculas, os frutanos são aproximadamente 100% solúveis nas misturas 4:1 de etanol e água. Como resultado,

não é possível isolar esses compostos, utilizando o método descrito pela AOAC (2000b;c) ou metodologias equivalentes, como a descrita por PROSKY *et al.* (1988) e FILISETTI-COZZI & LAJOLO (1991). Dessa maneira, atualmente, os métodos recomendados pela AOAC para analisar o teor de fibras alimentares em produtos com alto teor de frutanos incluem os métodos por cromatografia de troca iônica (AOAC, 2000d) ou os enzimáticos / espectrofotométricos (AOAC, 2000e; AACC, 2001).

A polidextrose, assim como os frutanos, são aproximadamente 100% solúveis em misturas 4:1 de etanol e água, devido ao seu peso molecular relativamente baixo e à estrutura altamente ramificada de suas moléculas (AACC, 2001; CRAIG *et al.*, 2000; 2001). Assim, quantidades não significativas de polidextrose são obtidas como fibra alimentar pelo método oficial descrito pela AOAC (2000b) ou metodologias equivalentes. O método oficial para quantificação da polidextrose em alimentos é aquele descrito pela AOAC (2000f), o qual emprega a cromatografia de troca iônica para quantificar esse componente (AACC, 2001).

1.4.1 Prebióticos e os potenciais benefícios à saúde

Dado os riscos pertinentes às gastroenterites associadas a microrganismos, a alternativa da utilização de prebióticos para fortalecer a microbiota intestinal do hospedeiro é bastante promissora (GIBSON *et al.*, 2005).

A modulação, através da dieta, da microbiota intestinal pelos prebióticos é conhecida, por contribuir para a saúde e reduzir o risco de doenças em humanos (VAN LOO, 2004; REID, 2008b; WANG 2004b). Tais benefícios são intermediados por processos fisiológicos que ocorrem na superfície do intestino grosso e por estímulo da população e/ou a atividade de bifidobactérias e lactobacilos (MANNING & GIBSON, 2004; VAN LOO, 2004; GIBSON *et al.*, 2005).

A fermentação dos prebióticos leva a diversas consequências fisiológicas e vem sendo avaliada em estudos com humanos, por exercer efeitos positivos sobre bactérias promotoras da saúde, como *Bifidobacterium* spp. Paralelamente, essa fermentação, a partir da redução do pH fecal, mantém as populações de bactérias potencialmente patogênicas em níveis relativamente inferiores (MENNE *et al.*, 2000; FRANCK, 2006; DOUGLAS & SANDERS, 2008).

Estudos realizados para avaliar a administração, em crianças e adultos, dos prebióticos inulina e oligofrutose, isolados ou em misturas, em doses de 4,5 g a 20 g por dia, mostraram um aumento seletivo das populações de bifidobactérias nas fezes dos indivíduos, contribuindo para o restabelecimento e equilíbrio de uma

microbiota intestinal saudável (LANGLANDS *et al.*, 2004; BRUNSER *et al.*, 2006; LINDSAY *et al.*, 2006; TEN BRUGGENCATE *et al.*, 2006).

O efeito da inulina sobre o equilíbrio das funções intestinais, auxiliando na melhoria dos casos de prisão de ventre, foi demonstrado por HOND *et al.* (2000) e GOTTELAND & BRUNSER (2006). Já o efeito sobre a redução dos níveis séricos de triacilgliceróis em adultos foi observado a partir da administração diária de 10 e 20 g de inulina por JACKSON, *et al.* (1999) e CAUSEY *et al.* (2000), respectivamente.

Diferentemente de outras fibras tradicionais (que contém ácido fítico), a inulina e a oligofrutose podem melhorar a biodisponibilidade de alguns minerais, como o cálcio, magnésio e ferro. A utilização de diferentes modelos de avaliação, incluindo protocolos de estudos em animais e humanos, vem demonstrando um aumento da absorção de cálcio e magnésio no intestino grosso, assim como um aumento do *pool* de cálcio no tecido ósseo, resultado no aumento da densidade mineral (CASHMAN, 2003; RASCHKA & DANIEL, 2005b; FRANCK, 2006).

A maior porção do cálcio é absorvida no intestino delgado. Contudo, parte do cálcio ingerido tem absorção no intestino grosso. A fermentação dos frutanos é reconhecida por desempenhar função essencial na via para-celular de absorção de cálcio estabelecida no cólon. O aumento da absorção de cálcio pela ingestão de inulina e oligofrutose pode ocorrer através do aumento da transcrição de proteínas envolvidas na absorção do cálcio, do *pool* de cálcio solúvel e ionizado, das concentrações de ácidos graxos livres e da interação direta com a superfície do intestino (RASCHKA & DANIEL, 2005a).

1.4.2 Possíveis efeitos adversos causados por prebióticos

Para que os efeitos prebióticos sejam evidenciados e os efeitos indesejáveis não sejam percebidos, as recomendações de ingestão diária de carboidratos prebióticos encontram-se na faixa de 4 a 10 g de oligofrutose e de inulina (COUSSEMENT, 1999; RAO, 2001; MANNING & GIBSON, 2004; KOLIDA & GIBSON, 2007).

Quanto aos efeitos colaterais dos prebióticos, estes frequentemente são avaliados como parte de uma combinação simbiótica, dificultando o isolamento dos efeitos individuais. Contudo, não foram relatados efeitos adversos significativos, durante a avaliação de potenciais efeitos benéficos e colaterais, resultantes da administração de inulina e oligofrutose, confirmando a segurança do uso destes ingredientes em tratamentos e alimentos para consumo humano (ROBERFROID, 2000b; HEDIN *et al.*, 2007).

Efeitos colaterais, observados após a ingestão de grandes quantidades de frutanos, podem incluir flatulência e fezes amolecidas. Porém, o desconforto intestinal devido ao consumo excessivo de inulina, caracterizado por inchaço, gases ou cólicas, pode ser comparado ao efeito resultante do consumo de outras fibras alimentares (ROBERFROID, 2000b).

Na prática, a quantidade de prebióticos consumida (aproximadamente 4 a 15 g dia) está abaixo da quantidade que leva ao desconforto intestinal e/ou a efeitos laxativos (JACKSON *et al.*, 1999; HOND *et al.*, 2000; BOEHM *et al.*, 2002; MORO *et al.*, 2002; ROBERFROID, 2000b).

1.5 ALIMENTOS FUNCIONAIS PROBIÓTICOS

Existe a concordância de que a presença dos microrganismos probióticos no intestino humano é um fator que contribui para a saúde e para o bem estar (CHAMPAGNE *et al.*, 2005). Nesse contexto, o conhecimento da microbiota intestinal e suas interações com o hospedeiro levaram ao desenvolvimento de estratégias, objetivando a manutenção e o estímulo das bactérias normais ali presentes (GIBSON & FULLER, 2000; SARKAR, 2007).

Os microrganismos probióticos podem ser disponibilizados ao consumidor através dos alimentos e dos suplementos alimentares. O mercado para aplicação de probióticos em alimentos é bastante promissor, quando comparado a aplicações em cápsulas, saches e outras formas farmacêuticas (HOFFMAN, 2008; SAXELIN 2008). Porém, a exigência tecnológica para a viabilização de alimentos probióticos é grande. Assim sendo, novos processos de fabricação e tecnologias de formulações podem ser necessários para microrganismos que foram escolhidos, em primeiro lugar, por suas propriedades benéficas à saúde (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002; CHAMPAGNE *et al.*, 2005).

Alimentos probióticos devem conter cepas específicas de microrganismos probióticos e antes destas chegarem ao consumidor, elas devem apresentar a capacidade de serem manipuladas sob condições industriais, de sobreviver e de manter sua funcionalidade nos produtos alimentícios aos quais foram adicionados. A cepa probiótica deve, também, sobreviver às barreiras gastrintestinais e manter a sua funcionalidade no hospedeiro. Além disso, não devem agregar sabores ou texturas indesejadas aos alimentos aos quais são adicionadas (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002; CHAMPAGNE *et al.*, 2005; SANDERS, 2008).

Características importantes dos alimentos probióticos são a concentração e a estabilidade das cepas durante a vida de prateleira do produto. Particularmente importante é a manutenção da estabilidade das cepas, a fim de que seja possível manter as declarações dos potenciais benefícios à saúde proporcionados pelo consumo do produto (TAMIME *et al.*, 2005; FARNWORTH, 2008). A Legislação Brasileira define que a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na porção diária do alimento e que valores menores do que esses podem ser aceitos, desde que o produtor comprove sua eficácia (ANVISA, 2008).

O veículo alimentício escolhido para a incorporação de cepas probióticas deve ser cuidadosamente estudado para a seleção conveniente do par cepa probiótica-veículo. O processo de verificação da compatibilidade e adaptabilidade entre as cepas selecionadas e os referidos veículos é fundamental (KOMATSU *et al.*, 2008).

Os produtos lácteos representam um sistema universal para fornecer probióticos aos consumidores, mas esses microrganismos também podem ser encontrados em produtos vegetais, fórmulas infantis e suplementos alimentares (BROEKAERT & WALKER, 2006; REID, 2008b). O **quadro 1** apresenta exemplos de produtos probióticos e potencialmente probióticos desenvolvidos.

Além dos produtos lácteos fermentados tradicionais, outros produtos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de proporcionar ao consumidor alternativas de alimentos probióticos. Assim, NEBESNY *et al.* (2007) desenvolveram chocolates com a adição dos microrganismos *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei*. OUWEHAND *et al.* (2004) adicionaram *B. animalis* Bb-12 em barra de cereais, para desenvolver um produto alimentício probiótico para ser armazenado em temperatura ambiente. GOBBETTI *et al.* (2007) descreveram a potencial aplicação de bactérias *starter* e probióticas na fermentação de pães para a fabricação de alimentos tolerados por pacientes celíacos.

1.5.1 Desafios tecnológicos para a obtenção de alimentos funcionais probióticos

Os alimentos funcionais promovem um dos mais promissores e dinâmicos segmentos para o desenvolvimento de produtos na indústria de alimentos. Nesse segmento, a maior expansão está ligada aos alimentos contendo microrganismos probióticos e ingredientes prebióticos (SALMINEN *et al.*, 1998a; SAARELA *et al.*, 2000; MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002; SIRÓ *et al.*, 2008), sendo interessante para os consumidores que alternativas de produtos alimentícios que ofereçam benefícios à saúde sejam desenvolvidas (CAMIRE *et al.*, 2006).

Cepas de microrganismos probióticos podem ser incorporadas industrialmente em alimentos com alta aceitação, como iogurtes, leites fermentados e queijos, os quais são veículos tradicionais para a adição de probióticos (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002; DOLEYRES & LACROIX, 2005). Contudo, bactérias com excepcionais propriedades funcionais para a saúde, via de regra, apresentam limitações tecnológicas (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002). Embora a literatura apresente quantidade relevante de informação sobre os efeitos benéficos do consumo de alimentos contendo *Lactobacillus acidophilus* e bifidobactérias, pouca informação está disponível sobre os desafios da introdução desses microrganismos em produtos alimentícios (CHAMPAGNE *et al.*, 2005; TAMIME *et al.*, 2005).

No universo da tecnologia de produção de alimentos probióticos, a viabilidade e a estabilidade dos microrganismos adicionados vêm se apresentando como desafio, tanto mercadológico quanto tecnológico, para os produtores industriais (SHAH, 2000; MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002). Por outro lado, os fatores relacionados às propriedades sensoriais da produção de alimentos probióticos são de extrema importância já que, apenas satisfazendo as exigências dos consumidores, é possível que a indústria de alimentos tenha sucesso em promover o consumo dessa categoria de alimentos (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002; SIRÓ *et al.*, 2008).

Bifidobactérias já são aplicadas a uma grande variedade de produtos lácteos probióticos, como leite, queijos, *frozen* iogurte e sorvetes. A sobrevivência das bifidobactérias em produtos fermentados depende de inúmeros fatores, como a cepa utilizada, condições de fermentação, temperatura de armazenamento e métodos de conservação (ROY, 2005).

Nos produtos fermentados, a multiplicação das bifidobactérias no leite normalmente é lenta ou limitada, quando comparada à das bactérias lácticas *starter*, sendo esse fator aparentemente dependente de atividade proteolítica. Alternativas são: a utilização de grande quantidade de inóculo, a adição de fatores promotores da multiplicação ou a adição das bifidobactérias no leite juntamente com culturas *starter* (ROY, 2005). Porém, *Bifidobacterium* spp., quando em grandes quantidades e/ou sob longos períodos de fermentação, podem produzir quantidade de ácido acético perceptível ao paladar (LA TORRE *et al.*, 2003; TAMIME *et al.*, 2005). Como alternativa, apresentam-se os produtos levemente fermentados ou não fermentados, como o leite fluido, sorvetes, produtos do tipo iogurte e queijos levemente ácidos, para os quais podem ser obtidas altas taxas de sobrevivência para as bifidobactérias (ROY, 2005).

Quadro 1. Exemplos de produtos alimentícios adicionados de bactérias probióticas e potencialmente probióticas descritos na literatura.

Produto		Microorganismo(s)	Referência bibliográfica
Leites fermentados		<i>L. acidophilus</i> La-5 e <i>B. animalis</i> Bb-12 <i>L. acidophilus</i> La-5, <i>L. rhamnosus</i> e <i>S. thermophilus</i>	MARTÍN-DIANA <i>et al.</i> , 2004; ØSTLIE <i>et al.</i> , 2005 LUCAS <i>et al.</i> , 2004
	Carbonatado	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> e <i>S. thermophilus</i>	VINDEROLA <i>et al.</i> , 2000
		<i>L. acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium</i> spp.	SHIHATA & SHAH, 2000; TALWALKAR <i>et al.</i> , 2004; CAPELA <i>et al.</i> , 2006; MORTAZAVIAN <i>et al.</i> , 2006
	Sem adição de gordura	<i>L. acidophilus</i> e <i>B. longum</i>	ANTUNES <i>et al.</i> , 2005
Queijos	Argentino semi-duro	<i>L. acidophilus</i> e <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	BERGAMINI <i>et al.</i> , 2005
	Cheddar	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> e <i>Bifidobacterium</i> spp.	ONG <i>et al.</i> , 2006
		<i>B. animalis</i> Bb-12	THARMARAJ & SHAH, 2004
	Branco	<i>L. acidophilus</i>	KASIMOĞLU <i>et al.</i> , 2004
	Branco em salmoura	<i>L. acidophilus</i> La-5 e <i>B. bifidum</i>	YILMAZTEKIN <i>et al.</i> , 2004
	Minas frescal	<i>L. acidophilus</i> La-5 <i>L. acidophilus</i> La-5, <i>B. animalis</i> Bb-12 e <i>S. thermophilus</i> <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	BURITI <i>et al.</i> , 2005b; SOUZA <i>et al.</i> , 2008 BURITI <i>et al.</i> , 2007d BURITI <i>et al.</i> , 2005a
	Queijo cremoso	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> e <i>S. thermophilus</i>	BURITI <i>et al.</i> , 2007b; 2007c; 2008
	Queijo <i>petit-suisse</i>	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. acidophilus</i> e <i>B. lactis</i>	CARDARELLI <i>et al.</i> , 2008; MARUYAMA <i>et al.</i> , 2006
Sobremesas lácteas	Musse de chocolate	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	ARAGON-ALEGRO <i>et al.</i> , 2007; CARDARELLI <i>et al.</i> , 2008b
	Musse de maracujá e musse de goiaba	<i>L. acidophilus</i> La-5	BURITI <i>et al.</i> , 2007a
	Manjar branco	<i>L. paracasei</i> e <i>B. lactis</i>	CORRÊA <i>et al.</i> , 2008
	Sorvetes	<i>L. acidophilus</i> e/ou <i>Bifidobacterium</i> spp. <i>L. acidophilus</i> La-5 e <i>B. animalis</i> Bb-12	HEKMAT & McMAHIN, 1992; ARYANA & SUMMERS, 2006; BAŞYİĞİT <i>et al.</i> , 2006; FÁVARO-TRINDADE <i>et al.</i> , 2006; AKIN <i>et al.</i> , 2007 CORRALES <i>et al.</i> , 2007; MAGARIÑOS <i>et al.</i> , 2007
Produtos não lácteos	Extrato hidrossolúvel de soja ("leite de soja") fermentado	<i>L. acidophilus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> <i>S. thermophilus</i> , <i>B. lactis</i> e <i>L. acidophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> e <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. jugurti</i> , <i>S. thermophilus</i> e <i>L. delbrueckii</i> ssp <i>bulgaricus</i>	WANG <i>et al.</i> , 2003; 2004b BEHRENS <i>et al.</i> , 2004 UMBELINO <i>et al.</i> , 2001 ROSSI <i>et al.</i> , 1999
	Produto fermentado a base de banana	<i>L. acidophilus</i>	TSEN <i>et al.</i> , 2004
	Outros produtos fermentados a base de cereais	<i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. acidophilus</i> La-5 e <i>B. animalis</i> Bb-12 <i>L. acidophilus</i> La-5, <i>L. reuteri</i> e <i>L. rhamnosus</i> GG	HELLAND <i>et al.</i> , 2004a HELLAND <i>et al.</i> , 2004b

1.6 ALIMENTOS FUNCIONAIS PREBIÓTICOS – A INULINA COMO INGREDIENTE PREBIÓTICO E SUA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS

Os consumidores estão cada vez mais conscientes sobre as questões de saúde e procurando por alimentos naturais, promotores do bem-estar e que contribuam para uma dieta saudável. Nesse contexto, os ingredientes como as fibras e os prebióticos, são vistos pelos consumidores de maneira positiva (MEHTA, 2005).

A inulina e os oligossacarídeos são ingredientes alimentícios funcionais, que apresentam o potencial de aprimorar a qualidade tecnológica e sensorial de muitos alimentos. Por essa razão, o interesse da aplicação dos prebióticos por parte da indústria de alimentos vem crescendo nos últimos anos (MUSSATTO & MANCILHA, 2007).

A inulina e a oligofrutose são reconhecidas como importantes fibras alimentares e por aprimorarem o sabor e textura de produtos alimentícios, particularmente aqueles com teor reduzido de gorduras (FRANCK, 2002; DEVEREUX *et al.*, 2003). A inulina possui propriedades funcionais que permitem que seja utilizada como um mimético de gordura, sem prejudicar o sabor do alimento. Tais propriedades estão baseadas em sua capacidade de estabilizar a estrutura da fase aquosa, desenvolvendo e melhorando a cremosidade do produto (ARYANA & HAQUE, 2001; EL-NAGAR, *et al.*, 2002).

Além disso, são ingredientes de baixo valor calórico (aproximadamente 1,5 Kcal/g), já que o valor calórico está limitado à contribuição dos ácidos graxos de cadeia curta, gerados a partir da fermentação e parcialmente reabsorvidos pelo organismo (ROBERFROID *et al.*, 1993; ROBERFROID, 1999, 2000b, 2005b).

Inulina e/ou oligofrutose têm sido adicionadas a alimentos como iogurte (ARYANA *et al.*, 2007a), pão (SEIDEL *et al.*, 2007), pão sem adição de glúten (KORUS *et al.*, 2006), biscoitos tipo *waffer* (HEMPEL *et al.*, 2007), fórmulas infantis (KIM *et al.*, 2007), barras de cereais (DUTCOSKY *et al.*, 2006), biscoitos, bolos (DEVEREUX *et al.*, 2003) e sorvetes (SCHALLER-POVOLNY & SMITH, 1999; CAUSEY *et al.*, 2000; EL-NAGAR *et al.*, 2002), com o objetivo de desenvolver alternativas de alimentos prebióticos para o consumidor.

De acordo com a Legislação Brasileira (ANVISA, 2008), a adição da inulina a alimentos permite que estes recebam a alegação de “Alimentos com alegações de propriedade funcional e ou de saúde”, desde que a porção diária do produto pronto para consumo forneça, no mínimo, 3 g de inulina se o alimento for sólido ou 1,5 g se o alimento for líquido.

1.7 ALIMENTOS SIMBIÓTICOS

Pertencendo à categoria de alimentos funcionais estão os alimentos probióticos, prebióticos e simbióticos (PICARD *et al.*, 2005; CHAMPAGNE *et al.*, 2005), os quais possuem um ou uma combinação de componentes com efeitos celulares e fisiológicos desejáveis para o organismo humano (ROBERFROID *et al.*, 1998).

O termo simbiótico é utilizado para produtos nos quais microrganismos probióticos são utilizados em conjunto com ingredientes prebióticos (PICARD *et al.*, 2005; SARKAR, 2007; DOUGLAS & SANDERS, 2008). Esses produtos contribuem com mais uma alternativa para as técnicas conhecidas para manipular a microbiota intestinal, na busca por um equilíbrio adequado entre bactérias benéficas e patogênicas no intestino, proporcionando vantagens ao hospedeiro (ROBERFROID, 2000a; MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002; SARKAR, 2007).

GIBSON & ROBERFROID (1995) definiram simbióticos como uma mistura de probióticos e prebióticos que proporciona efeitos benéficos ao hospedeiro, por melhorar o acesso e a sobrevivência de microrganismos vivos no trato gastrointestinal, por estimular seletivamente a multiplicação e/ou ativar o metabolismo de um número limitado de bactérias promotoras da saúde e, conseqüentemente, auxiliando na manutenção do bom estado de saúde do hospedeiro (WELLS *et al.*, 2008).

São exemplos de alimentos simbióticos: 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.*, 2007b); a musse de chocolate adicionada de inulina e *L. paracasei* (ARAGON-ALEGRO *et al.*, 2007); as musses de maracujá e goiaba adicionadas de inulina e *L. acidophilus* (BURITI *et al.*, 2007a) e os iogurtes adicionados de inulina e *L. acidophilus* (ARYANA *et al.*, 2007b) e também de oligofrutose (JUHkam *et al.*, 2007).

1.8 REDUÇÃO DO TEOR DE GORDURA EM ALIMENTOS: A UTILIZAÇÃO DE UM SUBSTITUTO DE GORDURA DE BASE PROTÉICA

Evidências sugerem que a moderação no consumo de gorduras, em conjunto com a redução do consumo total de energia, pode levar a um substancial impacto na diminuição do peso corporal e do risco de doenças crônico-degenerativas (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION, 2005).

A crescente demanda, por parte dos consumidores conscientes, para a redução do consumo diário de gorduras, tem levado a mudanças nas formulações de muitos produtos alimentícios e uma tendência atual é a redução da contribuição calórica da gordura nesses produtos. O desafio para o desenvolvimento de alimentos com baixo teor de gordura é a necessidade de apresentarem características sensoriais iguais ou compatíveis com as formulações originais (PAPADEMAS & BINTSIS, 2002).

Substitutos de gordura são utilizados para proporcionar algumas ou todas as propriedades funcionais da gordura, enquanto fornecem menos calorias que este componente, e são utilizados em uma variedade de produtos, da panificação às sobremesas congeladas (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION, 2005).

Pertencentes ao grupo dos ingredientes para substituição de gordura, os miméticos de gordura à base de proteínas são os ingredientes que mimetizam uma ou mais funções físicas e sensoriais da gordura no alimento. Esses ingredientes são compostos à base de carboidratos, proteínas ou gorduras, utilizados sozinhos ou combinados, e fornecem de 0 a 9 kcal/g. Por ligarem-se à água, os miméticos de gordura proporcionam lubrificação, sensação bucal e outras características sensoriais associadas à gordura (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION, 2005).

A aplicação de um substituto de gordura de base protéica é conveniente para produtos lácteos sem adição de gordura, como sorvetes, sobremesas congeladas e bebidas à base de leite; alimentos com teor reduzido de gordura, como manteigas, queijos, cremes, iogurtes, molhos para saladas, margarinas, maioneses, sopas e embutidos (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION, 2005).

Simplese® é classificado como substituto de gordura de base protéica, formulado a partir das proteínas concentradas do soro de leite e proteínas do ovo. Apresenta-se como micropartículas esféricas e proporciona ao alimento a sensação bucal de cremosidade equiparada à da gordura. Devido a suas características hidrofílicas e hidrofóbicas, possui propriedades emulsificantes e, por se ligar à água, forma géis coloidais, reduzindo a velocidade de derretimento e a sinerese. Os substitutos de gordura à base de proteínas são fonte de calorias, mas por serem constituídos por proteínas fornecem menos calorias (1 a 4 kcal/g) do que a gordura que substituem (BRUHN *et al.*, 1992; OHMES *et al.*, 1998; O'BRIEN *et al.*, 2003; YAZICI & AKGUN, 2004; AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION, 2005).

Como substituto de gordura, Simplesse® é utilizado desde o início da década de 90 em formulações de diversos tipos de alimentos (BRUHN *et al.*, 1992). São exemplos as formulações com teor reduzido de gorduras de biscoitos (ZOULIAS *et al.*, 2002; GALLAGHER *et al.*, 2003), pão (O'BRIEN *et al.*, 2003), pasta de amendoim (SINGH *et al.*, 2000), queijos (ROMEIH *et al.*, 2002; KOCA & METIN, 2004), sorvete de chocolate (PRINDIVILLE *et al.*, 2000; WELTY *et al.*, 2001) e os sorvetes sabor baunilha (OHMES *et al.*, 1998; YILSAY *et al.*, 2006), cereja (CHUNG *et al.*, 2004) e morango (LIOU & GRUN, 2007).

1.9 SOBREMESAS LÁCTEAS CONGELADAS: OS “GELADOS COMESTÍVEIS” COMO POTENCIAIS ALIMENTOS FUNCIONAIS

Os avanços tecnológicos mais importantes no processamento industrial do leite fluido, ocorridos durante os últimos vinte e cinco anos, incluem aperfeiçoamentos significativos em todas as operações unitárias de separação, padronização, pasteurização, homogeneização e acondicionamento (GOFF & GRIFFITHS, 2006; GOFF, 2008).

Da mesma maneira, o processamento industrial de sobremesas congeladas vem acompanhando esse desenvolvimento. Com o objetivo de conquistar novos mercados, observa-se o aumento da capacidade produtiva e a automação de equipamentos para ampliar a gama de produtos. Avanços significativos na qualidade dos produtos vêm sendo conquistados, obtidos através do conhecimento das propriedades funcionais de ingredientes e da influência destes na estrutura e textura dos alimentos. Nesse contexto, o consumo de sobremesas lácteas congeladas ou refrigeradas vem tomando lugar do leite fluido durante os últimos vinte e cinco anos (GOFF & GRIFFITHS, 2006; GOFF, 2008).

Não há na literatura uma classificação padrão, mas normalmente os cremes congelados, sorvetes, leites congelados, cremes a base de leite, ovos e amido, *sherbets*, *sorbets*, picolés de fruta, musses, cassatas e *frozen yogurt* pertencem ao grupo das sobremesas congeladas (PAPADEMAS & BINTSIS, 2002).

Sorvetes e outras sobremesas congeladas batidas são sistemas de alimentos coloidais estruturalmente complexos. São espumas compostas por células envoltas por uma emulsão parcialmente congelada. Água, gordura, emulsificantes, sólidos não gordurosos do leite, açúcares, estabilizantes, ar e gelo são os principais componentes desses produtos. Os cristais de gelo e os glóbulos de gordura sólida estão dispersos em uma fase contínua líquida não congelada que contém proteínas,

carboidratos, sais e gomas (WALSTRA *et al.*, 1999; PAPADEMAS & BINTSIS, 2002; PSZCZOLA, 2002; TRGO, 2003-2004; McCLEMENTS, 2005; GOFF, 2008).

A composição e definição para sorvetes e outras sobremesas congeladas batidas varia de acordo com a legislação de cada país (PAPADEMAS & BINTSIS, 2002). No Brasil, a legislação vigente reúne esses produtos na categoria de “alimentos gelados comestíveis”, que são alimentos congelados obtidos a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas ou de uma mistura de água e açúcar(es), podendo ser adicionados de outro(s) ingrediente(s), desde que não descaracterizem o produto (ANVISA, 2005a).

A composição de ingredientes para sorvetes e outras sobremesas congeladas também varia de acordo com as diferentes localidades e mercados de distribuição. Após serem levadas em consideração as exigências legais, a qualidade desejada para o produto, as matérias-primas disponíveis, a planta de processo, entre outros, há de se definir uma composição mínima, média ou alta de sólidos do leite para o produto, bem como a proporção de gordura em relação aos sólidos não gordurosos do leite (SNGL) (MARSHALL & ARBUCKLE, 2000).

As quantidades de cada componente que devem estar presentes no produto final também seguem regulamentações específicas. São exemplos as quantidades de gordura de leite, sólidos do leite, ar, estabilizantes e emulsificantes. Entretanto, os sorvetes ainda apresentam variações quanto ao sabor, aparência, textura e vida de prateleira, dependendo da natureza de cada ingrediente, operações aplicadas no processo de fabricação e condições de armazenamento (McCLEMENTS, 2005).

Dessa maneira, os sorvetes e sobremesas lácteas congeladas também podem ser classificados, de acordo com a composição dos ingredientes e apresentações ao consumidor (PSZCZOLA, 2002) em:

Sobremesa congelada: termo geral que abrange sorvetes, *frozen* iogurte, cremes congelados a base de leite e ovos, *sherbet*, *sorbet* e inovações, como sanduíches de sorvete, barras e palitos congelados, que podem ou não conter ingredientes lácteos;

Sorvete: alimento congelado produzido a partir de mistura de ingredientes lácteos, com no mínimo 10% de gordura do leite;

Inovações: são embalados separadamente - porções individuais da sobremesa congelada que pode ou não conter ingredientes lácteos;

Sorvete com teor reduzido de gorduras: apresenta, no mínimo, 25% de redução do teor de gordura, comparado ao produto referência;

Sorvete light: apresenta, no mínimo, 50% de redução do teor de gordura ou 33% de redução calórica, comparado ao produto referência;

Sorvete de baixo teor de gordura: contém, no máximo, 3 g de gorduras totais por porção (1/2 copo);

Sorvete sem adição de gordura: contém, no máximo, 0,50% de gordura por porção;

Frozen iogurte: consiste de uma mistura de ingredientes lácteos, aos quais foram adicionadas culturas lácticas, bem como ingredientes para dulçor e sabor.

Adicionalmente, tem-se a classificação de acordo com a dureza apresentada pelos produtos: sorvetes macios, comuns e firmes (WALSTRA *et al.*, 1999).

O sorvete macio é consumido logo após o seu preparo, uma vez que é preparado no local de distribuição. Sua temperatura normalmente está na faixa de –3 a –5°C e, portanto, ainda contém grande quantidade de água não congelada. Normalmente o teor de gordura e a incorporação de ar (*overrun*) são menores.

O sorvete comum atinge temperaturas intermediárias (–10 a –15°C), porém não é encaminhado para a venda antes de ter solidificado por completo. É armazenado em potes (de algumas semanas a meses), sendo possível retirar diversas porções.

O sorvete firme é frequentemente apresentado em embalagens para pequenas porções e, algumas vezes, possui cobertura externa de chocolate (WALSTRA *et al.*, 1999).

Para a obtenção de sorvetes firmes, após a etapa de congelamento e aeração simultâneos, é necessário adicionar uma etapa ao processo denominada endurecimento. Nessa etapa, o produto é acondicionado na embalagem e encaminhado para túneis de resfriamento em temperaturas entre –30 e –40°C, o que leva a um aumento da quantidade de cristais de gelo e, conseqüentemente, da resistência do produto. É importante considerar que para se obter um produto com qualidade adequada, quanto à formação dos cristais de gelo, é interessante que o processo de endurecimento seja realizado no menor tempo possível. Após as etapas de produção os sorvetes devem ser armazenados em temperaturas entre –18 e –23°C, para manter a aparência e textura desejáveis para o consumo. Durante o período de armazenamento, que para esses produtos pode chegar a vários meses, é importante evitar os ciclos de congelamento e descongelamento, os quais induzem à formação de cristais de gelo grandes e/ou cristais de lactose (WALSTRA *et al.*, 1999; TRGO, 2003-2004; McCLEMENTS, 2005).

Quanto à produção industrial e mercado de consumo, têm-se registros da difusão dos sorvetes na Europa desde 1770. Nesse período, os conhecimentos sobre a produção do sorvete foram transferidos da Europa para os Estados Unidos, provavelmente por colonizadores ingleses. A partir de então, os americanos tornaram-se os pioneiros na produção industrial de sorvetes, sendo que a primeira planta de produção industrial de sorvetes entrou em funcionamento na década de 1850 (ANDREASEN & NIELSEN, 1998).

No Brasil, a produção e o consumo de sorvetes têm crescido constantemente nos últimos anos. Em 2005, a produção foi de 499 milhões de litros e o faturamento de US\$ 811 milhões. Em 2006, o mercado cresceu 6% e alcançou 505 milhões de litros e US\$ 860 milhões (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE SORVETES, 2007). Já em 2007, o consumo de sorvetes cresceu 17,4% em volume e 13% em valor, crescimento este considerado destaque dentro da categoria de alimentos perecíveis (NIELSEN, 2008).

1.9.1 O desenvolvimento de sobremesas lácteas congeladas probióticas e simbióticas

Sorvetes e sobremesas congeladas são veículos promissores para microrganismos probióticos e sua presença nesse tipo de produto normalmente não compromete as suas características sensoriais (TAMIME *et al.*, 2005; AKALIN & ERIŞIR, 2008). Contudo, o congelamento e descongelamento em produtos probióticos mantidos congelados, como o *frozen yogurt* e o sorvete, causam injúrias às células, como morte celular, inibição do desenvolvimento e, redução ou interrupção da atividade metabólica (ALAMPRESE *et al.*, 2002). Dessa maneira, durante a produção e o período de armazenamento expandido desses alimentos, devem ser consideradas as condições rigorosas de congelamento sobre a viabilidade das culturas adicionadas, a fim de garantir que o produto forneça quantidades adequadas de microrganismos probióticos para o consumidor (TAMIME *et al.*, 2005; AKALIN & ERIŞIR, 2008).

A suplementação do produto com probióticos pode ser direta, com a mistura do(s) probiótico(s) à calda do sorvete imediatamente antes do congelamento, ou pode ser incluída uma etapa de fermentação para a multiplicação dos microrganismos probióticos, antes de adicioná-los à calda do sorvete. Em ambos os casos, a proteção das células contra possíveis danos do congelamento é imprescindível (TAMIME *et al.*, 2005).

Pesquisas foram realizadas, com o objetivo de avaliar a sobrevivência de bactérias probióticas em sorvetes obtidos por diferentes processos, como a fermentação da calda do sorvete (HEKMAT & McMAHON, 1992; DAVIDSON *et al.*, 2000; AKIN, 2005; FÁVARO-TRINDADE *et al.*, 2006), a sua obtenção a partir de caldas não fermentadas (ALAMPRESE *et al.*, 2002; HAYNES & PLAYNE, 2002) ou através da adição de leite fermentado a uma calda de sorvete convencional (CHRISTIANSEN *et al.*, 1996; HAGEN & NARVHUS, 1999).

Diversos fatores têm sido destacados, por comprometerem a viabilidade das culturas probióticas em produtos lácteos fermentados, como a acidez final do produto, a disponibilidade de nutrientes, o oxigênio dissolvido e a permeabilidade da embalagem ao oxigênio (TAMIME *et al.*, 2005). Segundo DAVIDSON *et al.* (2000), a baixa viabilidade de microrganismos probióticos em sobremesas fermentadas e geladas, como o *frozen yogurt*, deve-se, principalmente, à acidez do produto (pH inferior a 4,5), à injúria pelo frio e à toxicidade do oxigênio, conseqüente à incorporação de ar ao produto durante a sua elaboração, para a obtenção de um produto com *overrun* adequado. Por outro lado, por ser o sorvete um alimento não fermentado, o impacto mínimo da adição do microrganismo probiótico sobre o sabor do produto deve ser levado em consideração (TAMIME *et al.*, 2005).

Combinações de lactobacilos e bifidobactérias foram aplicadas na produção de sorvetes, *frozen* iogurte e sobremesas congeladas. Algumas cepas não resistiram às etapas de congelamento e agitação durante o processo de obtenção desses produtos (HAGEN & NARVHUS, 1999; HAYNES & PLAYNE, 2002). Outras, como *Bifidobacterium. longum* e *Bifidobacterium infantis*, se mantiveram viáveis após o processo de fabricação e o armazenamento por 11 (DAVIDSON *et al.*, 2000) ou 52 semanas (HAYNES & PLAYNE, 2002) e o teor de gordura dos sorvetes não teve influência sobre a viabilidade dos microrganismos. Um estudo envolvendo a avaliação de 13 cepas de *L. acidophilus* e 11 cepas de bifidobactérias mostrou que tal susceptibilidade é cepa-dependente (RAVULA & SHAH, 1998).

ALAMPRESE *et al.* (2002, 2005) estudaram a influência de *Lactobacillus johnsonii* La1 e de *L. rhamnosus* GG em sorvetes com diferentes formulações, com variações nas quantidades de açúcar e de gordura. Os autores observaram elevadas taxas de sobrevivências dos probióticos durante o armazenamento dos produtos por, respectivamente, 8 meses e 1 ano, sem decréscimo na população inicialmente inoculada (10^7 e 10^8 UFC/g, respectivamente). As propriedades funcionais não foram influenciadas pela presença dos probióticos em ambos os estudos.

O sorvete como veículo de probióticos também foi estudado por BAŞYIĞIT *et al.* (2006). Os autores testaram uma mistura de cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *L. agilis* e *L. rhamnosus* de origem humana e verificaram que a viabilidade dos probióticos não foi alterada durante o armazenamento de sorvete por até 6 meses, independentemente da presença de açúcar ou aspartame como edulcorantes. Os autores ressaltaram que o emprego de adoçantes em sorvetes suplementados com culturas probióticas poderá contribuir para carrear esses microrganismos benéficos para pessoas com doenças como a diabetes e obesidade.

As cepas de *L. acidophilus* La-5 e de *B. animalis* Bb-12 foram adicionadas a sorvetes e apresentaram populações médias de 10^6 UFC/g do produto, ao final do período de armazenamento de 60 dias (MAGARIÑOS *et al.*, 2007) e de 85 dias (CORRALES *et al.*, 2007).

Adicionalmente, os ingredientes prebióticos vêm sendo utilizados para aumentar a viabilidade de bactérias probióticas em produtos lácteos. Dentre esses ingredientes, a inulina e oligofrutose são aqueles mais bem avaliados quanto ao efeito prebiótico e como ingredientes substitutos de gordura em alimentos. Esses compostos apresentam diversas propriedades funcionais e nutricionais, podendo ser utilizados para o desenvolvimento de alimentos com características saudáveis e inovadoras destinados ao consumidor atual (SCHALLER-POVOLNY & SMITH, 1999; AKALIN & ERIŞIR, 2008).

SCHALLER-POVOLNY & SMITH (1999) e AKALIN & ERIŞIR (2008) concluíram que a adição de inulina pode auxiliar na sobrevivência e estabilidade de microrganismos probióticos adicionados em sorvetes, contribuindo para o desenvolvimento de sobremesas lácteas congeladas potencialmente simbióticas.

1.10 BARRA DE CEREAL: UM NOVO CONCEITO DE “ALIMENTO SAUDÁVEL”

As barras de cereais foram introduzidas no mercado de alimentos como alternativa “saudável” de confeito. Posteriormente, a expansão do segmento de barras de cereais no setor de alimentos é considerada como sendo função da aplicação de ingredientes com alegação funcional, do aumento da procura por alimentos que contribuem para uma alimentação saudável e de praticidade para o consumo (BOWER & WHITTEN, 2000; FREITAS & MORETTI, 2006a).

As barras de cereais são alimentos de fácil consumo, nutritivos, de sabor adocicado e agradável, fontes de vitaminas, fibras, proteínas e carboidratos (ESTÉVEZ *et al.*, 1995; GUTKOSKI *et al.*, 2007). Elas representam uma categoria

específica do segmento *Confectionery* (produtos alimentícios doces servidos em pequenas porções, CAMBRIDGE DICTIONARIES ONLINE, 2006): produtos com formato retangular, vendidos como unidades e embalados individualmente, denominada *Countlines*. Em termos de mercado de consumo, as barras de cereais são classificadas dentro de seu próprio segmento (GOMES & MONTENEGRO, 2006).

A legislação brasileira define cereais processados como: produtos obtidos a partir de cereais laminados, cilindrados, rolado, inflados, flocados, extrusados, pré-cozidos e/ou por outros processos tecnológicos considerados seguros para a produção de alimentos, podendo conter outros ingredientes, desde que não descaracterizem os produtos. Podem apresentar cobertura, formato e textura diversos (ANVISA, 2005b).

Não existe no Brasil legislação que contemple individualmente os segmentos dos cereais processados, deixando em aberto os parâmetros que caracterizam as barras de cereais. Dessa maneira, atualmente, são os produtos encontrados no mercado e as informações disponíveis na literatura que fornecem as diretrizes para a caracterização desses produtos.

As barras de cereais são produtos multicomponentes e, por isto, podem apresentar relativa complexidade na sua formulação e caracterização. Compondo o segmento “barras de cereais”, estão as misturas de cereais flocados e/ou extrusados com uma calda de açúcares que são as “barras de cereais” propriamente ditas, as barras de granola, que não contém cereais extrusados, e as barras nutricionais, que englobam as barras protéicas ou energéticas, dietéticas, com baixo teor de carboidratos e os produtos especiais em forma de barras (GOMES & MONTENEGRO, 2006).

Os cereais (aveia, arroz, milho, trigo, centeio) compõem a base dos ingredientes secos. As frutas secas, amêndoas, sementes, entre outros, contribuem com a diversificação de sabores e nutrientes. O xarope ligante é basicamente composto por açúcares, óleos e/ou gorduras e lecitina, os quais, após mistura e processamento térmico, apresentam a função aglutinante dos ingredientes secos nas barras de cereais (ESTÉVEZ *et al.*, 1995; MAURER *et al.*, 2005; DUTCOSKY *et al.*, 2006; FREITAS & MORETTI, 2006a; FREITAS & MORETTI, 2006b; GOMES & MONTENEGRO, 2006; GUTKOSKI *et al.*, 2007).

A aveia, laminada em flocos grandes, médios finos, apresenta teor médio de proteínas superior à grande parte dos cereais (12,5 a 24,5% e 9,0 a 11,0%, respectivamente). Apresentam, também, teor considerável de fibras alimentares (9,0

a 11,0%) e de lipídeos totais (3,1 a 10,9%), sendo os ácidos graxos saturados e poliinsaturados a principal fração (GOMES & MONTENEGRO, 2006).

Os cereais extrusados conferem maior crôcância ao produto, menor densidade do produto final e podem ser produzidos a partir de arroz, milho, trigo, açúcar, malte, sal e corante. É importante que a umidade desse ingrediente esteja na faixa de 1 a 3%, para evitar quebra ou perda de crocância. Os diferentes formatos contribuem para o controle do peso, facilidade de compactação e para o aspecto visual do produto final (GOMES & MONTENEGRO, 2006).

As frutas secas, como maçã, morango, ameixa, damasco, figo, uva e banana, entre outras, proporcionam textura, aroma, sabor e cor diferenciados aos produtos e são associadas a um estilo de vida saudável. Representam, ainda, fontes de carboidratos, principalmente na forma de frutose, vitaminas e minerais (VAN DRUNEN, 2002).

As castanhas, como a castanha-do-pará, e as amêndoas são sementes de alto valor nutritivo. São conhecidas pelo seu alto teor calórico, mas são fontes de ácidos graxos mono e poliinsaturados, proteínas, minerais e vitaminas antioxidantes, como o selênio e o α -tocoferol, respectivamente (GOMES & MONTENEGRO, 2006).

Os xaropes ligantes, a base de carboidratos, são utilizados para aglutinar os ingredientes secos e têm grande influência no produto final. O xarope ligante deve proporcionar aspecto vítreo e mastigabilidade, combinando manutenção da estrutura (produto não se desmancha) e maciez no produto final (GOMES & MONTENEGRO, 2006).

Os carboidratos oferecem uma variedade de propriedades reológicas e funcionais, como solubilização, redução da atividade de água, crioproteção, dulçor, higroscopicidade e inibição da cristalização. Possibilitam, ainda, a encapsulação de aromas, além de apresentarem a propriedade de cobertura. Essas propriedades estão baseadas na estrutura química e nas interações dos carboidratos com outras moléculas, através de pontes de hidrogênio, interações iônicas e formação de complexos com lipídeos e proteínas (CHINACHOTI, 1995).

Uma gama de açúcares pode ser utilizada na formulação dos xaropes ligantes. Os açúcares cristal, refinado, demerara e mascavo, assim como o açúcar líquido, xarope de glicose, melaço, mel e a maltodextrina, entre outros, podem ser utilizados como fontes de sacarose, glicose, frutose, maltose, maltotriose, oligossacarídeos e polissacarídeos (GOMES & MONTENEGRO, 2006).

A função dos óleos e gorduras no xarope contempla aspectos nutricionais e tecnológicos, destacando-se o fornecimento de energia e de ácidos graxos essenciais,

a contribuição para a “sensação bucal” característica das barras de cereais, o auxílio na liberação dos aromas, a redução da aderência na linha de produção e na embalagem e melhoria do desempenho do produto nos equipamentos de processo (GOMES & MONTENEGRO, 2006). Para compor as formulações das barras de cereais, são utilizadas gorduras e óleos vegetais, como os óleos de soja, palma e girassol (ESTÉVEZ *et al.*, 1995; MAURER *et al.*, 2005; DUTCOSKY *et al.*, 2006; FREITAS & MORETTI, 2006a; FREITAS & MORETTI, 2006b; GOMES & MONTENEGRO, 2006; GUTKOSKI *et al.*, 2007).

Outros componentes essenciais das formulações das barras de cereais são os estabilizantes e/ou emulsificantes. As lecitinas são surfactantes encontrados na natureza, como moléculas tenso-ativas que podem ser extraídas de várias fontes, entre elas a soja, as sementes de colza e os ovos. As lecitinas são misturas complexas de lipídeos e fosfolipídios, sendo esses formados por uma extremidade hidrofílica ligada à outra lipofílica, característica que confere às lecitinas a função de estabilizantes e/ou formadores de emulsões em alimentos (McCLEMENTS, 2005).

Atualmente, as barras de cereais e correlatos estão sendo avaliadas como substituto de refeições em dietas de redução de peso (WAL *et al.*, 2007; CHILDS *et al.*, 2007), para a suplementação da dieta com isoflavonas isoladas (HALLUND *et al.*, 2006), proteínas da soja (FREITAS & MORETTI, 2005), feijões (MAURER *et al.*, 2005), prebióticos (DUTCOSKY *et al.*, 2006) e para a introdução de bactérias probióticas em alimentos que não necessitem de armazenamento sob refrigeração (OUWEHAND *et al.*, 2004).

A associação entre barra de cereais e outros alimentos que contribuem para uma alimentação saudável é uma tendência já documentada no setor de alimentos, o que beneficia o mercado desses produtos (BOUSTANI & MITCHELL, 1990; GUTKOSKI *et al.*, 2007). No mercado de consumo, as barras de cereais têm registrado desde 2003, em média, 14% de crescimento ao ano. Em 2001, o mercado brasileiro de barras de cereais foi de R\$ 80 milhões, já em 2005 movimentou mais de R\$ 95 milhões (BARBOSA, 2001; ALIMENTO SEGURO, 2008).

1.11 O CONTEXTO PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO ALIMENTÍCIO FUNCIONAL

A crescente demanda por alimentos que contribuam para uma dieta saudável está estimulando inovações e o desenvolvimento de novos produtos na indústria de alimentos em todo o mundo. Para os mercados futuros de alimentos funcionais,

novas categorias de produtos certamente compõem a área chave para o setor de pesquisa e desenvolvimento (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002).

Saúde, bem estar e conveniência transformaram-se nas principais diretrizes para uma ampla variedade de categorias de alimentos, das bebidas, aos cereais prontos para consumo. Em uma era em que os avanços tecnológicos avançam de maneira exponencial, as expectativas dos consumidores evoluem de maneira ainda mais rápida. No setor de alimentos, esses caminhos levam ao desenvolvimento de produtos que agreguem conveniência, funcionalidade, nutrição e, acima de tudo, qualidade sensorial superior para todos os produtos (PATIL *et al.*, 2005).

Estudos para avaliar a funcionalidade de ingredientes específicos derivados de proteínas do leite, a adição de ingredientes promotores da saúde, como vitaminas e culturas probióticas, e a utilização de novas tecnologias no processo de fabricação apresentam-se como uma crescente tendência na tecnologia de obtenção de sobremesas lácteas congeladas (PSZCZOLA, 2002).

Nos EUA, as “novidades congeladas” constituem um grupo de produtos que abrange os sanduíches de sorvete, *frozen ices*, sorvetes em barra, barras de sucos ou frutas, cones de sorvete, picolés com coberturas e inúmeras outras formas de produtos congelados em porções individuais. Esses produtos diferem das sobremesas congeladas disponíveis em embalagens de porções múltiplas, tanto pelos processos de produção, formatação e embalagem, como pela incorporação de ar (*overrun*) reduzida (MARSHALL, 2001; PAPADEMÁS & BINTSIS, 2002).

Uma grande variedade de sorvetes combinados com *cookies*, confeitos e bolos pode ser encontrada no comércio. Adicionalmente, pode ser observado um número crescente de lançamentos de sobremesas congeladas com baixo teor de gordura e “sem adição de açúcar”, *frozen* iogurtes, combinações de sorvete e *sherbet*, além de produtos inovadores apresentando uma ampla variedade de sabores, formatos e cores (PSZCZOLA, 2002).

Por outro lado, é conhecido o fato de que os sorvetes e sobremesas congeladas se apresentam como alimentos de alto valor energético. Isto faz destes alimentos produtos destinados, em especial, para crianças em fase de crescimento e para pessoas que necessitam aumentar o peso. Pela mesma razão, seu uso controlado encontra lugar nas dietas para pessoas que necessitam reduzir ou não desejam ganhar peso (MARSHALL & ARBUCKLE, 2000). Nesse contexto, as sobremesas lácteas congeladas, em particular, apresentam potencial para o desenvolvimento de produtos com baixo teor de gordura. Porém, a redução de

gorduras e calorias é um importante desafio para a área de pesquisa e desenvolvimento da indústria de alimentos (KOEFERLI *et al.*, 1996; EL-NAGAR *et al.*, 2002; OLSON *et al.*, 2003), uma vez que modificações no teor de gordura resultam em variações de sabor e textura, as quais são relevantes para a aceitação do produto pelo consumidor (EL-NAGAR *et al.*, 2002).

Esforços têm sido focados na produção de sorvetes com teor reduzido de gordura mais saborosos (GUINARD *et al.*, 1997). Isso ocorre, em virtude da expectativa, por parte dos consumidores, por produtos isentos ou com o teor reduzido de gordura que apresentem sabor, corpo, textura e palatabilidade semelhantes aos produtos tradicionais (KOEFERLI *et al.*, 1996; EL-NAGAR *et al.*, 2002; OLSON *et al.*, 2003).

As indústrias de alimentos estão apontando para os alimentos funcionais como sendo uma promissora área em crescimento, ênfase essa que tem renovado o interesse em um dos nutrientes bastante discutidos no setor – as fibras alimentares (REDGWELL & FISCHER, 2005; JONES & JEW, 2007).

O contínuo destaque à importância das fibras na dieta Ocidental e a necessidade de disponibilizar produtos de valor calórico reduzido pressiona a indústria de alimentos a implementar mais pesquisas para o desenvolvimento de produtos enriquecidos com fibras. O desafio está em alcançar esse objetivo, sem prejudicar as principais características sensoriais desses produtos (REDGWELL & FISCHER, 2005).

As barras de cereais estão inseridas em um mercado de produtos inovadores que agregam conveniência e saúde, por serem consideradas práticas para o consumo e como alimentos ricos em fibras (GOMES & MONTENEGRO, 2006).

Estudo realizado por BOWER & WHITTEN (2000) avaliou as características das barras de cereais que levam ao consumo do produto. Os fatores destacados foram: sabor, textura, aparência e “apelo saudável”. Assim, pode ser observado que existe a necessidade de desenvolver alimentos, que além da potencial contribuição para a saúde do consumidor, possuam características sensoriais em acordo com as expectativas do consumidor.

Dessa maneira, alimentos convencionais e pouco convencionais vêm apresentando boas perspectivas como veículos para probióticos e/ou prebióticos, disponibilizando alternativas de alimentos que contribuem para uma alimentação saudável, com características sensoriais favoráveis para o consumidor.

Dando continuidade às pesquisas para o desenvolvimento de alimentos que sejam potenciais veículos para microrganismos probióticos e ingredientes prebióticos,

torna-se essencial a busca por alimentos inovadores que forneçam ao consumidor saúde e praticidade. O desenvolvimento desses alimentos auxiliaria, ainda, na supressão da demanda existente por produtos que auxiliem na manutenção de um bom estado de saúde, mas que mantenham a aceitabilidade sensorial dos produtos convencionais. Dessa maneira, torna-se interessante o desenvolvimento de um produto que associe os já conhecidos benefícios funcionais e tecnológicos dos microrganismos probióticos e ingredientes prebióticos às expectativas dos consumidores por produtos que contribuam para uma alimentação saudável, que sejam práticos para o consumo e que ofereçam uma boa relação de custo/benefício. Portanto, o desenvolvimento de uma sobremesa láctea congelada, a partir da união de um alimento gelado comestível e de uma barra de cereais, que se apresente para o consumidor como alternativa de alimento funcional adicionado de probióticos e/ou prebióticos e outras fibras, de praticidade para o consumo e com quantidades não significativas de gorduras *trans* parece bastante promissora.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

- Desenvolver um produto alimentício a partir da associação de uma barra de cereais a um gelado comestível com baixo teor de gordura e adicionado de microrganismos comprovadamente probióticos (*Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* Bb-12), suplementado ou não com o ingrediente prebiótico inulina, para consumo em porções individuais;
- Verificar a viabilidade dos probióticos adicionados à porção gelado comestível;
- Avaliar a aceitabilidade do ponto de vista sensorial e suas características físico-químicas durante o armazenamento a -18°C .

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESCRIÇÃO DO PRODUTO ALIMENTÍCIO DESENVOLVIDO

O produto desenvolvido foi elaborado a partir da união de uma barra de cereais a uma camada de gelado comestível, para obter uma sobremesa congelada, em formato de barra, com duas camadas distintas (**figura 2**) e dimensões aproximadas de 8,5 x 3,5 x 2,5 cm e 70 g por porção (50 g de gelado comestível e 20 g de barra de cereal). As proporções dos ingredientes, para a porção gelado comestível, de acordo com os diferentes tratamentos estudados (T1, T2, T3 e T4), e para a barra de cereais, seguiram as diferentes formulações apresentadas nas **tabelas 4 e 5**, respectivamente.

No presente trabalho, será denominado “gelado comestível” a porção do produto obtida a partir das formulações apresentadas na **tabela 4** e do processo representado pela **figura 3**. A porção do produto designada como “barra de cereais”, por sua vez, será aquela obtida através da formulação e processo indicados na **tabela 5** e na **figura 4**, respectivamente. O produto, em sua apresentação final, conforme ilustrado na **figura 5**, será denominado de sobremesa láctea congelada.

Figura 2. Sobremesa láctea congelada desenvolvida, com dimensões aproximadas de 8,5 x 3,5 x 2,5 cm e 70 g por porção (50 g de gelado comestível e 20 g de barra de cereal).

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental, aplicado à porção gelado comestível do produto, foi inteiramente casualizado, utilizando um planejamento fatorial 2^2 , constituído de 2 fatores (inulina e substituto de gordura), em 2 níveis (presença ou ausência), conforme ilustrado na **tabela 1**. Foram realizados experimentos para todas as possíveis combinações nos níveis dos fatores (LAWLESS & HEYMANN, 1999; BARROS NETO *et al.*, 2007). Portanto, foram realizadas 4 combinações em termos de adição ou não de inulina e adição ou não do substituto de gordura na porção gelado comestível, durante a produção do cereal em barra com gelado comestível simbiótico.

Tabela 1. Matriz de planejamento fatorial para a elaboração da porção gelado comestível do produto desenvolvido.

Tratamento	Probióticos ¹	Prebiótico (inulina) ²	Substituto de gordura a base de proteínas do soro de leite ³
T1	+	-	-
T2	+	+	-
T3	+	-	+
T4	+	+	+

¹ *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca)

² Beneo® GR (Orafti, Oreye, Bélgica)

³ Simplesse® (CP Kelco, Limeira, Brasil)

+ Presença

- Ausência

3.3 ENSAIOS PRELIMINARES

3.3.1 Definição da porção do produto

Os procedimentos para a obtenção das quatro formulações definitivas para a porção gelado comestível do produto, de acordo com o delineamento experimental proposto, e de uma formulação para a porção de cereal em barra, iniciaram-se pela definição da porção em gramas de cada parte constituinte do produto.

Conforme mencionado anteriormente, a Legislação Brasileira estipula as diretrizes para que um alimento seja considerado probiótico e/ou prebiótico a partir, respectivamente, da população mínima viável dos microrganismos e da quantidade de ingrediente prebiótico que devem estar presentes na porção do produto alimentício. A quantidade mínima viável para os probióticos, na porção diária do alimento, deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC, enquanto que a porção diária de um alimento sólido pronto para consumo deve fornecer, no mínimo, 3 g de inulina (ANVISA, 2008). A legislação estabelece, ainda, para “sorvetes individuais” a porção de 60 g ou 130 mL e para “barras de cereais” a porção de 20 g (ANVISA, 2003a).

A partir dessas informações, optou-se por desenvolver um produto contendo: uma porção de 50 g de gelado comestível e de 20 g de barra de cereais, com a apresentação de 70 g para o produto final.

Também foi considerado o fato de que o desenvolvimento de um produto que se apresente com 70 g por porção individual é compatível com produtos com propostas similares (a união de um gelado comestível com ingredientes diferenciados) existentes no mercado brasileiro, conforme apresentado na **tabela 2**.

3.3.2 Ensaios preliminares para a definição das formulações e das etapas do processo de produção

A etapa de testes preliminares foi conduzida com o objetivo de avaliar o desempenho dos ingredientes e ajustar suas proporções, definir as etapas do processo de elaboração do produto e observar as suas características sensoriais.

Foram conduzidos 9 ensaios, durante os quais foram obtidas amostras da porção gelado comestível e do produto contendo as duas camadas, a de gelado comestível e a de cereais em barra, de acordo com a apresentação final do produto.

Ao final dessa etapa, além das formulações definitivas, foram definidos o fluxograma das etapas de processo e a quantidade de cada microrganismo probiótico a ser adicionada.

3.3.2.1 Ensaios preliminares para porção gelado comestível

Testes preliminares foram realizados para ajustar a formulação da porção gelado comestível, sem a adição dos microrganismos probióticos, para adequar as características sensoriais do produto e as condições de processo. Os testes iniciaram-se com formulações que apresentaram a seguinte composição: 62% de água, 17% de açúcares, 12% de sólidos não gordurosos do leite, 3% de gordura láctea (6,5% de creme de leite com teor de 35% de gordura), 0,10% de aroma de baunilha e concentrações de estabilizantes e emulsificantes entre 0,40 e 0,60%. Entretanto, essa composição não foi adequada para resultar em um produto firme o suficiente para compor um produto em formato de barra.

Assim, a partir dos conceitos de sorvete macio, convencional e firme, apresentados por WALSTRA *et al.* (1999), foram realizados novos testes para desenvolver uma formulação-base adequada para a porção gelado comestível do produto. No contexto do atual trabalho de pesquisa, pode ser compreendida como formulação adequada aquela que possibilita a manutenção da forma “em barra” do produto durante o seu armazenamento e consumo, mas que apresente uma composição fraca o suficiente para se desestruturar na boca.

Para tanto, foram adicionados agentes modificadores de textura (espessantes) às fórmulações em teste, ou seja, três polissacarídeos - as gomas guar, carragena e xantana e a gelatina, de base protéica. A adição desses ingredientes contribuiu para a manutenção da forma de barra do produto, tanto durante a produção quanto durante o consumo.

Tabela 2. Sobremesas lácteas congeladas compostas de ingredientes diversificados, disponíveis no mercado brasileiro para consumo em porção individual.

Fabricantes	Produtos	Porção(g)	Kcal (porção)
Sorvetes Nestlé®, Nestlé, Brasil*	Mega Trufa	77	250
	Mega Trufa Branco	77	260
	Mega Extras Avelãs	72	230
	Mega Extras Amoras	71	230
	Moça Fiesta Brigadeiro	57	160
	Alpino	60	235
	Tropo Morango	79	210
	Extrême Capuccino	86	260
	Extrême Gold	84	250
	Extrême Torta de limão	83	242
	Extrême Trufas	96	240
	Charge - cone	75	274
	Crunch - cone	75	257
	Prestígio - cone	75	250
	Média	76,21	239,14
Sorvetes KIBON®, Unilever, Brasil**	Cornetto em Barra	64	198
	Cornetto Choc Mix	81	256
	Cornetto Crocante	78	237
	Cornetto Brigadeiro	84	259
	Cornetto Royal Morango	82	249
	Cornetto Sundae Chocolate	86	178
	Cornetto Sundae Frutas Vermelhas	82	132
	Eski-Bom clássico	48	164
	Magnum Clássico	77	228
	Magnum Special	85	290
	Magnum Amêndoas	71	231
	Média	76,18	220,18

* Adaptado NESTLÉ (2007)

** Adaptado de KIBON (2007)

A adição das gomas xantana, carragena e guar, como agentes modificadores de textura com a função de espessantes e da gelatina como estabilizante (McCLEMENTS, 2005), está de acordo com a legislação brasileira quanto aos tipos e limites máximos de aditivos a serem adicionados para a categoria de alimentos gelados comestíveis (ANVISA, 2007).

Durante a etapa de ensaios preliminares, também foram reduzidas as concentrações de sacarose e xarope de glicose, para diminuir o gosto excessivamente doce do produto. Devido à necessidade de manter as características de textura do produto final, foi adicionada a polidextrose (Litesse®, Danisco, Redhill, Reino Unido) como substituto de açúcar em todas as formulações.

É válido destacar que a polidextrose apresenta efeitos fisiológicos associados às fibras alimentares. Contudo, a ação da polidextrose como ingrediente prebiótico vem sendo avaliada e a concentração mínima adicionada para a observação de tal efeito seria de 4,0 g (JIE *et al.*, 2000; CRAIG *et al.*, 2000). Como foram adicionadas concentrações inferiores a 2,40% às formulações estudadas, a polidextrose apresenta-se somente com a função tecnológica de substituto de açúcar, para a manutenção do corpo e textura proporcionados por este ingrediente, porém sem contribuir com o gosto doce, uma vez que a polidextrose apresenta dulçor reduzido, em comparação à sacarose.

Como fonte de gordura láctea para o produto, optou-se pela utilização do creme de leite esterilizado (Nestlé®, Araçatuba, Brasil) com 25% de gordura, devido à maior facilidade de armazenamento e obtenção do ingrediente.

Quanto à concentração do substituto de gordura de base protéica (Simplesse®, CP Kelco, Limeira, Brasil), decidiu-se por padronizar a adição em 1,5%, de acordo com recomendação do fornecedor, o qual orienta a adição desse ingrediente na mesma proporção em que a gordura foi retirada.

Após a definição dos ingredientes, a fórmulação foi ajustada utilizando os procedimentos descritos por MARSHALL & ARBUCKLE (2000) para calcular proporções de ingredientes em formulações de sorvetes. Os autores orientaram que a formulação deve ser obtida a partir da composição final desejada para os sólidos totais e não gordurosos do leite (SNGL), gordura, açúcares e para os outros ingredientes a serem adicionados. Os autores fundamentam a sua recomendação no fato de que cada ingrediente adicionado pode participar como fonte, não apenas de um, mas de dois ou mais componentes. É o caso do creme de leite, ingrediente que é, concomitantemente, fonte de gordura láctea, de sólidos não gordurosos do leite e de água. Adicionalmente, sugeriram a retirada do(s) aroma(s) do conjunto de ingredientes que compõe os 100% da formulação e o cálculo da percentagem de aroma diretamente sobre o valor final do lote produzido. Por exemplo, se a quantidade final produzida é de 4,0 kg e deseja-se adicionar 0,10% de aroma, deverão ser adicionados 4,0 g do aroma.

A etapa de maturação da calda foi incluída no processo, por terem sido considerados os potenciais benefícios tecnológicos às características do produto, como hidratação completa de alguns ingredientes e pré-cristalização da gordura. O tempo médio de maturação estabelecido foi de 20 a 22 horas, de acordo com o período máximo estabelecido pela legislação brasileira de 24 horas (ANVISA, 2003b).

Foram realizados testes para o ajuste das concentrações dos microrganismos probióticos e da inulina adicionados. Para tanto, foram consideradas as atuais recomendações para que um alimento seja classificado como probiótico (ANVISA, 2008) e prebiótico (COUSSEMENT, 1999; RAO, 2001; MANNING & GIBSON, 2004; ANVISA, 2008). Portanto, o objetivo foi desenvolver uma formulação para a porção gelado comestível com 8% de inulina e que apresentasse população mínima de 7 log UFC/g para cada um dos microrganismos probióticos adicionados. Dessa maneira, o produto final continha 4 g de inulina e população mínima de 8 log UFC por porção de 70 g.

As etapas do processo para a obtenção da porção gelado comestível foram padronizadas com base nos processos de produção de sorvetes e sobremesas congeladas descritos por OHMES *et al.* (1998), WALSTRA *et al.* (1999), MUSE & HARTEL (2004) e UDABAGE *et al.* (2005), adequando-se essas etapas à estrutura presente nos laboratórios de Tecnologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

3.3.2.2 Definição da quantidade e condições de incorporação de *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis* Bb-12 ao produto.

Durante a realização dos testes, os microrganismos probióticos foram adicionados na proporção de 0,05% à porção gelado comestível do produto. Para tanto, foram esterilizados em autoclave (121°C/ 15 minutos) 40,0 mL de leite em pó desnatado (Molico®, Nestlé, Brasil) reconstituído de acordo com as instruções do fabricante (20 g/ 200 mL de água).

Foram transferidos, assepticamente, 2,0 g da cultura (liofilizada do tipo DVS - *direct vat set*) de cada microrganismo em frascos individuais contendo 40,0 mL de leite desnatado esterilizado. Os frascos foram mantidos em estufa incubadora a 37°C por 90 minutos e adicionadas à porção gelado comestível, durante a sua elaboração, cujas etapas serão apresentadas posteriormente (**figura 3**). Amostras, em triplicada, do produto foram analisadas quanto à viabilidade dos probióticos após as etapas de produção e congelamento a -18°C.

A população mínima de cada microrganismo deveria ser de, no mínimo, 10⁷ UFC/g ou 7,00 log UFC/g, para garantir o limite mínimo estabelecido pela Legislação Brasileira (ANVISA, 2008) de 10⁸ a 10⁹ UFC na porção diária estabelecida para o produto. As populações de *L. acidophilus* foram de 7,11±0,06 log UFC/g, porém as populações para *B. animalis* foram de 6,17±0,07 log UFC/g.

Novo teste foi realizado e foram adicionados 0,06% (2,40 g) de cada microrganismo nas mesmas condições de preparo descritas anteriormente, porém o período de incubação a 37°C foi elevado para 2 horas. Essas medidas garantiram ao produto o mínimo de 10^7 UFC/g de cada microrganismo. As populações de *L. acidophilus* La-5 foram de $7,88 \pm 0,04$ log UFC/g e de *B. animalis* Bb-12, de $7,64 \pm 0,06$ log UFC/g.

Portanto, foi decidido manter a concentração de 0,06% de cada microrganismo para as formulações definitivas do produto.

3.3.2.3 Testes realizados com a porção “cereais em barra”

Paralelamente aos testes realizados para a porção gelado comestível do produto, foram realizados testes para determinar a formulação final para a porção barra de cereais.

A dificuldade encontrada a princípio foi na manutenção da textura crocante e macia da barra de cereais, quando em contato com o gelado comestível. Para contornar tal adversidade, foram realizados testes para avaliar alterações na proporção de sólidos e calda e para realizar ajustes no processo de produção. Porém, foi a inclusão da batedeira planetária (Brastemp, Stand Mixer 300, São Paulo, Brasil) para a realização do processo de mistura da calda aos sólidos que resultou em melhoria significativa para a qualidade de processo e produto final. Quanto ao sabor da barra de cereal, não foram necessários ajustes significativos, apenas foi necessária a redução do teor de açúcares da porção gelado comestível, para ajustar o gosto doce do produto final.

A determinação da composição dos ingredientes da porção barra de cereais foi baseada naquela apresentada por produtos disponíveis no mercado e na formulação apresentada por GOMES & MONTENEGRO (2006).

3.3.3 Ensaios realizados para a seleção dos meios de cultura utilizados durante o estudo

Para a contagem de *B. animalis* Bb-12, foi proposto utilizar o meio de cultura indicado pelo fabricante da cultura - Christian Hansen. O referido meio é preparado pela adição das soluções de dicloxacilina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) (0,5%), cloreto de lítio (Merck, Darmstadt, Alemanha) (1,0%) e hidrocloreto de cisteína (Merck, Darmstadt, Alemanha) (0,5%) ao meio de DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS), modificado pela adição de maltose e preparado de acordo com ALEGRO (2003).

Em trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa (MARUYAMA *et al.*, 2006; CARDARELLI *et al.*, 2008; CORRÊA *et al.*, 2008) e por ROY (2001) e CASTEELE *et al.* (2006), foi utilizado o ágar MRS (Oxoid Ltd. Basingstoke, Reino Unido) adicionado de propionato de sódio (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) (0,3% m/v) e cloreto de lítio (Merck, Darmstadt, Alemanha) (0,2% m/v) (MRS-LP), de acordo com LAPIERRE *et al.* (1992) e VINDEROLA & REINHEIMER (1999; 2000). Nesses trabalhos, o ágar MRS-LP foi utilizado para a contagem seletiva de bifidobactérias em produtos lácteos nos quais *Lactobacillus acidophilus* também estava presente.

Foram realizados dois ensaios para comparar as contagens de *B. animalis* obtidas a partir da utilização do ágar MRS-LP e do ágar formulado de acordo com as instruções do fornecedor da cultura – ágar MRS modificado, de acordo com a Christian Hansen. As condições de incubação, em ambos os casos, foram 37°C, por 72 horas, em anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid).

O primeiro ensaio foi realizado a partir de amostras, em triplicata, dos tratamentos T2 e T3 preparados com a adição dos dois microrganismos probióticos.

Para esse fim, porções de 25 g do produto (retiradas em condições de assepsia) foram homogeneizadas em 225,0 mL de água peptonada 0,1% (Peptona bacteriológica – Oxoid) para preparo da diluição 10^{-1} , utilizando equipamento “Bag Mixer” (Interscience, St. Nom, França). Diluições decimais subseqüentes foram preparadas, utilizando o mesmo diluente.

B. animalis Bb-12 foi enumerado, utilizando-se a técnica da semeadura em profundidade (*pour plate*) de 1,0 mL de cada diluição, em ágar MRS modificado e em ágar MRS-LP.

As contagens obtidas para *B. animalis* Bb-12 foram bastante semelhantes para os dois meios de cultura testados. Para T2, as contagens obtidas foram de $7,10 \pm 0,03$ e $7,10 \pm 0,07$ log UFC/g e para T3 de $7,22 \pm 0,05$ e $7,20 \pm 0,08$ log UFC/g, em ágar MRS-LP e em ágar MRS modificado, respectivamente.

Em um segundo ensaio, foram inoculadas diluições das culturas puras de *L. acidophilus* La-5 e de *B. animalis* Bb-12 (Christian Hansen) no ágar MRS modificado pela substituição da glicose por maltose, como a principal fonte de carboidratos, preparado de acordo com INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1995) para a contagem de *L. acidophilus* em co-cultura com outras bactérias lácticas ou bifidobactérias e no ágar MRS-LP.

Foi realizada a inoculação das culturas puras liofilizadas de *L. acidophilus* La-5 e de *B. animalis* Bb-12 (Christian Hansen), com posterior obtenção das estimativas das concentrações de probióticos presentes nos envelopes contendo as culturas. Para esse fim, 1 g de cada cultura, retiradas em condições de assepsia em fluxo laminar, foi homogeneizado individualmente em 9,0 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}). Diluições decimais subseqüentes foram preparadas, utilizando o mesmo diluente. Posteriormente, alíquotas de 1,0 mL de cada diluição foram transferidas para placas de Petri estéreis. Em seguida, foram adicionados ágar MRS-LP ou ágar MRS adicionado de maltose, fundidos e resfriados a cerca de 45°C. As condições de incubação foram 37°C por 72 horas em anaerobiose para o ágar MRS-LP e em aerobiose para ágar MRS adicionado de maltose.

Os resultados observados revelaram-se apropriados, pois as populações de *L. acidophilus* foram de $8,20 \pm 0,02$ log UFC/g em ágar MRS adicionado de maltose, enquanto as de *B. animalis* foram de $9,66 \pm 0,27$ log UFC/g em ágar MRS-LP. Paralelamente, não houve multiplicação de *B. animalis* em ágar MRS adicionado de maltose, assim como não houve multiplicação de *L. acidophilus* em ágar MRS-LP.

Assim, foi decidido pela utilização do ágar MRS-LP, com incubação a 37°C, por 72 horas em anaerobiose, para a contagem seletiva de *Bifidobacterium animalis* no produto em estudo.

3.4 ENSAIOS DEFINITIVOS

3.4.1 Ingredientes

As proporções para os constituintes das formulações definitivas, referentes aos tratamentos T1 a T4 da porção gelado comestível, são apresentadas na **tabela 3**, conforme delineamento experimental proposto para este trabalho (**tabela 1**).

Formulações convencionais de sorvetes apresentam teor médio de 10 a 17% de gordura, de 8 a 11% de sólidos não gordurosos do leite, de 13 a 17% de açúcar, de 0,2 a 0,5% de estabilizantes / emulsificantes e, como ingrediente em maior quantidade, a água (TRGO, 2003-2004). Com exceção da quantidade de água, as formulações desenvolvidas para a porção gelado comestível no presente estudo são compostas por constituintes, e respectivas proporções, diferenciados quando comparado àqueles presentes nas formulações convencionais de sorvetes, principalmente quanto à adição de espessantes e à concentração de gordura adicionada, a qual é bem inferior.

Tabela 3. Delineamento experimental e proporções definidas para os constituintes das formulações da porção gelado comestível para os tratamentos T1, T2, T3 e T4.

Constituintes (%)	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
Inulina	0,00 [-1]	8,00 [+1]	0,00 [-1]	8,00 [+1]
Substituto de gordura	0,00 [-1]	0,00 [-1]	1,50 [+1]	1,50 [+1]
Gordura láctea	3,00	3,00	1,50	1,50
SNGL*	12,50	12,50	12,50	12,50
Açúcares	9,50	9,50	9,50	9,50
Estabilizante / Emulsificante	0,40	0,40	0,40	0,40
Espessantes	0,48	0,48	0,48	0,48

*Sólidos não gordurosos do leite
T1: ausência inulina e ausência substituto de gordura
T2: presença inulina e ausência substituto de gordura
T3: ausência inulina e presença substituto de gordura
T4: presença inulina e presença substituto de gordura

A **tabela 4** apresenta os ingredientes utilizados nas formulações definitivas para a porção gelado comestível do produto e suas respectivas quantidades.

Tabela 4. Proporção dos ingredientes utilizados nos ensaios definitivos realizados para a porção gelado comestível do produto em estudo.

Ingredientes (%)	Gelado Comestível			
	T1	T2	T3	T4
Emulsificante / Estabilizante ¹	0,40	0,40	0,40	0,40
Sacarose ²	5,70	5,70	5,70	5,70
Xarope de glicose ³	4,75	4,75	4,75	4,75
Polidextrose ⁴	1,98	1,98	1,98	1,98
Goma xantana ⁵	0,12	0,12	0,12	0,12
Goma guar ⁶	0,16	0,16	0,16	0,16
Goma carragena ⁷	0,20	0,20	0,20	0,20
Creme de leite (25% de gordura) ⁸	12,00	12,00	6,00	6,00
Leite em pó desnatado ⁹	12,11	12,11	12,53	12,53
Substituto de gordura (53% de proteínas de soro de leite) ¹⁰	0,00	0,00	1,56*	1,56*
Inulina ¹¹	0,00	8,21*	0,00	8,21*
Água	62,59	54,38	66,60	58,40
Teor de sólidos	27,88	35,88	27,88	35,88
Total	100,0	100,0	100,0	100,0
Aroma de Baunilha ¹²	0,06	0,06	0,06	0,06
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ¹³	0,06	0,06	0,06	0,06
<i>Bifidobacterium animalis</i> ¹⁴	0,06	0,06	0,06	0,06

T1: ausência inulina e ausência substituto de gordura

T3: ausência inulina e presença substituto de gordura

T2: presença inulina e ausência substituto de gordura

T4: presença inulina e presença substituto de gordura

* O teor de umidade dos ingredientes foi considerado nos cálculos para a obtenção de 1,50% de substituto de gordura e 8,00% de inulina no produto final.

¹ SHEREX® IC9516 (Kerry, Campinas, Brasil); ² Açúcar União (Coopersucar União, Limeira, Brasil); ³ (Cargill, Uberlândia, Brasil); ⁴ Litesse® (Danisco, Redhill, Reino Unido); ⁵ Grindsted® Xanthan (Danisco, Redhill, Reino Unido); ⁶ Grindsted® Guar (Danisco, Redhill, Reino Unido); ⁷ Grindsted® Carrageenan (Danisco, Redhill, Reino Unido); ⁸ Nestlé® (Nestlé Ltda., Araçatuba, Brasil); ⁹ Molico® (Nestlé Ltda., Araçatuba, Brasil); ¹⁰ Simplex® (CPKelco, Limeira, Brasil); ¹¹ Beneo® GR (Orafti, Tienen, Bélgica); ¹² Aroma de baunilha (Givaudan, São Paulo, Brasil); ¹³ Cultura liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* La-5 do tipo DVS (Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca); ¹⁴ Cultura liofilizada de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 do tipo DVS (Christian Hansen).

A **tabela 5** apresenta os ingredientes utilizados na formulação definitiva para a porção de cereais em barra e suas respectivas quantidades.

Tabela 5. Proporção dos ingredientes utilizados nos ensaios definitivos realizados para a porção cereais em barra do produto em estudo.

Formulação da barra de cereais			
Sólidos (50%)	%	Calda (50%)	%
Aveia em flocos ¹	36,25	Xarope de glicose ⁷	40,00
Flocos de arroz ²	32,75	Açúcar invertido ⁸	43,10
Castanha-do-pará ³	5,50	Mel ⁹	4,00
Amêndoa ⁴	5,50	Açúcar mascavo ¹⁰	5,00
Uva passa ⁵	12,50	Óleo de girassol ¹¹	7,00
Damasco ⁶	7,50	Lecitina de soja ¹²	0,40
-	-	Sal ¹³	0,50
Total	100	Total	100,00

*A mistura para obtenção da porção cereal em barra é composta de 50% de sólidos e 50% de calda.

¹ (Ferla, São Paulo, Brasil); ² Flocos de arroz (Cerealle, Pelotas, Brasil); ^{3,4,5,6} (Don Pepe, Osasco, Brasil); ⁷ (Cargill, Uberlândia, Brasil); ⁸ (Dulcini, Americana, Brasil); ⁹ (Apiário Ísis, Embu Guaçu, Brasil); ¹⁰ (Jasmine, Curitiba, Brasil); ¹¹ LIZA[®] (Cargill Agrícola AS, Mairinque, Brasil); ¹² CENTROLEX[™] F (The Solae Company, São Paulo, Brasil); ¹³ (Cisne, Cabo Frio, Brasil).

3.4.2 Fabricação do cereal em barra com gelado comestível simbiótico

A **figura 3** ilustra as principais etapas de fabricação da porção gelado comestível para as quatro formulações (T1 a T4) desenvolvidas no presente trabalho. Ao final de cada lote produzido, foram obtidos 4,00 kg da porção gelado comestível.

¹ Geiger UMMSK-12 (Geiger, Pinhais, PR, Brasil)

² Skymen BSK-16 (Metalúrgica Siemens Ltda, Brusque, Brasil)

³ Metalfrio, VB43R (Metalfrio, São Paulo, Brasil)

⁴ Metalfrio, VF50R (Metalfrio)

Figura 3. Fluxograma utilizado na elaboração da porção gelado comestível da barra de cereais com gelado comestível simbiótico.

A **figura 4** ilustra as principais etapas de fabricação da porção de cereais em barra da barra de cereais com gelado comestível simbiótico.

Ao final de cada lote produzido, foram obtidos 1,72 kg da porção barra de cereais.

Figura 4. Fluxograma utilizado na elaboração da porção barra de cereais da barra de cereais com gelado comestível simbiótico.

A **figura 5** ilustra as principais etapas envolvidas na fabricação do cereal em barra com gelado comestível simbiótico, ou seja, o produto final já com as duas camadas.

* Polipropileno bio-orientado

¹ Metalfrio, VF50R (Metalfrio, São Paulo, Brasil)

Figura 5. Fluxograma utilizado na elaboração do cereal em barra com gelado comestível simbiótico.

3.5 REPETIÇÕES, CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E PERÍODOS DE AMOSTRAGEM

3.5.1 Repetições

Após a definição das formulações para as duas porções do produto e das etapas do processo de produção, foram realizadas três produções (três lotes) de cada tratamento (T1 a T4) da porção gelado comestível para a realização das análises físico-químicas, microbiológicas (contagem dos microrganismos probióticos) e de determinação da composição centesimal. Também foram realizadas três produções da porção barra de cereais, para a determinação da composição centesimal dessa porção do produto.

Optou-se pela realização de produções distintas para cada porção do produto, em virtude da dificuldade em se separar as duas camadas no produto já elaborado, o que poderia interferir nos resultados das análises.

3.5.2 Condições de armazenamento

A porção gelado comestível do produto, já aerada e congelada a aproximadamente -4 a -5°C , foi armazenada a $-18\pm 3^{\circ}\text{C}$ em congelador vertical (Metalfrio, mod. VF50R, São Paulo, Brasil) por até 168 dias.

As barras de cereais produzidas para determinação da composição centesimal do produto foram armazenadas a $-18\pm 3^{\circ}\text{C}$, em congelador vertical (Metalfrio, mod. VF50R), até o momento de realização das análises.

Para a realização das análises sensoriais, a sobremesa láctea congelada (produto final em bicamada) foi armazenada a $-18\pm 3^{\circ}\text{C}$, por até 84 dias, em congelador vertical (Metalfrio, mod. VF50R, São Paulo, Brasil).

3.5.3 Períodos de amostragem

Os períodos de amostragem variaram, de acordo com a análise realizada e estão apresentados no **quadro 2**.

Dias	0	1	2	7	14	21	28	84	168
Semanas	-	-	-	1	2	3	4	12	24
Análises realizadas									
pH	X	X							X
Overrun		X							
Fração derretimento					X				
Textura					X				
Viabilidade dos probióticos	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Análise sensorial				X			X	X	
Parâmetros microbiológicos sanitários			X						

Quadro 2. Cronograma dos períodos de amostragem adotados para a realização das análises físico-químicas e microbiológicas.

3.6 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS

3.6.1 Parâmetros físico-químicos

3.6.1.1 Preparo das amostras e metodologias utilizadas na determinação da composição centesimal do produto desenvolvido

- Preparo das amostras e metodologias aplicadas à porção gelado comestível

As amostras destinadas às análises para a determinação da composição centesimal da porção gelado comestível foram preparadas após 13 dias de armazenamento em congelador vertical a -18°C , de acordo com INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2005) e AOAC (2000).

Aproximadamente 300 g foram mantidos em temperatura ambiente, em um recipiente para processador, até a liquefação da amostra. Após esse período, o processador foi acionado por 2 minutos e, finalmente, o conteúdo foi dividido em três potes plásticos previamente esterilizados. Esse procedimento foi repetido para cada uma das três repetições de cada tratamento estudado, possibilitando a análise, em triplicata, de três amostras independentes por tratamento produzido (triplicatas verdadeiras). As amostras foram novamente armazenadas a -18°C em congelador vertical (Metalfrio) e, com exceção das amostras utilizadas para a determinação do teor de sólidos totais e cinzas, encaminhadas para liofilização.

A liofilização das amostras foi conduzida após o congelamento das amostras a -60°C , em liofilizador Edwards L4KR Modelo 118 (BOC Edwards, São Paulo, Brasil), com o sistema de vácuo operando com pressão de 10^{-1} mbar e com a temperatura do condensador mantida em -40°C . A temperatura final do processo de secagem manteve-se entre 10 e 15°C .

As amostras congeladas e liofilizadas foram, então, armazenadas a $-18\pm 3^{\circ}\text{C}$ em congelador vertical (Metalfrio, mod. VF50R) até o momento da realização das análises.

Com exceção da análise para quantificação dos teores de fibra alimentar total, que foi realizada em duplicata, as demais análises para composição centesimal foram realizadas em triplicata a partir de amostras de cada lote produzido para as duas porções do produto.

As análises físico-químicas realizadas para a determinação da composição centesimal da porção “gelado comestível” do produto foram:

- Teor de sólidos (sólidos totais) a 70°C, em estufa a vácuo (modelo 440/D, Nova Ética, Vargem Grande Paulista, Brasil), a partir de amostras com 5 g, de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (2005).
- Fração cinza ou resíduo mineral fixo, determinada gravimetricamente pela incineração de 5 g de amostra a 550°C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).
- Proteínas, através da análise do conteúdo de nitrogênio total pelo método micro-Kjeldahl, utilizando o fator de conversão 6,37, adaptado de AOAC (2003a,b).
- Lipídeos totais, determinado através do método de Folch (Christie, 1982).
- Teor de fibra alimentar, excluindo frutanos e polidextrose, obtido através de método enzimático-gravimétrico, de acordo com PROSKY *et al.* (1988) e FILISETTI-COZZI & LAJOLO (1991)

Teor de frutanos e polidextrose foi calculado a partir da colaboração dos fabricantes da inulina e polidextrose (Orafti, Oreya, Bélgica e Danisco, Redhill, Reino Unido, respectivamente). Foram utilizadas as informações dos laudos fornecidos para cada lote empregado na fabricação da porção gelado comestível do produto em estudo. Os valores do conteúdo total em inulina e polidextrose, presentes nos laudos técnicos enviados, foram utilizados para corrigir, através de cálculos, a quantidade adicionada de cada ingrediente. Dessa maneira, obteve-se a quantidade de fibra alimentar fornecida pela inulina e polidextrose, que somada aos valores obtidos pela análise realizada para quantificar o conteúdo de fibra alimentar total, constituiu o valor de fibra alimentar total mais frutanos e polidextrose da porção gelado comestível para os tratamentos avaliados no presente estudo.

- Carboidratos (excluindo FAT), calculado pela diferença para se obter 100% da composição total.

- **Metodologias aplicadas à porção barra de cereal**

A determinação da composição centesimal da porção barra de cereais foi realizada a partir de amostras de cada um dos três lotes produzidos, armazenadas a $-18\pm3^{\circ}\text{C}$ em congelador vertical (Metalfrio, mod. VF50R) até o momento da realização das análises.

As análises físico-químicas realizadas para a determinação da composição centesimal da porção barra de cereais do produto foram:

- Teor de sólidos (sólidos totais) a 70°C, em estufa a vácuo (modelo 440/D, Nova Ética), a partir de amostras com 5 g, de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (2005).

- Fração cinza ou resíduo mineral fixo, determinada gravimetricamente pela incineração de 5 g de amostra a 550°C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).
- Proteínas, através de análise do conteúdo de nitrogênio total pelo método micro-Kjeldahl, utilizando o fator de conversão 5,36, adaptado de AOAC (2003a,b).
- Lipídeos totais, determinado através da extração com éter etílico, utilizando o extrator de Soxhlet (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).
- Teor de fibra alimentar total obtido através de método enzimático-gravimétrico, de acordo com PROSKY *et al.* (1988) e FILISETTI-COZZI & LAJOLO (1991)
- Carboidratos (excluindo FAT), calculado pela diferença para se obter 100% da composição total.

3.6.1.2 Cálculo do valor energético total (VET)

Os teores de macronutrientes foram convertidos em quilocalorias por meio dos fatores de Atwater e da energia oriunda da inulina e polidextrose [(4 kcal × g proteína) + (4 kcal × g carboidratos) + (9 kcal × g total lipídios) + (1,5 kcal × g inulina) + (1 kcal × g polidextrose)] para determinar o valor energético total (VET) médio de cada uma das quatro formulações da porção gelado comestível e da formulação da barra de cereais (ROBERFROID, 1999, 2005b; ANVISA, 2003b; AUERBACH *et al.*, 2007).

3.6.1.3 pH

Os valores de pH foram obtidos a partir de amostras, em triplicata, de cada lote produzido da porção gelado comestível, em medidor de pH Analyser Modelo 300M (Analyser, São Paulo, Brasil), com a utilização eletrodo tipo penetração para amostras de alimentos sólidos e semi-sólidos, modelo DME-CF (Analyser).

3.6.1.4 *Overrun* – Incorporação de ar

Minúsculas bolhas de ar são normalmente incorporadas à calda de sorvetes e de sobremesas congeladas, durante a etapa de aeração e congelamento simultâneos. O volume de ar incorporado depende do processo de fabricação e da composição do produto (TRGO, 2003-2004).

A proporção de ar incorporado à calda durante o batimento e congelamento simultâneos é denominada *overrun*. No presente trabalho, o *overrun* foi obtido a partir de uma amostra de cada lote produzido, de acordo com TRGO (2003-2004) e MUSE & HARTEL (2004), através do seguinte cálculo:

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

onde p = peso em 250 mL

3.6.1.5 Fração de derretimento

A fração de derretimento foi avaliada, de acordo com LEE & WHITE (1991), NABESHIMA *et al.* (2001) e MUSE & HARTEL (2004), para todos os tratamentos em estudo, a partir de quatro amostras de cada um dos lotes produzidos da porção gelado comestível do produto.

Para esse fim, provetas volumétricas graduadas foram acopladas a um funil de vidro e mantidas em estufa para manutenção da temperatura a $25,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$. As amostras, armazenadas a -18°C por 14 dias, foram retiradas do congelador e pesadas ($50,0 \pm 0,50\text{g}$) sobre malha de aço inox. As malhas contendo as amostras foram imediatamente levadas à estufa a $25,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ e acomodadas sobre os funis. 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.

A análise foi conduzida em apenas um período durante o armazenamento do produto, após 14 dias de armazenamento a -18°C , uma vez que foi verificado, assim como descrito nos trabalhos realizados por LEE & WHITE (1991), NABESHIMA *et al.* (2001) e MUSE & HARTEL (2004), que não ocorreram variações significativas das características de derretimento das amostras mantidas em temperaturas de -18°C .

Os volumes drenados e os períodos de coleta 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. Os cálculos foram realizados, de acordo com os autores acima citados e com a utilização do programa Excel versão 2003 (Microsoft Corporation, USA).

3.6.1.6 Avaliação do parâmetro dureza a partir da análise de textura instrumental

De acordo com GUINARD *et al.* (1997), LU *et al.* (2002), EL-NAGAR *et al.* (2002) e MUSE & HARTEL (2004), mesmo sendo os sorvetes produtos que apresentam alta sensibilidade a variações de temperatura, é possível realizar análise de textura instrumental em temperatura ambiente para avaliar a dureza de sorvetes. Os cuidados necessários devem ser o rigoroso controle da temperatura ambiente e agilidade ao realizar as medições. Essas condições foram cumpridas neste trabalho,

uma vez que a temperatura ambiente do laboratório de análise foi mantida a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ e o tempo para realizar cada medição não foi superior a 30 segundos.

Outros fatores que podem ter influência sobre os resultados analíticos são as dimensões e preparo das amostras. De acordo com AIME *et al.* (2001), o preparo de cada amostra para a avaliação da dureza deve seguir uma rotina rigorosa para o controle da temperatura. Assim, no dia anterior à realização da análise, as barras preparadas apenas com a porção gelado comestível, uma por vez, tiveram suas embalagens retiradas e com um cilindro oco de metal foram cortadas amostras da parte central de cada barra, estas foram acondicionadas em recipiente plástico e, novamente, armazenadas a -18°C . As dimensões finais obtidas foram amostras cilíndricas com altura de $2,6\pm 0,02$ cm e diâmetro fixo de 2 cm. Foram analisadas 9 amostras de cada lote produzido.

A análise, para avaliar a dureza da porção gelado comestível do produto em estudo, foi realizada através de teste de corte em analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems, Haslemere, Inglaterra), após 14 dias do preparo e armazenamento a -18°C . Os procedimentos para a realização do teste de corte foram adaptados a partir da análise descrita por AIME *et al.* (2001) e de um estudo de aplicação prática, para análise de textura em sorvetes, descrito no manual do analisador de textura utilizado (STABLE MICRO SYSTEMS, 2008). Os dados foram coletados através do programa Texture Expert for Windows – versão 1.20 (Stable Micro Systems).

Para efetuar as medições, as amostras foram transportadas, individualmente, do congelador para o analisador de textura (TA-XT2) em caixa de isopor, de maneira que a amostra ficasse envolta em gelo até o momento da análise.

A análise, realizada em apenas um determinado período do armazenamento (dia 14) e não ao longo do período de armazenamento, vai ao encontro do pressuposto de que a textura dos sorvetes não sofre variações significativas, quando estes são armazenados a temperaturas de -18°C ou inferiores (TRGO, 2003-2004).

O *probe* (acessório) utilizado para as medições de dureza foi o Knife Edge - HDP/BS, indicado pelo manual do programa Texture Expert for Windows – versão 1.20 (Stable Micro Systems Haslemere, Reino Unido), para a análise da textura instrumental de sorvetes (STABLE MICRO SYSTEMS, 2008), sendo semelhante ao utilizado por AIME *et al.* (2001). Para a realização da análise, foram utilizados os seguintes parâmetros: velocidades de pré-teste, teste e pós-teste 2,0, 3,0 e 10 mm/s, respectivamente, para determinar a força (g/F) necessária para romper a amostra do produto.

3.6.2 Determinação dos parâmetros microbiológicos

3.6.2.1 Contagem dos microrganismos probióticos no leite pré-enriquecido e no produto final

Após a definição do meio de cultura utilizado para a contagem de *B. animalis*, conforme descrito anteriormente (**item 3.3.3**), foram realizadas as contagens dos microrganismos probióticos *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis* Bb-12.

As análises foram realizadas, em quadruplicata, para o leite desnatado esterilizado adicionado dessas culturas (leite pré-enriquecido), o qual foi preparado conforme descrito no **item 3.3.2.2** e incubado a 37°C, por duas horas. Para esse procedimento optou-se por utilizar banho metabólico com agitação de aproximadamente 60 r.p.m. (Banho Metabólico Dubnoff MA-095, Marconi, Piracicaba, Brasil), para a obtenção de alíquotas homogêneas. Para a porção gelado comestível do produto, decorridos os tempos de armazenamento descritos no **item 3.5.3**, essas análises foram realizadas em triplicata, para cada lote produzido.

Para a análise do leite pré-enriquecido, 1,0 mL (retirado em condições de assepsia) foi homogeneizado em 9 mL de água peptonada 0,1% (Peptona Bacteriológica - Oxoid) para preparo da diluição 10^{-1} . Diluições decimais subseqüentes foram preparadas, utilizando o mesmo diluente.

Já para a porção gelado comestível, três amostras de cada lote produzido foram analisadas. Para tanto, 25 g do produto (retirados em condições de assepsia) foram homogeneizados em 225,0 mL de água peptonada 0,1% (Peptona Bacteriológica - Oxoid) para preparo da diluição 10^{-1} , utilizando equipamento "Bag Mixer" (Interscience, St. Nom, França). Diluições decimais subseqüentes foram preparadas, utilizando o mesmo diluente.

L. acidophilus La-5 foi enumerado, utilizando-se técnica da semeadura em profundidade (*pour plate*) de 1,0 mL de cada diluição em ágar de Man-Rogosa-Sharpe (MRS), modificado pela substituição de glicose por maltose, de acordo com INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1995). As placas foram incubadas a 37°C, em aerobiose, por 72 horas conforme descrito por DAVE & SHAH (1996), VINDEROLA & REINHEIMER (1999) e SHAH (2000).

B. animalis Bb-12 foi enumerado, utilizando a técnica de semeadura em profundidade (*pour plate*) de 1,0 mL de cada diluição em ágar MRS (Oxoid) modificado pela adição de propionato de sódio e cloreto de lítio – ágar MRS-LP, após 72 horas de incubação em anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid)

a 37°C, conforme descrito por LAPIERRE *et al.* (1992) e por VINDEROLA & REINHEIMER (1999; 2000).

3.6.2.2 Determinação dos parâmetros microbiológicos sanitários

As amostras destinadas à determinação dos parâmetros microbiológicos sanitários foram produzidas para obter o produto em sua versão final, isto é, contendo as duas porções. Portanto, foi produzido um lote de cada tratamento (T1 a T4) para a porção gelado comestível, combinados à porção de barra de cereal, a qual manteve a formulação constante. Três amostras de cada um desses lotes foram destinadas à avaliação dos parâmetros microbiológicos sanitários de acordo com as normas vigentes estabelecidas pela ANVISA (2001).

Para avaliar as condições sanitárias do alimento desenvolvido, foram analisados os microrganismos estabelecidos para os grupos de alimentos: “gelados comestíveis e produtos para o preparo de gelados comestíveis” e “farinhas, massas alimentícias, produtos para e de panificação (industrializados e embalados) e similares” concomitantemente. Dessa maneira, foram investigados coliformes a 45°C, *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, *Bacillus cereus* e *Salmonella* spp. (ANVISA, 2001).

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

Para a pesquisa de coliformes a 45°C (coliformes fecais) foi utilizado o método dos tubos múltiplos. Alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para três tubos contendo o caldo lauril sulfato triptose (Oxoid) os quais foram incubados a 35°C por 48 horas. Após o período de incubação, os tubos positivos foram separados para pesquisa de coliformes a 45°C. Com o auxílio de uma alça, uma alíquota do conteúdo de cada tubo positivo foi transferida para outro tubo contendo caldo EC (Oxoid), com incubação a $45 \pm 0,2^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Foi utilizada a “Tabela NMP – série 3 tubos” para calcular o número mais provável de coliformes fecais por grama do alimento.

Para a pesquisa de colônias suspeitas de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, alíquotas de 0,1 mL de cada diluição das amostras foram semeadas na

superfície de placas contendo ágar Baird-Parker (Oxoid) e incubadas a 35°C por 48 horas.

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

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

3.7 ANÁLISE SENSORIAL

A avaliação sensorial do produto alimentício desenvolvido foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, conforme consta no Ofício CEP n°117/2006 (Protocolo CEP n°387), apresentado em anexo (**anexo II**).

As amostras da sobremesa láctea destinadas às análises sensoriais foram produzidas para a obtenção do produto em sua versão final, isto é, contendo as duas porções. Portanto, foi produzido um lote de cada tratamento (T1 a T4) para a porção gelado comestível, combinados à porção de barra de cereal, a qual manteve a formulação constante.

A análise sensorial, para os quatro tratamentos (T1 a T4), após 7, 28 e 84 dias de armazenamento das amostras a -18±3°C, foi conduzida no Laboratório de Análise Sensorial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Para a avaliação das amostras, foi aplicada a escala estruturada de nove pontos, com variação de gostei muitíssimo (ou 9 pontos) a desgostei muitíssimo (ou 1 ponto) (ROUSSEAU, 2004; LAWLESS & HEYMANN, 1999). Na mesma ficha, foi

solicitado aos provadores que descrevessem quais os atributos sensoriais do produto que mais e menos gostaram. O modelo da ficha de avaliação sensorial utilizada nas análises pode ser observado na **figura 6**.

Nome: _____	Data: __/__/__
Produto: "Sobremesa láctea congelada, em barra, com cereais, frutas e castanhas"	
	nº amostra
Por favor, prove a amostra que você acabou de receber, e em seguida, circule o número na escala abaixo que indique a sua opinião geral sobre o produto.	
9 = gostei muitíssimo 8 = gostei muito 7 = gostei moderadamente 6 = gostei ligeiramente 5 = nem gostei nem desgostei 4 = desgostei ligeiramente 3 = desgostei moderadamente 2 = desgostei muito 1 = desgostei muitíssimo	
Cite a característica que você mais gostou na amostra: ☺ Comente: _____	
Cite a característica que você menos gostou na amostra: ☹ Comente: _____	

Figura 6. Modelo da ficha de avaliação sensorial utilizando escala hedônica estruturada de nove pontos.

Para a realização do teste de aceitabilidade, foram servidas monadicamente aos provadores amostras com aproximadamente 30 g da barra de cereais com gelado comestível, embaladas individualmente em filme BOPP (Polipropileno bio-orientado) coextrusado monocamada e devidamente seladas e identificadas com três dígitos numéricos aleatórios (**figura 7**).

Figura 7. Amostra da sobremesa láctea congelada e ficha de avaliação sensorial apresentadas aos provadores.

Em cada período de análise, as amostras foram avaliadas, de acordo com DRAKE (2007), por 50 provadores não treinados (consumidores), de ambos os sexos, com idade entre 18 a 60 anos. Os provadores foram recrutados entre os

funcionários, alunos e docentes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e de outras unidades da Universidade de São Paulo (USP – São Paulo), sendo avaliadas, de um mesmo tratamento, 25 amostras no período da manhã (09h30min – 10h30min) e 25 amostras no período da tarde (14h30min – 16h30min). No total, foram realizadas 600 avaliações distribuídas em 12 períodos de análise.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados, conforme o delineamento experimental proposto no **item 3.2** de Material e Métodos, utilizando o pacote estatístico Statistica, versão 7.0 para Windows (Statsoft Inc.).

Os resultados obtidos para todas as avaliações realizadas durante o estudo foram analisados através da estatística descritiva e expressos como média $\pm$ desvio padrão. Com exceção dos resultados para a composição centesimal e para a avaliação dos parâmetros microbiológicos sanitários, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, para verificar possíveis diferenças entre os tratamentos estudados e/ou a influência do período de armazenamento sobre os demais parâmetros avaliados.

A homogeneidade de variância entre os tratamentos e ao longo do armazenamento foi verificada através dos testes de Hartley, Cochran e Bartlett adotando-se $\alpha=0,01$ para os resultados obtidos para as análises sensoriais realizadas e $\alpha=0,05$ para os demais parâmetros avaliados.

A comparação dos resultados, para os parâmetros físico-químicos entre os diferentes tratamentos para cada período de armazenamento e entre os diferentes períodos de armazenamento para cada tratamento foi realizada através de análise de variância para medidas repetidas. Para as análises realizadas em apenas um período do armazenamento foi utilizada a análise de variância fatorial, com utilização do teste de Tukey, considerando-se um nível de significância $p<0,05$, para ambas as análises (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

A comparação dos resultados para a viabilidade dos microrganismos probióticos entre os diferentes tratamentos para cada período de armazenamento e entre os diferentes períodos de armazenamento para cada tratamento, foi realizada através de análise de variância para medidas repetidas; com posterior aplicação do teste de Tukey, considerando-se um nível de significância $p<0,001$ (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

Para avaliar os resultados obtidos para a análise sensorial foi utilizada a análise de variância de efeitos principais para verificar o consenso entre as respostas dos provadores, assim como para verificar diferenças entre as análises realizadas no período da manhã e tarde. A comparação entre as respostas obtidas, para os diferentes tratamentos em cada período de armazenamento e entre os diferentes períodos de armazenamento para cada tratamento, foi realizada através de análise de variância para medidas repetidas, utilizando o teste de Tukey e nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

4.1.1 Composição centesimal

A composição centesimal obtida para os diferentes tratamentos da porção gelado comestível, T1 (3% gordura láctea), T2 (3% gordura láctea e 8% inulina), T3 (1,5% gordura láctea e 1,5% substituto de gordura) e T4 (1,5% gordura láctea e 1,5% substituto de gordura e 8% inulina) e para a barra de cereais, assim como o teor de sólidos totais e valor energético total para cada porção, são apresentados na **tabela 6**.

Tabela 6. Composição centesimal, teor de sólidos totais e valor energético total obtidos (média $\pm$ desvio padrão) para a porção gelado comestível T1, T2, T3 e T4 e para a porção barra de cereais.

	Gelado comestível				Barra de cereais
	T1	T2	T3	T4	
Umidade (%)	71,08 $\pm$ 0,09	63,01 $\pm$ 0,25	70,69 $\pm$ 0,63	63,18 $\pm$ 0,32	9,39 $\pm$ 0,25
Carboidratos (%)	17,93 $\pm$ 0,06	18,74 $\pm$ 0,23	18,94 $\pm$ 0,47	19,19 $\pm$ 0,16	75,40 $\pm$ 0,38
Proteínas (%)	4,64 $\pm$ 0,06	4,70 $\pm$ 0,05	5,42 $\pm$ 0,14	5,32 $\pm$ 0,14	5,01 $\pm$ 0,38
Lipídios totais (%)	3,01 $\pm$ 0,00	2,85 $\pm$ 0,07	1,54 $\pm$ 0,03	1,55 $\pm$ 0,13	5,20 $\pm$ 0,53
Fibra alimentar ausente de inulina e polidextrose (%)	0,32 $\pm$ 0,07	0,27 $\pm$ 0,05	0,27 $\pm$ 0,03	0,26 $\pm$ 0,13	-
Fibra alimentar total (%)*	2,17 $\pm$ 0,07	9,54 $\pm$ 0,05	2,24 $\pm$ 0,12	9,52 $\pm$ 0,05	3,56 $\pm$ 0,08
Minerais (%)	1,17 $\pm$ 0,01	1,16 $\pm$ 0,04	1,27 $\pm$ 0,04	1,24 $\pm$ 0,02	1,23 $\pm$ 0,03
Sólidos totais (%)	28,92 $\pm$ 0,09	36,99 $\pm$ 0,25	29,31 $\pm$ 0,63	36,92 $\pm$ 0,32	90,61 $\pm$ 0,25
kcal (100g)	119,18 $\pm$ 0,46	132,39 $\pm$ 1,07	113,17 $\pm$ 2,24	124,96 $\pm$ 1,83	369,32 $\pm$ 3,58

T1: ausência inulina e ausência substituto de gordura

T3: ausência inulina e presença substituto de gordura

T2: presença inulina e ausência substituto de gordura

T4: presença inulina e presença substituto de gordura

* Fibra alimentar ausente de inulina e polidextrose somada às quantidades inulina e polidextrose adicionadas a cada formulação da porção gelado comestível.

Conforme esperado, os teores de sólidos totais obtidos para os tratamentos T1 e T3 não diferiram entre si expressivamente, mas foram inferiores ao teor de sólidos totais apresentado por T2 e T4, devido à adição de 8% de inulina a esses tratamentos.

A substituição da gordura láctea por um substituto de gordura de base protéica na porção gelado comestível em T3 e T4 levou a um pequeno acréscimo nos teores de proteínas e minerais, quando comparados a T1 e T2. Por outro lado, as variações expressivas nas proporções de lipídios totais e fibra alimentar total, apresentaram-se de acordo com o esperado. A substituição da gordura láctea em T3 e T4 levou à redução do teor de lipídios em aproximadamente 50%. Da mesma maneira, a adição de inulina a T2 e T4 levou a um aumento de mais de quatro vezes no teor de fibra alimentar total, quando comparado ao teor de fibras de T1 e T3.

A composição centesimal da barra de cereais está de acordo com a composição média dos produtos com formulações tradicionais disponíveis atualmente no mercado brasileiro, isto é, sem a redução de açúcares ou gorduras e sem a adição de coberturas.

A composição em nutrientes e o valor energético total, por porção de 70 g, para cada tratamento da sobremesa láctea congelada estão apresentados na **tabela 7**.

Tabela 7. Composição em nutrientes e valor energético total obtidos para as porções* de 70 g para cada formulação da sobremesa láctea congelada (média $\pm$ desvio padrão).

	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
Carboidratos	24,09 $\pm$ 0,09	24,49 $\pm$ 0,13	24,59 $\pm$ 0,31	24,72 $\pm$ 0,17
Proteínas	3,32 $\pm$ 0,08	3,35 $\pm$ 0,10	3,71 $\pm$ 0,03	3,66 $\pm$ 0,14
Lipídios totais	2,54 $\pm$ 0,11	2,47 $\pm$ 0,14	1,81 $\pm$ 0,12	1,81 $\pm$ 0,06
Fibra alimentar total	1,80 $\pm$ 0,01	5,48 $\pm$ 0,03	1,78 $\pm$ 0,2	5,47 $\pm$ 0,01
Minerais	0,83 $\pm$ 0,01	0,83 $\pm$ 0,02	0,88 $\pm$ 0,02	0,87 $\pm$ 0,01
Kcal	133,45 $\pm$ 0,91	140,06 $\pm$ 1,05	130,45 $\pm$ 1,01	136,35 $\pm$ 0,21

T1: ausência inulina e ausência substuto de gordura

T2: presença inulina e ausência substuto de gordura

T3: ausência inulina e presença substuto de gordura

T4: presença inulina e presença substuto de gordura

*Porções diárias de acordo as determinações da ANVISA (2003a) para gelados comestíveis e barras de cereais.

Foi observado que o valor energético total, por porção de 70 g, para as diferentes formulações desenvolvidas é inferior ao de produtos disponíveis no mercado (**tabela 2**), o que reforça a possibilidade de se desenvolver produtos

alimentícios com ingredientes diferenciados, levando ao consumidor uma alternativa de alimento com teor reduzido de gorduras totais, maior teor de fibra alimentar e, conseqüentemente, menor valor energético total.

4.1.2 Valores de pH obtidos

Os valores de pH obtidos durante a produção e após o tempo final de armazenamento (168 dias) da porção gelado comestível são apresentados na **tabela 8**. O tempo zero corresponde ao produto resfriado a 4°C na produtora para sorvetes (Skymssen). O tempo 1 corresponde ao período posterior à maturação da calda (20 a 22 horas) sob refrigeração a 4°C e o tempo 168 dias corresponde ao término do período de armazenamento do produto final a -18±3°C.

Tabela 8. Valores de pH obtidos (média ± desvio padrão) para os diferentes tratamentos da porção gelado comestível (T1 a T4), no dia 0 (após resfriamento da calda), no dia 1 (após maturação da calda por 20 a 22h) e ao final do período de armazenamento (168 dias) do produto.

Tempo (dias)	pH			
	T1	T2	T3	T4
0*	6,37 ± 0,05 ^{Aa}	6,41 ± 0,02 ^{Aa}	6,47 ± 0,06 ^{Aa}	6,42 ± 0,02 ^{Aa}
1*	6,36 ± 0,06 ^{Aa}	6,39 ± 0,05 ^{Aa}	6,52 ± 0,14 ^{Aa}	6,39 ± 0,01 ^{Aa}
168**	6,45 ± 0,10 ^{Aa}	6,45 ± 0,02 ^{Aa}	6,43 ± 0,09 ^{Aa}	6,32 ± 0,04 ^{Aa}

T1: ausência inulina e ausência substuto de gordura

T3: ausência inulina e presença substuto de gordura

T2: presença inulina e ausência substuto de gordura

T4: presença inulina e presença substuto de gordura

* Temperatura de armazenamento (4±1°C) ** Temperatura de armazenamento (-18±3°C)

^A: Letras maiúsculas iguais sobrescritas na mesma linha indicam que não houve diferença significativa (p>0,05) entre os diferentes tratamentos estudados em um mesmo período de armazenamento.

^a: Letras minúsculas iguais sobrescritas na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa (p>0,05) entre os diferentes períodos de estudados para um mesmo tratamento.

O pH não foi monitorado durante todo o período de armazenamento do produto, mas apenas no início e no final, com base nas observações de BAŞYİĞİT *et al.* (2006) e de FÁVARO-TRINDADE *et al.* (2006; 2007) de que os valores de pH de sorvetes produzidos com a adição de bactérias lácticas se mantiveram constantes ao longo de seu armazenamento. Essas observações vão ao encontro dos resultados obtidos no presente trabalho, uma vez que não foram verificadas diferenças significativas (p>0,05) entre os valores de pH para cada tratamento por período de análise e entre os diferentes períodos de avaliação, ou seja, no início do período de armazenamento e ao final de 168 dias (**tabela 8**).

De fato, isso ocorre em virtude da temperatura utilizada para o armazenamento das amostras do produto aqui desenvolvido (-18°C) estar bem abaixo da mínima requerida para a multiplicação e o próprio metabolismo de bactérias presentes (MARSHALL, 2001). Foi verificado que a adição de inulina e de um substituto de

(MARSHALL, 2001). Foi verificado que a adição de inulina e de um substituto de gordura de base protéica, assim como a interação entre esses fatores, não levaram a modificações do pH dos diferentes tratamentos avaliados e não contribuíram para variações de pH durante o período de armazenamento ($p>0,05$).

De modo geral, os valores médios de pH obtidos apresentaram-se de acordo com aquele normalmente descrito para sorvetes, ou seja, 6,50 (JAY, 2000). O pH médio para os quatro tratamentos foi superior ao pH de 5,60 e de 5,47 a 5,52, obtidos para o sorvetes probióticos fermentados produzido por DAVIDSON *et al.* (2000) e AKALIN & ERIŞİR (2008), respectivamente, e similar aos valores de pH de 6,37 a 6,62, obtidos para os sorvetes probióticos não fermentados produzidos por ALAMPRESE *et al.* (2002, 2005) e ao pH entre 6,27 e 6,65 para sorvetes não adicionados de bactérias lácticas produzidos por LEE & WHITE (1991), permitindo, assim, considerar o produto obtido como não fermentado e, também, que não sofre pós acidificação durante o período de armazenamento.

4.1.3 Incorporação de ar (*overrun*)

Os valores de incorporação de ar (*overrun*) obtidos durante a produção da porção gelado comestível são apresentados na **tabela 9**. Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre as médias de *overrun* para os diferentes tratamentos.

Tabela 9. Valores de *overrun* (média $\pm$ desvio padrão), obtidos para os diferentes tratamentos da porção gelado comestível (T1 a T4), após agitação e congelamento simultâneos por 25 minutos a -8 a -9°C em produtora para sorvetes.

	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
<i>Overrun</i> (%)	48,51 $\pm$ 7,38 ^A	59,47 $\pm$ 4,31 ^A	46,94 $\pm$ 3,53 ^A	50,61 $\pm$ 8,81 ^A

T1: ausência inulina e ausência substuto de gordura

T2: presença inulina e ausência substuto de gordura

T3: ausência inulina e presença substuto de gordura

T4: presença inulina e presença substuto de gordura

^A: Letras maiúsculas iguais sobrescritas na mesma linha indicam que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os diferentes tratamentos estudados.

Os valores de incorporação de ar (*overrun*) foram inferiores aos obtidos por MAGARIÑOS *et al.* (2007) e por CORRALES *et al.* (2007), respectivamente, de 106 a 108% e de 80 a 90%, para sorvetes probióticos suplementados com as mesmas cepas utilizadas no presente trabalho (La-5 e Bb-12). Essa diferença nos resultados pode ser explicada pela característica das formulações em estudo que, diferentemente do sorvete convencional produzido por esses autores, foram

desenvolvidas para se obter um gelado comestível firme, produto este que apresenta incorporação de ar inferior àquela dos produtos tradicionais (MARSHALL, 2001).

Por outro lado, os valores de *overrun* obtidos para os quatro tratamentos do presente trabalho foram superiores aos obtidos por AKALIN *et al.* (2008) para sorvetes adicionados de 0,65% de mistura comercial de estabilizantes e emulsificantes e de 4% de inulina ou 4% de concentrado protéico de soro de leite. As médias de incorporação de ar, entre 20,7 a 39,2%, foram consideradas baixas pelos autores e atribuídas ao processo de congelamento utilizado, em congelador para sorvetes em bateladas e não em congelador contínuo, o qual, segundo os autores, seria mais eficiente na incorporação de ar ao produto.

4.1.4 Fração de derretimento

A **tabela 10** mostra a fração de derretimento para todos os tratamentos avaliados da porção gelado comestível (T1 a T4). A menor taxa de derretimento foi obtida para T4, formulação esta com redução do teor de gordura e adição do substituto de gordura de base protéica e do ingrediente prebiótico inulina, diferindo significativamente ($p < 0,05$) dos demais tratamentos. T3 apresentou velocidade de derretimento menor que T1 e maior ($p < 0,05$) que T2, os quais também apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$).

A diferença entre os tratamentos avaliados pode ser explicada pelos efeitos significativos ($p < 0,05$) da adição dos ingredientes inulina (**figura 8**) e substituto de gordura (**figura 9**), além da interação entre estes (**figura 10**), para a redução da velocidade de derretimento dos tratamentos avaliados.

Tabela 10. Fração de derretimento (média $\pm$ desvio padrão) obtida para os diferentes tratamentos da porção gelado comestível (T1 a T4), após 14 dias de armazenamento sob congelamento ($-18 \pm 3^\circ\text{C}$).

	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
Fração de derretimento (mL/min)	$0,77 \pm 0,03^A$	$0,59 \pm 0,02^C$	$0,70 \pm 0,02^B$	$0,30 \pm 0,02^D$

T1: ausência inulina e ausência substituto de gordura

T3: ausência inulina e presença substituto de gordura

T2: presença inulina e ausência substituto de gordura

T4: presença inulina e presença substituto de gordura

A,B,C: Letras maiúsculas distintas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes formulações estudadas para um mesmo período de armazenamento.

Figura 8. Representação gráfica do efeito da adição da inulina sobre o parâmetro velocidade de derretimento, avaliado para a porção gelado comestível da sobremesa láctea congelada desenvolvida. Os valores são **expressos** pela média e através de barras verticais com intervalo de confiança de 0,95.

Figura 9. Representação gráfica do efeito da adição de um substituto de gordura sobre o parâmetro velocidade de derretimento, avaliado para a porção gelado comestível da sobremesa láctea congelada desenvolvida. Os valores são expressos pela média e através de barras verticais com intervalo de confiança de 0,95.

Figura 10. Representação gráfica do efeito da interação da adição da inulina e de um substituto de gordura sobre o parâmetro velocidade de derretimento, avaliado para a porção gelado comestível da sobremesa láctea congelada desenvolvida. Os valores são expressos pela média e através de barras verticais com intervalo de confiança de 0,95.

Resultados distintos daqueles obtidos no presente trabalho foram apresentados por LEE & WHITE (1991) e OHMES *et al.* (1998). No estudo realizado por OHMES *et al.* (1998), não foi observada diferença entre a velocidade de derretimento de um sorvete adicionado de 4,8% de gordura láctea e a formulação adicionada de 5% do mesmo substituto de gordura utilizado no presente trabalho (Simplesse®). Do mesmo modo, LEE & WHITE (1991) não observaram diferença significativa entre a formulação controle, com teor de SNGL de 9,7%, e as formulações adicionadas de concentrado protéico de soro de leite, para substituição do conteúdo dos SNGL entre 25 e 100%. Os autores atribuíram os resultados ao reconhecimento de que o fator de maior relevância sobre a resistência ao derretimento em sorvetes é o ponto de congelamento que, por sua vez, é função da quantidade de açúcares adicionada à formulação do sorvete (LEE & WHITE, 1991; OHMES *et al.*, 1998).

Por outro lado, o tamanho dos cristais de gelo tem grande impacto sobre a resistência ao derretimento e sorvetes com cristais de gelo maiores derretem mais rápido (TRGO, 2003-2004; MUSE & HARTEL 2004). Esse fenômeno pode explicar a diferença observada entre as formulações T1 e T3 do presente trabalho. Assim sendo, a adição de um substituto de gordura a base de proteínas de soro de leite pode ter levado a mudanças no perfil de congelamento da água, reduzindo o tamanho dos cristais de gelo formados, já que a quantidade de açúcares nessas formulações é bastante semelhante.

Em trabalho realizado por AKIN *et al.* (2007), foi observado que a suplementação de sorvetes, adicionados de 15, 18 e 21% de sacarose e com 2% de inulina, aumentou o tempo para o início do derretimento, em comparação aos sorvetes sem adição de inulina e/ou adicionados de 1% desse ingrediente. Paralelamente, o sorvete com 3% de gordura láctea e 4% de inulina produzido por AKALIN *et al.* (2008) apresentou maior velocidade de derretimento, quando comparado ao sorvete produzido com 10% de gordura.

No presente trabalho, fica evidente que a adição de 8% do ingrediente prebiótico inulina confere efeitos significativos na estrutura do produto alimentício desenvolvido. Essas alterações 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. Esses fatores contribuem para a estabilidade da estrutura da fase aquosa e, conseqüentemente, podem ter levado a uma redução do tempo de derretimento das formulações adicionadas da fibra alimentar prebiótica (EL-NAGAR *et al.*, 2002).

4.1.5 Comportamento do parâmetro dureza da análise instrumental de textura

Um dos testes instrumentais imitativos mais utilizados para avaliar a textura em alimentos, é a análise de perfil de textura (*Texture Profile Analysis* – TPA) (ROSENTHAL, 1999; GUNASERAKAN & AK, 2003), baseada na força de compressão, que tem a função de simular a mastigação entre os molares. A partir da TPA, podem ser obtidos como resultados valores para os parâmetros primários dureza, coesividade, viscosidade, elasticidade, adesividade e secundários fraturabilidade e mastigabilidade (SZCZESNIAK, 2002).

Por outro lado, deve ser salientado que nem todos os atributos avaliados na análise do perfil de textura instrumental são válidos para todos os tipos de alimentos (GUNASERAKAN & AK, 2003). Assim, com base nos trabalhos realizados com sorvetes por GUINARD *et al.* (1997), AIME *et al.* (2001), EL-NAGAR *et al.* (2002) e MUSE & HARTEL (2004), verificou-se que a dureza é o indicador de textura mais apropriado para esse tipo de produto. Para a obtenção do parâmetro dureza, foi constatado que o teste de corte seria o mais indicado para o produto avaliado neste trabalho, considerando a sua formulação e suas dimensões (AIME *et al.*, 2001; STABLE MICRO SYSTEMS, 2008).

O valor da dureza (gF) obtido para T1 (controle) foi inferior ao observado para os demais tratamentos ($p < 0,05$). Além disso, foi observado que a substituição parcial da gordura láctea por um substituto de gordura de base protéica (T3) não levou a modificações ($p > 0,05$) na dureza do produto, quando comparada à formulação adicionada de inulina sem redução do teor de gordura (T2). Por outro lado, foi observado que a adição de inulina e a redução do teor de gordura (T4) resultou, em valores absolutos, em uma redução na dureza deste tratamento, quando comparado aos tratamentos T2 e T3, porém não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre esses três tratamentos (**tabela 11**).

Os diferentes valores de dureza podem estar relacionados aos efeitos significativos para cada fator avaliado. O efeito da adição inulina foi significativo ($p < 0,05$) para o aumento da dureza das amostras (**figura 11**), enquanto que a adição do substituto de gordura não interferiu significativamente sobre este parâmetro ($p > 0,05$) (**figura 12**). Por outro lado, a adição da inulina em conjunto com a redução do teor de gordura teve efeito significativo para a redução da dureza das amostras ($p < 0,05$) (**figura 13**).

Tabela 11. Valores de dureza (média $\pm$ desvio padrão) obtidos para os diferentes tratamentos da porção gelado comestível (T1 a T4), armazenados sob congelamento ($-18 \pm 3^\circ\text{C}$) por 14 dias.

	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
Dureza (gF)	825,49 ± 41,23 ^B	960,42 ± 27,86 ^A	928,82 ± 16,64 ^A	895,17 ± 41,73 ^{AB}
T1: ausência inulina e ausência substuto de gordura			T3: ausência inulina e presença substuto de gordura	
T2: presença inulina e ausência substuto de gordura			T4: presença inulina e presença substuto de gordura	
^{A,B,C} : Letras maiúsculas distintas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05) entre as diferentes formulações estudadas para um mesmo período de armazenamento.

Figura 11. Representação gráfica do efeito da adição da inulina sobre o parâmetro dureza avaliado para a porção gelado comestível da sobremesa láctea congelada desenvolvida. Os valores são expressos pela média e através de barras verticais com intervalo de confiança de 0,95.

Figura 12. Representação gráfica do efeito da adição de um substituto de gordura sobre o parâmetro dureza avaliado para a porção gelado comestível da sobremesa láctea congelada desenvolvida. Os valores são expressos pela média e através de barras verticais com intervalo de confiança de 0,95.

Figura 13. Representação gráfica do efeito da interação da adição da inulina e de um substituto de gordura sobre o parâmetro dureza avaliado para a porção gelado comestível da sobremesa láctea congelada desenvolvida. Os valores são expressos pela média e através de barras verticais com intervalo de confiança de 0,95.

Os resultados obtidos estão de acordo com aqueles apresentados por EL-NAGAR *et al.* (2002). Esses autores relataram que a dureza de sorvetes de iogurte suplementados com inulina foi maior do que a dureza apresentada pela formulação contendo apenas gordura, em concentrações superiores às aquelas adicionadas as formulações prebióticas. Semelhantemente, a relação inversa entre o teor de gordura e a dureza das formulações de sorvete também foi descrita por EL-NAGAR *et al.* (2002) e por ALAMPRESE *et al.* (2002).

Da mesma maneira, o estudo realizado por AIME *et al.* (2001) mostrou que a dureza dos sorvetes formulados com teor de gordura entre 2,5 e 5% e adição de amido modificado como substituto de gordura foi maior do que o sorvete com 10% de gordura láctea adicionada. Por outro lado, a formulação sem adição de gordura e utilizando apenas amido modificado como substituto de gordura apresentou o menor valor de dureza instrumental, quando comparado às demais formulações.

A dureza dos sorvetes está relacionada com a sua estrutura. O material que está ao redor das bolhas de ar é um fluido não Newtoniano que contém agrupamentos de gordura e pequenos cristais de gelo. Nos produtos com teor reduzido de gordura, fica claro que a reologia do fluido que sustenta as bolhas de ar será alterada devido à redução dos agrupamentos de gordura, que predominam na composição deste fluido e dão a estrutura aos sorvetes (AIME *et al.*, 2001).

Os resultados obtidos no presente trabalho e aqueles apresentados por outros autores parecem indicar uma interação entre a gordura e carboidratos adicionados aos sorvetes, favorecendo o aumento da dureza instrumental desses produtos.

4.2 PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS

4.2.1 Parâmetros microbiológicos sanitários

Não foi detectada a presença de coliformes a 45°C, *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, *Bacillus cereus* e *Salmonella* spp. em nenhuma das amostras analisadas. Sendo assim, os quatro tratamentos avaliados da sobremesa láctea congelada desenvolvida apresentaram-se de acordo com os padrões legais vigentes aprovados pelo Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos estabelecidos pela ANVISA (2001).

4.2.2 Viabilidade dos microrganismos probióticos nos leites pré-enriquecidos e na porção gelado comestível

As populações obtidas para os leites pré-enriquecidos foram de $9,90 \pm 0,10$ log UFC/mL para *L. acidophilus* La-5 e de $9,58 \pm 0,08$ log UFC/mL para *B. animalis* Bb-12. Durante o processo de produção (dia 0) essas populações foram diluídas em 4.000 g da calda do produto, processo que resultaria em populações de *L. acidophilus* e *B. animalis* de 7,90 log UFC/g e de 7,58 log UFC/g, respectivamente. A partir da comparação dessas populações com aquelas obtidas para ambos os microrganismos, após a inoculação destes à calda do produto (dia 0; **tabelas 12 e 13**), pode ser observado que não houve efeito negativo dos processos de mistura e resfriamento da calda a temperatura de 4°C sobre a viabilidade dos microrganismos probióticos adicionados para todas as formulações avaliadas.

As **tabelas 12 e 13** apresentam, respectivamente, as populações de *L. acidophilus* La-5 e de *B. animalis* Bb-12 observadas ao longo do armazenamento da porção gelado comestível, bem como os resultados das análises estatísticas para os diferentes ensaios realizados.

Tabela 12. Populações de *Lactobacillus acidophilus* obtidas (média $\pm$ desvio padrão) para os diferentes tratamentos da porção gelado comestível (T1 a T4) durante o processamento ($4\pm 1^\circ\text{C}$) - dia 0 (após resfriamento) e dia 1 (após maturação por 20 a 22 horas) - e durante o armazenamento ($-18\pm 3^\circ\text{C}$) por até 168 dias.

Populações de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 Log UFC/g										
Tempo (dias)	0	1	2	7	14	21	28	84	168	
T1	7,91 $\pm$ 0,00 ^{Aa}	7,89 $\pm$ 0,05 ^{Aa}	7,69 $\pm$ 0,02 ^{Aab}	7,73 $\pm$ 0,02 ^{Aab}	7,65 $\pm$ 0,09 ^{Aab}	7,52 $\pm$ 0,09 ^{Abc}	7,50 $\pm$ 0,08 ^{Abc}	7,44 $\pm$ 0,02 ^{Abc}	7,23 $\pm$ 0,10 ^{Ac}	
T2	7,90 $\pm$ 0,03 ^{Aa}	7,90 $\pm$ 0,02 ^{Aa}	7,78 $\pm$ 0,05 ^{Aab}	7,73 $\pm$ 0,05 ^{Aab}	7,75 $\pm$ 0,11 ^{Aab}	7,74 $\pm$ 0,06 ^{Aab}	7,72 $\pm$ 0,07 ^{Aab}	7,70 $\pm$ 0,03 ^{Aab}	7,54 $\pm$ 0,09 ^{Ab}	
T3	7,88 $\pm$ 0,07 ^{Aa}	7,89 $\pm$ 0,03 ^{Aa}	7,69 $\pm$ 0,05 ^{Aab}	7,70 $\pm$ 0,11 ^{Aab}	7,73 $\pm$ 0,04 ^{Aab}	7,57 $\pm$ 0,11 ^{Ab}	7,65 $\pm$ 0,07 ^{Aab}	7,49 $\pm$ 0,09 ^{Ab}	7,48 $\pm$ 0,21 ^{Ab}	
T4	7,97 $\pm$ 0,06 ^a	7,92 $\pm$ 0,14 ^{Aab}	7,71 $\pm$ 0,14 ^{Ac}	7,61 $\pm$ 0,03 ^{Ac}	7,63 $\pm$ 0,08 ^{Abc}	7,67 $\pm$ 0,02 ^{Abc}	7,56 $\pm$ 0,11 ^{Accl}	7,50 $\pm$ 0,09 ^{Accl}	7,27 $\pm$ 0,24 ^{Ad}	

T1: ausência inulina e ausência substituto de gordura

T2: presença inulina e ausência substituto de gordura

T3: ausência inulina e presença substituto de gordura

T4: presença inulina e presença substituto de gordura

^A: Letras maiúsculas iguais sobrescritas na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ($p > 0,001$) entre os diferentes tratamentos estudados em um mesmo período de armazenamento.

^{abc}: Letras minúsculas distintas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,001$) entre as diferentes períodos estudados para um mesmo tratamento.

Tabela 13. Populações de *B. animalis* obtidas (média $\pm$ desvio padrão) para os diferentes tratamentos da porção gelado comestível (T1 a T4) durante o processamento ($4\pm 1^\circ\text{C}$) - dia 0 (após resfriamento) e dia 1 (após maturação por 20 a 22 horas) - e durante o armazenamento ($-18\pm 3^\circ\text{C}$) por até 168 dias.

Populações de <i>Bifidobacterium animalis</i> Bb-12 Log UFC/g										
Tempo (dias)	0	1	2	7	14	21	28	84	168	
T1*	7,44 $\pm$ 0,10 ^{Aa}	7,43 $\pm$ 0,11 ^{Aa}	7,18 $\pm$ 0,15 ^{Ab}	7,16 $\pm$ 0,11 ^{Ab}	7,17 $\pm$ 0,09 ^{Ab}	7,17 $\pm$ 0,11 ^{Ab}	7,11 $\pm$ 0,12 ^{Ab}	6,88 $\pm$ 0,12 ^{Ac}	6,85 $\pm$ 0,14 ^{Ac}	
T2*	7,45 $\pm$ 0,08 ^{Aa}	7,45 $\pm$ 0,02 ^{Aa}	7,23 $\pm$ 0,05 ^{Ab}	7,23 $\pm$ 0,08 ^{Ab}	7,22 $\pm$ 0,11 ^{Ab}	7,20 $\pm$ 0,06 ^{Ab}	7,28 $\pm$ 0,10 ^{Aab}	7,28 $\pm$ 0,10 ^{Aab}	7,21 $\pm$ 0,09 ^{Ab}	
T3*	7,51 $\pm$ 0,03 ^{Aa}	7,42 $\pm$ 0,03 ^{Aab}	7,24 $\pm$ 0,06 ^{Abc}	7,25 $\pm$ 0,10 ^{Abc}	7,18 $\pm$ 0,01 ^{Ac}	7,12 $\pm$ 0,06 ^{Ac}	7,12 $\pm$ 0,06 ^{Ac}	7,09 $\pm$ 0,04 ^{Ac}	7,05 $\pm$ 0,05 ^{Ac}	
T4*	7,53 $\pm$ 0,07 ^{Aa}	7,53 $\pm$ 0,04 ^{Aa}	7,25 $\pm$ 0,06 ^{Ab}	7,21 $\pm$ 0,04 ^{Ab}	7,22 $\pm$ 0,06 ^{Ab}	7,26 $\pm$ 0,03 ^{Ab}	7,22 $\pm$ 0,04 ^{Ab}	7,15 $\pm$ 0,12 ^{Ab}	7,10 $\pm$ 0,13 ^{Ab}	

T1: ausência inulina e ausência substituto de gordura

T2: presença inulina e ausência substituto de gordura

T3: ausência inulina e presença substituto de gordura

T4: presença inulina e presença substituto de gordura

^A: Letras maiúsculas iguais sobrescritas na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ($p > 0,001$) entre os diferentes tratamentos estudados em um mesmo período de armazenamento.

^{abc}: Letras minúsculas distintas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,001$) entre as diferentes períodos estudados para um mesmo tratamento.

Durante o processo de obtenção de sorvetes, a etapa de resfriamento, seguinte à pasteurização da calda, em temperaturas entre 0 e 4°C, por períodos de até 24 horas, é denominada maturação. Essa etapa induz ao início da cristalização da gordura presente, à adsorção das proteínas e emulsificantes aos glóbulos de gordura e a completa hidratação de ingredientes secos, como proteínas e estabilizantes. Essas transformações físico-químicas necessitam de um intervalo de tempo para que o processo se complete. Normalmente, a etapa de maturação exige um período de até 24 horas, o qual varia de acordo com o teor de gordura do produto (ANDREASEN & NIELSEN, 1998; MARSHALL & ARBUCKLE, 2000).

Os efeitos da maturação da calda dos sorvetes podem ser observados em sua viscosidade e, conseqüentemente, no corpo, cremosidade, resistência ao derretimento e estabilidade durante o armazenamento do produto final (ANDREASEN & NIELSEN, 1998). Entretanto, é de interesse que essa etapa do processo de produção não leve a prejuízos para as populações dos microrganismos probióticos adicionados.

Durante o processo de produção, após a maturação, a calda do sorvete é congelada. O congelamento é umas das operações de maior importância para a fabricação de sorvetes, interferindo diretamente sobre a qualidade, palatabilidade e rendimento do produto final (MARSHALL & ARBUCKLE, 2000).

O processo de congelamento envolve duas etapas. Primeiramente, ocorre o congelamento rápido da calda em temperaturas de alguns graus abaixo de zero. Dessa maneira, o gelo é formando simultaneamente à incorporação de ar à massa do produto. Em um segundo momento, o produto parcialmente congelado é submetido a um processo de endurecimento sem agitação, o qual pode ser rápido, quando o produto é exposto a temperaturas inferiores à do armazenamento, para que ocorra uma rápida troca de calor, ou lento, quando o produto permanece sob a temperatura de armazenamento até o equilíbrio entre as temperaturas (ANDREASEN & NIELSEN, 1998; WALSTRA *et al.*, 1999; MARSHALL & ARBUCKLE, 2000).

Após a maturação, a calda é congelada em temperaturas inferiores ao ponto normal de congelamento da água, o que leva a uma cristalização parcial do conteúdo de água do produto. O restante da água permanece como solução altamente viscosa e não congelada, devido à redução do ponto de congelamento. Normalmente, o tamanho dos cristais de gelo aumenta de 30 a 40% durante o processo de congelamento final do sorvete (endurecimento). O congelamento lento pode induzir à formação de um pequeno número de cristais de gelo relativamente grandes. O congelamento rápido, por sua vez, combinado à agitação mecânica

induz a formação de um grande número de cristais de gelo, de tamanho relativamente pequeno, e distribuído ao acaso, na porção não congelada do produto, entre as bolhas de ar e os glóbulos de gordura (MARSHALL & ARBUCKLE, 2000; TRGO, 2003-2004; McCLEMENTS, 2005).

Sob determinadas condições, o processo de congelamento traz conseqüências prejudiciais à população microbiana presente nos sorvetes. Nos equipamentos para congelamento, a temperatura da calda é rapidamente reduzida, enquanto o ar é incorporado durante o batimento vigoroso do produto. Durante esse processo, tanto os cristais intra como os extracelulares podem causar injúrias mecânicas nas células dos microrganismos. Os cristais de gelo que se formam no exterior das células reduzem a quantidade de água livre na qual os solutos poderiam estar dissolvidos, enquanto aqueles que se formam no interior das células têm o potencial de romper as membranas (PAPADEMAS & BINTSIS, 2002).

No presente trabalho, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,001$) entre os quatro tratamentos avaliados ou entre o período inicial (dia 0) e final (dia 1) da etapa de maturação (4°C por 20-22 horas) para cada tratamento.

Durante o processo inicial de congelamento (dias 1 a 2), não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,001$) entre as populações de *L. acidophilus* para os tratamentos avaliados, enquanto que reduções significativas ($p < 0,001$) foram observadas em todos os tratamentos para as populações de *B. animalis*.

De maneira semelhante aos resultados apresentados por HOMAYOUNI *et al.* (2008), as diferenças entre o comportamento dos probióticos adicionados à porção gelado comestível demonstraram maior susceptibilidade do probiótico *B. animalis* às condições de congelamento e aeração simultâneos e posterior endurecimento do produto a -18°C. Uma vez que, durante essa etapa, a adição de inulina e/ou substituto de gordura não apresentou efeito significativo ($p > 0,001$) para a proteção das células dos microrganismos adicionados, é possível atribuir a menor resistência de *B. animalis* à incorporação de ar ao produto. Essa maior sensibilidade de *B. animalis* pode ser atribuída ao fato desse ser um microrganismo anaeróbio estrito, enquanto que os lactobacilos são anaeróbios facultativos (RAY, 2004).

Por outro lado, é relevante observar que, nessa etapa, mesmo sendo as reduções das populações de *B. animalis* significativas, as taxas de sobrevivência ao processo de congelamento de *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis* Bb-12 foram elevadas, tendo sido respectivamente, de 96,70 a 98,56% e de 96,21 a 97,02%. Esses valores

foram superiores aos observados por MAGARIÑOS *et al.* (2007), de 91,3% para *L. acidophilus*-La5 e de 90,1% para *B. animalis* Bb-12, durante a produção de sorvetes.

Foi observado que o período de armazenamento foi significativo ($p < 0,001$) para a redução das populações dos microrganismos probióticos (**figuras 14 e 15**). Paralelamente, a adição de inulina ou do substituto de gordura, individualmente, não apresentaram efeitos significativos ($p > 0,001$) sobre a viabilidade de *L. acidophilus* e de *B. animalis* durante o armazenamento. Por outro lado, a interação entre o período de armazenamento e a adição do ingrediente prebiótico inulina contribuiu significativamente ($p < 0,001$) para a manutenção da viabilidade de *B. animalis* ao longo dos 168 dias de armazenamento do produto em estudo (**figura 16**).

Figura 14. Representação gráfica do efeito do período de armazenamento, a $-18 \pm 3^\circ\text{C}$, sobre a população de *L. acidophilus* La-5 adicionada à porção gelado comestível da sobremesa láctea congelada desenvolvida. Os valores são expressos pela média e através de barras verticais com intervalo de confiança de 1,00.

Figura 15. Representação gráfica do efeito do período de armazenamento, a $-18 \pm 3^\circ\text{C}$, sobre a população de *B. animalis* Bb-12 adicionada à porção gelado comestível da sobremesa láctea congelada desenvolvida. Os valores são expressos pela média e através de barras verticais com intervalo de confiança de 1,00.

Figura 16. Representação gráfica do efeito da interação entre o período de armazenamento, a $-18\pm 3^{\circ}\text{C}$, e a adição da inulina sobre a população de *B. animalis* Bb-12 adicionada à porção gelado comestível da sobremesa láctea congelada desenvolvida. Os valores são expressos pela média e através de barras verticais com intervalo de confiança de 1,00.

Durante o período de 168 dias sob congelamento ($-18\pm 3^{\circ}\text{C}$) as populações de *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis* Bb-12 decresceram significativamente ($p < 0,001$) para todos os tratamentos estudados. Porém, a variação entre as populações observadas no dia 0 e ao final do período de armazenamento, considerando um mesmo ensaio, não foi superior a 0,70 log UFC/g e a 0,59 log UFC/g, respectivamente, para *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis* Bb-12.

As reduções das populações dos microrganismos probióticos no presente trabalho foram inferiores àsquelas observados por SALEM *et al.* (2006) em sorvetes armazenados por 84 dias a -26°C . Durante esse período de armazenamento, os autores observaram reduções de 2,23 log UFC/g para *L. acidophilus* e de 1,68 log UFC/g para *B. bifidum*. As reduções foram, ainda, inferiores àsquelas de 2,06 a 2,52 log UFC/g para *L. acidophilus* DD910 e de 1,80 a 2,42 log UFC/g para *B. lactis* DD920, observadas por KAILASAPATHY & SULTANA (2003) em sorvetes armazenados por 168 dias a -20°C .

As condições de congelamento durante a fabricação e armazenamento de sobremesas congeladas agregam um severo estresse aos microrganismos presentes no produto, causando prejuízos às células em diferentes graus, incluindo a morte dos microrganismos, a inibição da sua multiplicação e a redução ou interrupção da sua atividade metabólica (MARSHALL, 2001; PAPADEMAS & BINTSIS, 2002).

Os fatores que afetam a sobrevivência dos microrganismos durante o armazenamento congelado incluem: o tipo e as condições fisiológicas das células, a composição do alimento e a sua manipulação antes do congelamento, a proporção

adicionada de microrganismos probióticos, bem como o método de congelamento utilizado, a temperatura e as condições de armazenamento do produto. Os cristais de gelo que se formam no exterior da célula reduzem a quantidade de água livre na qual os solutos estariam dissolvidos, enquanto aqueles que se formam no interior da célula apresentam o potencial de romper a membrana celular, resultando na morte de muitas células microbianas. Entretanto, devido ao fato da viabilidade de muitos microrganismos ser preservada através do congelamento, não é esperado que este tratamento seja letal para os microrganismos (MARSHALL, 2001).

No presente trabalho, foi possível observar uma maior estabilidade das populações dos microrganismos adicionados, quando comparadas àquelas obtidas por outros autores que fabricaram sorvetes com a adição das cepas La-5 de *L. acidophilus* e Bb-12 de *B. animalis*. Ao final de 85 dias de armazenamento, em temperaturas entre -25 e -30°C, CORRALES *et al.* (2007) observaram reduções de 1,2 log UFC/g para *L. acidophilus* e de 1,5 log UFC/g para *B. animalis*. Paralelamente, MAGARIÑOS *et al.* (2007) obtiveram taxas de sobrevivência de 87% e de 90%, para *L. acidophilus* e *B. animalis*, respectivamente, após 60 dias de armazenamento do sorvete a -25°C. Comparativamente, para as diferentes formulações do gelado comestível em estudo no presente trabalho, foi observada taxa de sobrevivência mínima de 91,24% para *L. acidophilus* e de 91,96% para *B. animalis* após 168 dias de armazenamento a -18°C.

Os efeitos da suplementação com oligofrutose (4%) e inulina (4%) na sobrevivência de *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis* Bb-12 em sorvete com teor reduzido de gorduras (4%) armazenado a -18°C por 90 dias foram estudados por AKALIN & ERIŞİR (2008). Nesse estudo, foi observado que o processo de congelamento e o período de armazenamento reduziram significativamente a viabilidade de *L. acidophilus* La-5 e de *B. animalis* Bb-12 em 1,5 e 2,0 log UFC/g, respectivamente (AKALIN & ERIŞİR, 2008). Porém, essa avaliação limitou-se à comparação entre os diferentes tratamentos em um mesmo período de armazenamento. Já as populações iniciais de cada microrganismo não foram consideradas para efeito comparativo do período de armazenamento sobre cada tratamento avaliado (AKALIN & ERIŞİR, 2008).

Quando comparados a trabalhos realizados por outros autores, os menores decréscimos e, conseqüentemente, maiores taxas de sobrevivência, observados no presente estudo, podem ser explicados pela adição de uma maior concentração de

espessantes (gomas carragena, guar e xantana) e da adição da polidextrose às formulações de gelado comestível.

A goma carragena possui propriedade funcional única de interagir com proteínas e é utilizada em produtos lácteos para estabilizar as proteínas do leite. A goma guar apresenta compatibilidade com outros polissacarídeos. Em particular, é observado sinergismo com as gomas xantana e carragena, controlando a cristalização do gelo e desenvolvendo corpo em alimentos congelados. Por fim, uma pequena quantidade de goma xantana auxilia na melhoria da estabilidade dos produtos alimentícios aos ciclos de congelamento e descongelamento, devido à formação de géis termoestáveis (CHINACHOTI, 1995; McCLEMENTS, 2005). De maneira semelhante, além das propriedades espessantes e de agente de corpo, a polidextrose pode contribuir como ingrediente crioprotetor, estabilizante e de controle da cristalização de açúcares (CHINACHOTI, 1995).

Adicionalmente, o produto em estudo apresenta incorporação de ar inferior (de aproximadamente 50%), o que o caracteriza como sorvete firme para ser comercializado em porções individuais, diferentemente dos sorvetes com incorporação de ar de 80-90% (CORRALES *et al.*, 2007), 108% (MAGARIÑOS *et al.*, 2007), produzidos para serem distribuídos em embalagens de múltiplas porções.

Outro fator relevante, para as altas taxas de sobrevivência observadas neste estudo, pode ser a adição do ingrediente prebiótico inulina. AKIN *et al.* (2007) também observaram um decréscimo significativo nas populações dos microrganismos probióticos adicionados, como resultado do processo de congelamento do sorvete produzido. Contudo, de maneira semelhante ao que foi observado no presente trabalho, a adição de inulina melhorou a sobrevivência de *L. acidophilus* LA-14 e *B. lactis* BL-01, contribuindo para que, ao final de 90 dias de armazenamento a -18°C, populações de pelo menos 10^6 UFC/g ainda pudessem ser obtidas.

A adição de inulina a produtos lácteos pode auxiliar na sobrevivência e estabilidade de microrganismos probióticos adicionados. A inulina pode controlar a recristalização do gelo, atuando como agente estabilizante, uma vez que apresenta efeitos crioprotetores como ingrediente único ou em combinação com xaropes de glicose, auxiliando na redução da formação de cristais de gelo durante as variações de temperatura que podem ocorrer durante o armazenamento (SCHALLER-POVOLNY & SMITH, 1999; AKALIN & ERIŞIR, 2008).

Por outro lado, os resultados obtidos neste estudo vão ao encontro das observações feitas por HAYNES & PLAYNE (2002) e FÁVARO-TRINDADE *et al.*,

(2007), de que maiores concentrações de gordura adicionadas às formulações de sorvetes não resultaram em proteção adicional às células de *L. acidophilus* e *B. lactis*, quando comparadas às formulações com teor reduzido de gorduras.

Nesse contexto, a melhor viabilidade dos microrganismos adicionados ao gelado comestível em estudo pode ser atribuída ao desenvolvimento de uma formulação que tenha proporcionado aos probióticos melhor resistência às condições de processo de produção e armazenamento e para a manutenção de sua viabilidade por maior período de tempo. Tais condições estariam ligadas ao menor contato com o oxigênio, devido à incorporação de ar reduzida e ao efeito crioprotetor dos ingredientes adicionados. Esses fatores estariam atuando na promoção de um ambiente mais adequado, com relação à concentração de solutos e à porção congelada do produto, para a manutenção da integridade celular dos probióticos adicionados.

4.3 ANÁLISE SENSORIAL

Considerando os quatro tratamentos estudados e os três períodos de armazenamento propostos, foram realizadas 600 avaliações sensoriais das amostras da sobremesa láctea congelada. Provedores com idades entre 18 e 60 anos participaram dessas avaliações, sendo que 401 avaliações foram realizadas por mulheres e 199 por homens, 33,17% e 63,83%, respectivamente (**figura 17**).

Figura 17. Distribuição dos provadores, de acordo com o sexo e idade (total = 600 avaliações).

Para proceder com a análise estatística das notas atribuídas à aceitabilidade do produto em estudo, foi necessário aplicar a transformação de Box Cox aos dados originais. Dessa maneira, considerando-se $\alpha = 0,01$, foi possível homogeneizar a variância entre todas as respostas obtidas.

Na avaliação geral das notas, houve consenso entre as respostas dos provadores ($\alpha = 0,05$) e foi observado que o período (manhã ou tarde) em que as sessões das análises sensoriais foram realizadas não influenciou ($\alpha = 0,05$) na aceitabilidade dos diferentes tratamentos avaliados.

Os resultados da aceitabilidade sensorial da sobremesa láctea congelada, correspondentes a cada tratamento e período de armazenamento estudados, são apresentados na **tabela 14**.

Tabela 14. Resultados de aceitabilidade sensorial (média $\pm$ desvio padrão) para os diferentes tratamentos da sobremesa láctea congelada avaliados durante o armazenamento a $-18 \pm 3^\circ\text{C}$, por até 84 dias.

Tempo de armazenamento (dias)	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
7	7,60 $\pm$ 1,25 ^{Aa}	8,00 $\pm$ 0,78 ^{Aa}	7,78 $\pm$ 0,91 ^{Aa}	7,56 $\pm$ 1,03
28	7,70 $\pm$ 1,16 ^{Aa}	8,00 $\pm$ 0,73 ^{Aa}	7,74 $\pm$ 1,23 ^{Aa}	8,18 $\pm$ 0,87
84	7,62 $\pm$ 0,99 ^{Aa}	8,00 $\pm$ 0,99 ^{Aa}	8,22 $\pm$ 0,74 ^{Aa}	8,22 $\pm$ 0,76
Média geral	7,64 $\pm$ 1,13	7,90 $\pm$ 0,85	7,91 $\pm$ 1,00	7,99 $\pm$ 0,94

T1: ausência inulina e ausência substuto de gordura

T2: presença inulina e ausência substuto de gordura

T3: ausência inulina e presença substuto de gordura

T4: presença inulina e presença substuto de gordura

^A: Letras maiúsculas iguais sobrescritas na mesma linha indicam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os diferentes tratamentos estudados em um mesmo período de armazenamento.

^a: Letras minúsculas iguais sobrescritas na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os diferentes períodos de estudos para um mesmo tratamento.

n = 50 para cada tratamento e respectivo período de armazenamento avaliado

Não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre as médias de aceitabilidade para os quatro tratamentos avaliados em um mesmo período de armazenamento e para os diferentes períodos de armazenamento de cada um deles (**tabela 14**). Entretanto, pode-se destacar que a moda entre as notas, durante todo o período da avaliação sensorial do produto, foi 8 ("gostei muito") e também pode ser considerado que a frequência de notas inferiores a 7 ("gostei regularmente") foi baixa (**figuras 18, 19 e 20**), contribuindo para as elevadas médias gerais obtidas para a aceitabilidade do produto desenvolvido.

Figura 18. Distribuição das notas atribuídas aos diferentes tratamentos avaliados após 7 dias de armazenamento da sobremesa láctea congelada a $-18^{\circ}\text{C} \pm 3$.

Figura 19. Distribuição das notas atribuídas aos diferentes tratamentos avaliados após 28 dias de armazenamento da sobremesa láctea congelada a $-18^{\circ}\text{C} \pm 3$.

É interessante destacar que os períodos de armazenamento avaliados não apresentaram efeito significativo ($p > 0,05$) sobre as notas dos quatro tratamentos avaliados (**figura 21**), o que permite estender o prazo de vida de prateleira por até 84 dias, sem prejuízos à aceitação do produto pelo consumidor.

Concomitantemente, os fatores inulina e substituto de gordura não contribuíram para efeitos significativos ($p > 0,05$) sobre a aceitação do produto durante o período de armazenamento, mas pôde ser observada influência positiva da adição do substituto de gordura sobre as notas atribuídas aos tratamentos T3 e T4. Por outro lado, T2 apresentou uma tendência à redução de notas durante o período de armazenamento (**figura 21**).

Figura 21. Evolução das notas de aceitabilidade para os diferentes tratamentos da sobremesa láctea congelada, medidas através das análises sensoriais durante o período de armazenamento do produto (7, 28 e 84 dias). Os valores estão expressos pela média e barras verticais com intervalo de confiança de 0,95.

AKIN (2005) não observou diferenças significativas para as propriedades sensoriais de um sorvete probiótico fermentado adicionado de 18, 15 e 21% de sacarose e de 1 e 2% de inulina, quando comparados aos sorvetes não suplementados com inulina. Resultados opostos aos observados no presente trabalho foram descritos por ARYANA & SUMMERS (2006). Segundo os autores, os sorvetes produzidos sem a adição de gordura e açúcar e adicionados de probióticos (0,02 e 0,2%) apresentaram notas significativamente mais baixas para os atributos sensoriais sabor, corpo e textura, quando comparados ao padrão.

A tendência a melhores notas para os tratamentos adicionados do substituto de gorduras a base de proteínas do soro de leite (T3 e T4) pode estar relacionado às mudanças nas proporções dos sólidos não gordurosos do leite (SNGL), que,

A tendência a melhores notas para os tratamentos adicionados do substituto de gorduras a base de proteínas do soro de leite (T3 e T4) pode estar relacionado às mudanças nas proporções dos sólidos não gordurosos do leite (SNGL), que, conseqüentemente, interferem nas concentrações de lactose, proteínas e sais presentes na formulação dos sorvetes. A proporção dos SNGL influencia na redução do ponto de congelamento. Portanto, um aumento dessa proporção leva à redução do tamanho médio dos cristais de gelo formados (HARTEL, 1996).

A redução das notas obtidas para T2 pode ser explicada pela 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. As variações de temperatura durante o armazenamento podem levar a alterações na estrutura formada pelos sólidos presentes no sorvete. Essas alterações podem ocorrer, devido à redução da capacidade da inulina em se ligar à água, disponibilizando água livre para o crescimento dos cristais de gelo (SCHALLER-POVOLNY & SMITH, 1999).

As notas médias gerais acima de 7,64 representaram bons resultados de aceitação para o produto desenvolvido (**tabela 14**). Os resultados demonstram a possibilidade de oferecer aos consumidores um produto alimentício que soma potenciais efeitos benéficos à saúde às características sensoriais desejadas por esses consumidores. Além disso, visto que não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) para a aceitabilidade geral entre os tratamentos avaliados, foi possível desenvolver formulações com teor reduzido de gordura láctea e/ou com a adição de um ingrediente prebiótico, sem que alguma delas tenha sido preterida pelo consumidor.

Os provadores também receberam a instrução para que indicassem na ficha de avaliação os atributos sensoriais que mais e que menos apreciaram para cada amostra analisada. Eles ficaram livres para mencionar mais de um atributo em ambos os casos. As observações feitas pelos provadores puderam ser agrupadas, de acordo com a impressão sobre o produto e sobre as partes que o constituem, isto é, a porção gelado comestível (denominada “sorvete” pelos provadores) e a porção de cereais em barra (denominada “cereal” pelos provadores) individualmente (**figura 22**).

Essas observações incluíram os atributos apresentação, aroma, conceito, proporção, sabor e textura para a sobremesa láctea como um todo. Os atributos sabor e textura também foram descritos pelos provadores para cada porção que constitui o produto.

Entende-se por apresentação, as características relacionadas à aparência do produto e de sua embalagem, por conceito a inovação em unir um gelado comestível

Figura 22. Número de observações para os atributos mais preferidos (barras dispostas acima do eixo x) e menos preferidos (barras dispostas abaixo do eixo x) mencionados pelos provadores, considerados todos os tratamentos e períodos de armazenamento estudados para a sobremesa láctea congelada.

O conceito do produto foi o atributo mais apreciado pelos provadores. Em contrapartida, a textura da barra de cereais foi o que mais desagradou. Essas observações mostram que, mesmo aprovando um produto diferenciado, o consumidor está atento à qualidade sensorial desse alimento. Adicionalmente, como a união de texturas diferenciadas é característica marcante do produto desenvolvido, foi verificada a necessidade de adequar a textura da porção barra de cereais à expectativa dos consumidores.

Estudo realizado por DEVEREUX *et al.* (2003) avaliou a aceitabilidade de diferentes alimentos adicionados de inulina e foi observado que a textura é mais importante que o sabor, na definição da aceitabilidade geral de alimentos com teor reduzido de gordura. Por outro lado, em estudo realizado por AIME *et al.* (2001), não foram observadas diferenças significativas entre a textura e os demais atributos sensoriais avaliados, para um sorvete com 10% de gordura láctea e outro com 5% de gordura e adição de amido modificado.

No presente trabalho, não foi observada tendência a diferenças na percepção, por parte do consumidor, da textura na porção gelado comestível. Porém, o sabor dessa porção desagradou a um número maior de provadores. É interessante

No presente trabalho, não foi observada tendência a diferenças na percepção, por parte do consumidor, da textura na porção gelado comestível. Porém, o sabor dessa porção desagradou a um número maior de provadores. É interessante observar que o sabor do produto final foi bastante apreciado pelos provadores, o que vai de encontro ao número de citações que preteriram o sabor da porção gelado comestível, revelando uma possível contribuição do sabor da barra de cereais para melhorar o sabor do produto final.

O número representativo de citações positivas sobre o conceito do produto pode estar relacionado à observação feita por SZCZESNIAK & KAHN (1984), em estudo realizado na década de 80, mostrando o potencial sucesso de produtos alimentícios que apresentaram ao consumidor a combinação de contrastes de texturas. Mais recentemente, SZCZESNIAK (2002) descreveu uma grande aceitação por parte dos consumidores que valorizam alimentos produzidos a partir da combinação de texturas. Especificamente, a combinação entre a crocância e cremosidade foi apontada como aquela que compõe a base de muitas das combinações desejáveis entre texturas em alimentos. Adicionalmente, foi observado que os contrastes de texturas em um mesmo produto alimentício são mais apreciados por adultos do que por crianças (SZCZESNIAK & KAHN, 1984; SZCZESNIAK, 2002).

Tendo em vista que a combinação da crocância de uma barra de cereais com a cremosidade de um gelado comestível é a principal característica do alimento desenvolvido e que adultos participaram da análise sensorial realizada no presente trabalho, as observações realizadas por SZCZESNIAK & KAHN (1984) e por SZCZESNIAK (2002) podem explicar a elevada aceitação sensorial da sobremesa láctea congelada desenvolvida.

Os resultados apresentados anteriormente podem ser assim resumidos:

- ✓ Foi verificada, no presente trabalho, a possibilidade de desenvolver um produto alimentício, para consumo em porções individuais, a partir da associação de uma barra de cereais a um gelado comestível probiótico ou simbiótico e/ou com teor reduzido de gordura láctea.
- ✓ Com exceção ao tratamento controle (T1), os demais tratamentos avaliados apresentaram, ao final do período de 168 dias de armazenamento a -18°C , populações de *L. acidophilus* e *B. animalis* acima de 7,0 log UFC/g. Essas populações garantem, na porção de 50 g de gelado comestível proposta para o produto, as populações mínimas de 8 a 9 log UFC por porção diária, exigidas pela legislação brasileira vigente (ANVISA, 2008).
- ✓ O ingrediente prebiótico inulina, especialmente quando combinado à gordura láctea, assim como a utilização de um substituto de gordura à base de proteínas do soro de leite favoreceram a viabilidade dos microrganismos probióticos *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis* Bb-12, adicionados à porção gelado comestível do produto estudado.
- ✓ O período de armazenamento a -18°C foi significativo ($p < 0,001$) para a redução das populações dos microrganismos probióticos adicionados à porção gelado comestível (*L. acidophilus* La-5 e *B. animalis* Bb-12). Apesar da contribuição da inulina e do substituto de gordura para a manutenção das populações de ambos os microrganismos probióticos durante o período de armazenamento, apenas a interação entre o período de armazenamento e a adição do ingrediente prebiótico inulina foi significativamente favorável ($p < 0,001$) para a manutenção da viabilidade de *B. animalis* Bb-12.
- ✓ A adição e/ou substituição de ingredientes à formulação do gelado comestível estudado não interferiu nos parâmetros físico-químicos pH e *overrun*. Por outro lado, para aqueles em que foi verificada diferença significativa, como os parâmetros dureza e velocidade de derretimento, tais diferenças não se refletiram na aceitação do produto pelo consumidor. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) para a aceitabilidade sensorial entre as quatro formulações da sobremesa láctea congelada desenvolvida e o período de armazenamento (7, 28 e 84 dias) não interferiu significativamente ($p > 0,05$) sobre a aceitação global do produto. Por outro lado, as médias gerais para as notas atribuídas para cada formulação, sempre acima de 7 (gostei moderadamente), foram consideradas altas.

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que a associação de uma barra de cereais a um gelado comestível probiótico, com 1,5% de gordura láctea e adicionado de 8% de inulina é tecnologicamente viável para disponibilizar ao consumidor uma alternativa de alimento funcional simbiótico para consumo em porções individuais. As modificações nas características de dureza e de derretimento da porção gelado comestível, conseqüentes à adição da inulina e de um substituto de gordura a base de proteínas do soro de leite, não interferiram na aceitabilidade sensorial do produto final. Entretanto, essas diferenças podem ter contribuído para a melhor avaliação sensorial do produto com teor reduzido de gordura adicionado ou não de inulina, sendo que a presença de inulina contribuiu para a manutenção da viabilidade de *Bifidobacterium animalis* Bb-12 ao final do período de armazenamento estudado..

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-GAWAD, I.A.; EL-SAYED, E.M.; HAFEZ, S.A.; EL-ZEINI, H.M.; SALEH, F.A. The hypocholesterolaemic effect of milk yoghurt and soy-yoghurt containing bifidobacteria in rats fed on a cholesterol-enriched diet. **International Dairy Journal**, v.15, n.1, p.37-44, 2005.

ADLERBERTH, I.; CERQUETTI, M.; POILANE, I.; WOLD, A.; COLLIGNON, A. Mechanisms of colonization and colonization resistance of the digestive tract. Part 1: Bacteria/host interactions. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.12, suppl.2, p.223-239, 2000.

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.; ERIŞİR, 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.

AKALIN, 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, n.3, 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.

AKIN, M.S. Effects of inulin and different sugar levels on viability of probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics of probiotic fermented ice-cream. **Milchwissenschaft**, v.60, n.3, p.297-301, 2005.

ALAMPRESE, C.; FOSCHINO, R.; ROSSI, M.; POMPEI, C.; SAVANI, L. Survival of *Lactobacillus* La 1 and influence of its addition in retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentrations. **International Dairy Journal**, v.12, n.2/3, p.201-208, 2002.

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

ALEGRO, J.H.A. **Desenvolvimento de queijo Minas frescal probiótico com *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* isolados e em co-cultura**. São Paulo, 2003. 84p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

ALIMENTO SEGURO. **General Mills introduz barras de cereais no Brasil**. Disponível em: <http://www.alimentoseguro.com.br/>. Acesso em: 11 mar. 2008.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTIS. The definition of dietary fiber. **Cereal Foods World**, v.46, n.3, p.112-129, 2001.

AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. **Journal of the American Dietetic Association**, v.104, n.5, p.814-826, 2004. [ADA Reports].

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. [Report].

ANDERSON, A.D.G.; MCNAUGHT, C.E.; JAIN, P.K.; MACFIE, J. Randomised clinical trial of synbiotic therapy in elective surgical patients. **Gut**, v.53, n.2, p.241-245, 2004.

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.

ANGUS, F.; SMART, S.; SHORTT, C. Prebiotic ingredients with emphasis on galacto-oligosaccharides and fructo-oligosaccharides. In: TAMIME, A., ed. **Probiotic dairy products**: society of dairy technology. Oxford, Ames: Blackwell, 2005. cap.6, p.120-137.

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

ANURADHA, S.; RAJESHWARI, K. Probiotics in health and disease. **Journal - Indian Academy of Clinical Medicine**, v.6, n.1, p.67-72, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução n.18, de 30 de abril de 1999a**. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária 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, constante do anexo desta portaria. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/search.php>. Acesso em: 2 out. 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução n.19, de 30 de abril de 1999b**. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/search.php>. Acesso em: 2 out. 2007.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **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://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/search.php>. Acesso em: 11 nov. 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC n.359, de 23 de dezembro de 2003a**. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova regulamento técnico de porções de alimentos embalados

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução n.267, de 25 de dezembro de 2003b**. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária dispõe sobre o Regulamento Técnico de boas práticas de fabricação para estabelecimentos industrializadores de gelados comestíveis e a lista de verificação das boas práticas de fabricação para estabelecimentos industrializadores de gelados comestíveis. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=8133>. Acesso em: 27 out. 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC n.266, de 22 de setembro de 2005a**. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico para gelados comestíveis e preparados para gelados comestíveis. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18825&word=>. Acesso em: 27 out. 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC n.263, de 22 de setembro de 2005b**. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos, constantes do anexo desta resolução. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18822&word=>. Acesso em: 12 nov. 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos. IX Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas, de agosto de 2007a. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 24 out. 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC n.3, de 15 de janeiro de 2007b**. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes, que consta como anexo da presente resolução. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/03_170107rdc.htm. Acesso em: 20 mar. 2008.

ARAGON-ALEGRO, L.C.; ALEGRO, J.H.A.; CARDARELLI, H.R.; CHIU, M.C.; SAAD, S.M.I. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT - Food Science and Technology**, v.40, n.4, p.669-675, 2007.

ARYANA, K.J.; HAQUE, Z.U. Effect of commercial fat replacers on the microstructure of low-fat Cheddar cheese. **International Journal of Food Science and Technology**, v.36, n.2, p.169-177, 2001.

ARYANA, K.J.; SUMMERS, M. Probiotic, fat-free, no sugar-added ice cream. **Milchwissenschaft**, v.61, n.2, p.184-187, 2006.

ARYANA, K.J.; PLAUCHE, S.; NIA, T. Prebiotic and probiotic fat free yogurt. **Milchwissenschaft**, v.62, n.3, p.295-298, 2007a.

ARYANA, K.J.; PLAUCHE, S.; RAO, R.M.; MCGREW, P.; SHAH, N.P. Fat-free plain yogurt manufactured with inulins of various chain lengths and *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Food Science**, n.72, v.3, p.79-84, 2007b.

ARYANA, K.J.; PLAUCHE, S.; RAO, R.M.; MCGREW, P.; SHAH, N.P. Fat-free plain yogurt manufactured with inulins of various chain lengths and *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Food Science**, n.72, v.3, p.79-84, 2007b.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE SORVETES. 2007. **Gigantes do sorvete lançam novidades para a alta temporada**. Disponível em: http://abis-sorvetes.blogspot.com/2007_12_01_archive.html. Acesso em: 11 mar. 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 17.ed. Gaithersburg: AOAC international, 2000a. v.2, p.84.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 17.ed. Gaithersburg: AOAC, 2000b. v.2, p.45.78E-45.80.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 17.ed. Gaithersburg: AOAC, 2000c. v.2, p.32.7-32.10.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 17.ed. Gaithersburg: AOAC, 2000d. v.2, p.45.74-45.78.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 17.ed. Gaithersburg: AOAC, 2000e. v.2, p.45.78-78C.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 17.ed. Gaithersburg: AOAC, 2000f. v.2, p.45.78C-45.78E.

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.

BAKKER-ZIERIKZEE, A.M.; VAN TOL, E.A.F.; KROES, H.; ALLES, M.S.; KOK, F.J.; BINDELS, J.G. Faecal SIgA secretion in infants fed on pre- or probiotic infant formula. **Pediatric Allergy and Immunology**, v.17, n.2, p.134-140, 2006.

BARBOSA, M. Na onda da barra - com uma gestão alternativa e um produto campeão de vendas, Nutrimental afasta a crise e volta a ser uma empresa saudável. **ISTOÉ Dinheiro**, dez. 2001. Disponível em: http://www.terra.com.br/istoedinheiro/224/negocios/224_na_onda_da_barra.htm. Acesso em: 11 mar. 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. 480p.

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

BERGAMINI, C.V.; HYNES, E.R.; QUIBERONI, A.; SUÁREZ, V.B.; ZALAZAR, C.A. Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. **Food Research International**, v.38, n.5, p.597-604, 2005.

BEZKOROVAINY, A. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, suppl.2, p.399-405, 2001.

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.

BOEHM, G.; LIDESTRI, M.; CASETTA, P.; JELINEK, J.; NEGRETTI, F.; STAHL, B.; MARINI, A. Supplementation of a bovine milk formula with an oligosaccharide mixture increases counts of faecal bifidobacteria in preterm infants. **Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition**, v.86, n.3, p.178-181, 2002.

BORRIELLO, S.P.; HAMMES, W.P.; HOLZAPFEL, W.; MARTEAU, P.; SCHREZENMEIR, J.; VAARA, M.; VALTONEN, V. Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. **Clinical Infectious Diseases**, v.36, n.6, p.775-780, 2003.

BOUHNİK, Y.; POCHART, P.; MARTEAU, P.; ARLET, G.; GODEREL, I.; RAMBAUD, J.C. Fecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium* sp ingested in fermented milk. **Gastroenterology**, v.102, n.3, p.875-878, 1992.

BOUSTANI, P.; MITCHELL, V.W. Cereal bars: a perceptual, chemical and sensory analysis. **British Food Journal**, v.92, n.5, p.17-22, 1990.

BOWER, J.A.; WHITTEN, R. Sensory characteristics and consumer liking for cereal bar snack foods. **Journal of Sensory Studies**, v.15, n.3, p.327-345, 2000.

BROEKAERT, I.J.; WALKER, W.A. Probiotics and chronic disease. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.40, n.3, p.270-274, 2006.

BRUHN, C.M.; COTTER, A.; DIAZ-KNAUF, K.; SUTHERLIN, J.; WEST, E.; WIGHTMAN, N.; WILLIAMSON, E.; YAFFEE, M. Consumer attitudes and market potential for foods using fat substitutes. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.9, p.2569-2577, 1992.

BRUNSER, O.; GOTTELAND, M.; CRUCHET, S.; FIGUEROA, G.; GARRIDO, D.; STEENHOUT, P. Effect of a milk formula with prebiotics on the intestinal microbiota of infants after an antibiotic treatment. **Pediatric Research**, v.59, n.3, p.451-456, 2006.

BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.; ASSIS, E.G.; SAAD, S.M.I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **LWT – Food Science and Technology**, v.38, n.2, p.173-180, 2005a.

BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.; SAAD, S.M.I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, v.15, n.12, p.1279-1288, 2005b.

BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.; SAAD, S.M.I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, v.15, n.12, p.1279-1288, 2005b.

BURITI, F.C.A.; 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, 2007a.

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, 2007b.

BURITI, F.C.A.; CARDARELLI, H.R.; SAAD, S.M.I. Biopreservation by *Lactobacillus paracasei* in coculture with *Streptococcus thermophilus* in potentially probiotic and synbiotic fresh cream cheeses. **Journal of Food Protection**, v.70, n.1, p.228-235, 2007c.

BURITI, F.C.A.; OKAZAKI, T.Y.; ALEGRO, H.A.; SAAD, S.M.I. Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh cheese. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.57, n.2, p.179-185, 2007d.

BURITI, F.C.A.; CARDARELLI, H.R.; SAAD, S.M.I. Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco cremoso simbiótico: Implicações da adição de *Lactobacillus paracasei* e inulina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.1, p.75-84, 2008.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2003. 255p.

CAMBRIDGE. Dictionaries Online. Cambridge Advanced Learner's Dictionary. Disponível em: <http://dictionary.cambridge.org/define.asp?key=16060&dict=CALD>. Acesso em: 18 abr. 2006.

CAMIRE, M.E.; DOUGHERTY, M.P.; TEH, Y.H. Frozen wild blueberry-tofu-soymilk desserts. **Journal of Food Science**, v.71, n.2, p.119-123, 2006.

CANDUCCI, F.; CREMONINI, F.; ARMUZZI, A.; DI CARO, S.; GABRIELLI, M.; SANTARELLI, L.; NISTA, E.; LUPASCU, A.; DE MARTINI, D.; GASBARRINI, A. Probiotics and *Helicobacter pylori* eradication. **Digestive and Liver Disease**, v.34, suppl.2, p.81-83, 2002.

CANNON, J.P.; LEE, T.A.; BOLANOS, J.T.; DANZIGER, L.H. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.24, n.1, p.31-40, 2005.

CAPELA, P.; HAY, T.K.C.; SHAH, P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. **Food Research International**, v.39, n.2, p.203-211, 2006.

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.

instrumental texture properties of functional chocolate mousse. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.88, n.8, p.1318-1324, 2008.

CASHMAN, K. Prebiotics and calcium bioavailability. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v.4, n.1, p.21-32, 2003.

CASTEELE, S.V.; VANHEUVERZWIJN, T.; RUYSSSEN, T.; ASSCHE, P.V.; SWINGS, J.; HUYS, G. Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. **International Dairy Journal**, v.16, n.12, p.1470-1476, 2006.

CASTRO, I.A.; TIRAPEGUI, J. Alimentos funcionais: considerações gerais. In: TIRAPEGUI, J., ed. **Nutrição: fundamentos e aspectos atuais**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2006. cap.20, p.265-273.

CAUSEY, J.L.; FEIRTAG, J.M.; GALLAHER, D.D.; TUNGLAND, B.C.; SLAVIN, J. Effects of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and the gastrointestinal environment in hypercholesterolemic men. **Nutrition Research**, v.20, n.2, p.191-201, 2000.

CHAMPAGNE, C.P.; GARDNER, N.J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, n.1, p.61-84, 2005.

CHATTERJEE, A.; YASMIN, T.; BAGCHI, S.; STOHS, S.J. The bactericidal effects of *Lactobacillus acidophilus*, garcinol and Protykin® compared to clarithromycin, on *Helicobacter pylori*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.243, n.1/2, p.29-35, 2003.

CHILDS, J.L.; YATES, M.D.; DRAKE, M.A. Sensory properties of meal replacement bars and beverages made from whey and soy proteins. **Journal of Food Science**, v.72, n.6, p.425-434, 2007.

CHINACHOTI, P. Carbohydrates: functionality in foods. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.61, p.922-929, 1995.

CHIODA, T.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; GARCIA, G.R.; PIGATTO, C.P.; RIBEIRO, C.A.M.; RAGAZZANI, A.V.F. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de queijo "minas frescal" por *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência Rural**, v.37, n.2, p.583-585, 2007.

CHOURAQUI, J.P.; VAN EGROO, L.D.; FICHOT, M.C. Acidified milk formula supplemented with bifidobacterium lactis: impact on infant diarrhea in residential care settings. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.38, n.3, p.288-292, 2004.

CHRISTIANSEN, P.S.; EDELSTEN, D.; KRISTIANSEN, J.R.; NIELSEN, E.W. Some properties of ice cream containing Bifidobacterium bifidum and Lactobacillus acidophilus. **Milchwissenschaft**, v.51, n.9, p.502-504, 1996.

CHRISTIE, W.W. **Lipid analysis: isolation, separation, identification and structural analysis of lipids**. 2.ed. Oxford: Pergamon, 1982. 207p. (Pergamon international library of science, technology, engineering, and social studies).

CHRISTIE, W.W. **Lipid analysis**: isolation, separation, identification and structural analysis of lipids. 2.ed. Oxford: Pergamon, 1982. 207p. (Pergamon international library of science, technology, engineering, and social studies).

CHUNG, S.J.; HEYMANN, H.; GRUN, I.U. Release of artificial cherry flavor from ice creams varying in fat and fat replacers. **Journal of Sensory Studies**, v.19, n.3, p.211-236, 2004.

CLAVEL, T.; HALLER, D. Molecular interactions between bacteria, the epithelium, and the mucosal immune system in the intestinal tract: implications for chronic inflammation. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v.8, n.2, p.25-43, 2007.

COCONNIER, M.H.; LIEVIN, V.; HEMERY, E. SERVIN, A. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection *in vitro* and *in vivo* by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.11, p.4573-4580, 1998.

COMMANE, D.M.; SHORTT, C.T.; SILVI, S.; CRESCI, A.; HUGHES, R.M.; ROWLAND, I.R. Effects of fermentation products of pro- and prebiotics on trans-epithelial electrical resistance in an *in vitro* model of the colon. **Nutrition and Cancer**, v.51, n.1, p.102-109, 2005.

CORRALES, A.; HENDERSON, M.; MORALES, I. Sobrevivencia de microorganismos probióticos en helado batido *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* en helado batido. **Revista Chilena de Nutrición**, v.34, n.2, p.157-163, 2007.

CORRÊA, S.B.M.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Probiotic potential and sensory properties of coconut flan supplemented with *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*, during shelf life of the product. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, n.9, p.1560-1568, 2008.

COUSSEMENT, P.A.A. Inulin and oligofructose: safe intakes and legal status. **Journal of Nutrition**, v.129, suppl.7, p.1412-1417, 1999.

CRAIG, S.A.S.; HOLDEN, J.F.; KHALED, M.Y. Determination of polydextrose as dietary fiber in foods. **Journal of AOAC International**, v.83, n.4, p.1006-1012, 2000.

CRAIG, S.A.S.; HOLDEN, J.F.; KHALED, M.Y. Determination of polydextrose in foods by ion chromatography the collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.84, n.2, p.472-478, 2001.

CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T. Gastrointestinal effects of prebiotics. **British Journal of Nutrition**, v.87, suppl.2, p.145-151, 2002.

CUMMINGS, J.; ANTOINE, J.M.; AZPIROZ, F.; BOURDET-SICARD, R.; BRANDTZAEG, P.; CALDER, P.; GIBSON, G. R.; GUARNER, F.; ISOLAURI, E.; PANNEMANS, D.; SHORTT, C.; TUIJTELAARS, S.; WATZL, B. Gut health and immunity. **European Journal of Nutrition**, v.43, suppl.2, p.118-173, 2004.

CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.26, n.6, p.767-778, 2007.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Evaluation of selective media for enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacteria*. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.9, p.1529-1536, 1996.

DAVIDSON, R.H.; DUNCAN, S.E.; HACKNEY, C.R.; EIGEL, W.N.; BOLING, J.W. Probiotic cultures survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.4, p.666-673, 2000.

DELZENNE, N.M.; ROBERFROID, M.R. Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. **LWT - Food Science and technology**, v.27, n.1, p.1-6, 1994.

DEVEREUX, H.M.; JONES, G.P.; MCCORMACK, L.; HUNTER, W.C. Consumer acceptability of low fat foods containing inulin and oligofructose. **Journal of Food Science**, v.68, n.5, p.1850-1854, 2003.

DINKÇI, N.; ÜNAL, G.; AKALIN, S.; GÖNÇ, S. The importance of probiotics in pediatrics. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.5, n.6, p.608-611, 2006.

DOLEYRES, Y.; LACROIX, C. Technologies with free and immobilized cells for probiotic bifidobacteria production and protection. **International Dairy Journal**, v.15, n.10, p.973-988, 2005.

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

DRAKE, M.A. Invited review: sensory analysis of dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.11, p.4925-4937, 2007.

DUEZ, H.; PELLETIER, C.; COOLS, S.; AISSI, E.; CAYUELA, C.; GAVINI, F.; BOUQUELET, S.; NEUT, C.; MENGAUD, J. A colony immunoblotting method for quantitative detection of a *Bifidobacterium animalis* probiotic strain in human faeces. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, n.6, p.1019-1027, 2000.

DUTCOSKY, S.D.; GROSSMANN, M.V.E.; SILVA, R.S.S.F.; WELSCH, A.K. Combined sensory optimization of a prebiotic cereal product using multicomponent mixture experiments. **Food Chemistry**, v.98, n.4, p.630-638, 2006.

VAN DRUNEN, K. Using dried fruits to add essential nutrients to cereals, bars, and breads. **Cereal Foods World**, v.47, n.7, p.311-313, 2002.

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.

ESTÉVEZ, A.M.; ESCOBAR, B.; VÁSQUEZ, M.; CASTILLO, E.; ARAYA, E.; ZACARÍAS, I. Cereal and nuts bars, nutritional quality and storage stability. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.47, n.4, p.309-317, 1995.

FARNWORTH, E.R. The evidence to support health claims for probiotics. **Journal of Nutrition**, v.138, n.6, p.1250-1254, 2008.

FÁVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. **Journal of Microencapsulation**, v.19, n.4, p.485-494, 2002.

FÁVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. **Journal of Microencapsulation**, v.19, n.4, p.485-494, 2002.

FÁVARO-TRINDADE, C.S.; BERNARDI, S.; BODINI, R.B.; BALIEIRO, J.C.C.; ALMEIDA, E. Sensory acceptability and stability of probiotic microorganisms and vitamin C in fermented acerola (*Malpighia emarginata* DC.) ice cream. **Journal of Food Science**, v.71, n.6, p.492-495, 2006.

FÁVARO-TRINDADE, C.S.; DE CARVALHO BALIEIRO, J.C.; DIAS, P.F.; SANINO, F.A.; BOSCHINI, C. Effects of culture, pH and fat concentration on melting rate and sensory characteristics of probiotic fermented yellow mombin (*Spondias mombin* L) ice creams. **Food Science and Technology International**, v.13, n.4, p.285-291, 2007.

FILISSETTI-COZZI, T.M.C.C.; LAJOLO, F.M. Fibra alimentar insolúvel, solúvel e total em alimentos brasileiros. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.27, n.1, p.83-99, 1991.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. 34p. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation]. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf. Acesso em: 08 mar. 2006.

FOX, P.F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; MCSWEENEY, P.L.H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen, 2000. 587p.

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

FRANCK, A. Oligofructose-enriched inulin stimulates calcium absorption and bone mineralization. **Nutrition Bulletin**, v.31, n.4, p.341-345, 2006.

FREITAS, D.G.C.D.; MORETTI, R.H. Barras de cereais elaboradas com proteína de soja e germen de trigo, características físico-químicas e textura durante armazenamento. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.55, n.3, p.167-178, 2005. [Trabajos de Investigación].

FREITAS, G.C.; MORETTI, R.T. Caracterização e avaliação sensorial de barra de cereais funcional de alto teor protéico e vitamínico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.318-324, 2006a.

FREITAS, G.C.; MORETTI, R.T. Barras de cereais de elevado teor protéico e vitamínico: estabilização enzimática e das vitaminas C e E durante armazenamento. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.56, n.3, p.269-274, 2006b. [Trabajos de Investigación].

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, n.5, p.365-378, 1989.

FUSTER, G.O.; GONZÁLEZ-MOLERO, I. Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. **Nutrición Hospitalaria**, v.22, suppl.2, p.26-34, 2007.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microflora: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, n.6, p.1401-1412, 1995.

GIBSON, G.R.; FULLER, R. Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **Journal of Nutrition**, v.130, suppl.2, p.391-395, 2000.

GIBSON, G.R.; MCCARTNEY, A.L.; RASTALL, R.A. Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. **British Journal of Nutrition**, v.93, suppl.1, p.31-34, 2005.

GOBBETTI, M.; RIZZELLO, C.G.; DI CAGNO, R.; DE ANGELIS, M. Sourdough lactobacilli and celiac disease. **Food Microbiology**, v.24, n.2, p.187-196, 2007.

GOEL, A.K.; DILBAGHI, N.; KAMBOJ, D.V.; SINGH, L. Probiotics: microbial therapy for health modulation. **Defence Science Journal**, v.56, n.4, p.513-529, 2006.

GOFF, H.D.; GRIFFITHS, M.W. Major advances in fresh milk and milk products: fluid milk products and frozen desserts. **Journal of Dairy Science**, v.89, n.4, p.1163-1173, 2006.

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

GOLDIN, B.R. Health benefits of probiotics. **British Journal of Nutrition**, v.80, suppl.2, p.203-207, 1998.

GOLDIN, B.R.; GORBACH, S.L. Clinical indications for probiotics: An overview. **Clinical Infectious Diseases**, v.46, suppl.2, p.96-100, 2008.

GOMES, C.R.; MONTENEGRO, F.M. **Curso de tecnologia de barras de cereais**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2006. 110p.

GOTTELAND, M.; CRUCHET, S.; BRUNSER, O. Can amount of *Helicobacter pylori* in the stomach be kept low through probiotic intake? **American Journal of Clinical Nutrition**, v.81, n.4, p.939-940, 2005.

GOTTELAND, M.; BRUNSER, O.; CRUCHET, S. Systematic review: are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.23, n.8, p.1077-1086, 2006.

GOTTELAND, M.; BRUNSER, O. Effect of an inulin containing yogurt on intestinal function of healthy and constipated volunteers. **Revista Chilena de Nutrición**, v.33, n.3, p.553-560, 2006.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v.361, n.9356, p.512-519, 2003.

GUARNER, F.; PERDIGON, G.; CORTIER, G.; SALMINEN, S.; KOLETZKO, B.; MORELLI, L. Should yoghurt cultures be considered probiotic? **British Journal of Nutrition**, v.93, n.6, p. 783-786, 2005.

GUARNER, F.; PERDIGON, G.; CORTIER, G.; SALMINEN, S.; KOLETZKO, B.; MORELLI, L. Should yoghurt cultures be considered probiotic? **British Journal of Nutrition**, v.93, n.6, p. 783-786, 2005.

GUINARD, J.X.; ZOUMAS-MORSE, C.; MORI, L.; UATONI, B.; PANYAM, D.; KILARA, A. Sugar and fat effects on sensory properties of ice cream. **Journal of Food Science**, v.62, n.5, p.1087-1094, 1997.

GULEWICZ, P.; CIESIOKA, D.; FIAS, J.; VIDAL-VALVERDE, C.; FREJNAGEL, S.; TROJANOWSKA, K.; GULEWICZ, K. Simple method of isolation and purification of galactosides from legumes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.8, p.3120-3123, 2000.

GUNASERAKAN, S.; AK, M.M. Cheese texture. In: _____. **Cheese rheology and texture**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.299-329.

GUTKOSKI, L.C.; BONAMIGO, J.M.D.A.; TEIXEIRA, D.M.D.F.; PEDÓ, I. Desenvolvimento de barras de cereais à base de aveia com alto teor de fibra alimentar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.2, p. 355-363, 2007.

HAGEN, M.; NARVHUS, J.A. Production of ice-cream containing probiotic bacteria. **Milchwissenschaft**, v.54, n.5, p.265-268, 1999.

HALLUND, J.; BÜGEL, S.; THOLSTRUP, T.; FERRARI, M.; TALBOT, D.; HALL, W.L.; REIMANN, M.; WILLIAMS, C.M.; WIINBERG, N. Soya isoflavone-enriched cereal bars affect markers of endothelial function in postmenopausal women. **British Journal of Nutrition**, v.95, n.6, p.1120-1126, 2006.

HAMILTON-MILLER, J.M.T. The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.22, n.4, p.360-366, 2003.

HANSEN, L.T.; ALLAN-WOJTAS, P.M.; JIN, Y.-L.; PAULSON, A.T. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v.19, n.1, p.35-45, 2002.

HARMSSEN, H.J.J.M.; WILDEBOER-VELOO, A.C.M.; RAANGS, G.C.; WAGENDORP, A.A.; KLIJN, N.; BINDELS, J.G.; WELLING, G.W. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.30, n.1, p.61-67, 2000.

HARTEL, R.W. Ice crystallization during the manufacture of ice cream. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p.315-321, 1996.

HAYNES, I.N.; PLAYNE, M.J. Survival of probiotic cultures in low-fat ice-cream. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.57, n.1, p.10-14, 2002.

HEDIN, C.; WHELAN, K.; LINDSAY, J.O. Evidence for the use of probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: a review of clinical trials. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.66, n.3, p.307-315, 2007.

HELLAND, M.H.; WICKLUND, T.; NARVHUS, J.A. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk- and water-based cereal puddings. **International Dairy Journal**, v.14, n.11, p.957-965, 2004a.

HELLAND, M.H.; WICKLUND, T.; NARVHUS, J.A. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria, in maize porridge with added malted barley. **International Journal of Food Microbiology**, v.91, n.3, p.305-313, 2004b.

HEMPEL, S.; JACOB, A.; ROHM, H. Influence of inulin modification and flour type on the sensory quality of prebiotic wafer crackers. **European Food Research and Technology**, v.224, n.3, p.335-341, 2007.

HOEBREGS, H. Fructans in foods and food products, ion-exchange chromatographic method: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.80, n.5, p.1029-1036, 1997.

HOFFMAN, F.A. Business considerations in the development of probiotics. **Clinical Infectious Diseases**, v.46, suppl.2, p.141-143, 2008.

HOLZAPFEL, W.; HABERER, P.; SNEL, H.; SCHILLINGER, U.; HUIS IN'T VELD, J.H. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, n.2, p.85-101, 1998.

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

HOMAYOUNI, A.; EHSANI, M.R.; AZIZI, A.; RAZAVI, S.H.; YARMAND, M.S. Growth and survival of some probiotic strains in simulated ice cream conditions. **Journal of Applied Sciences**, v.8, n.2, p.379-382, 2008.

HOND, E.D.; GEYPENS, B.; GHOOS, Y. Effect of high performance chicory inulin on constipation. **Nutrition Research**, v.20, n.5, p.731-736, 2000.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4.ed. Brasília: MS, 2005. 1018p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus* – culture media. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n.306, p.23-33, 1995.

ISHIBASHI, N.; YAMAZAKI, S. Probiotics and safety. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, suppl.2, p.465-470, 2001.

ISOLAURI, E.; ARVOLA, T.; SÜTAS, Y.; MOILANEN, E.; SALMINEN, S. Probiotics in the management of atopic eczema. **Clinical and Experimental Allergy**, v.30, n.11, p.1604-1610, 2000.

ISOLAURI, E.; KIRJAVAINEN, P.V.; SALMINEN, S. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? **Gut**, v.50, suppl.3, p.54-59, 2002.

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

- ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. Probiotics. **Best Practice & Research, Clinical Gastroenterology**, v.18, n.2, p.299-313, 2004.
- JACKSON, K.G.; TAYLOR, G.R.J.; CLOHESSY, A.M.; WILLIAMS, C.M. The effect of the daily intake of inulin on fasting lipid, insulin and glucose concentrations in middle-aged men and women. **British Journal of Nutrition**, v.82, n.1, p.23-30, 1999.
- JAIN, P.K.; MCNAUGHT, C.E.; ANDERSON, A.D.G.; MACFIE, J.; MITCHELL, C.J. Influence of synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium lactis* Bb 12, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and oligofructose on gut barrier function and sepsis in critically ill patients: a randomised controlled trial. **Clinical Nutrition**, v.23, n.4, p.467-475, 2004.
- JAY, J.M. **Modern food microbiology**. 6.ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. 679p. (Aspen food science text series).
- JIE, Z.; BANG-YAO, L.; MING-JIE, X.; HAI-WEI, L.; ZU-KANG, A.; TING-SONG, W.; CRAIG, S.A.S. Studies on the effects of polydextrose intake on physiologic functions in Chinese people. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.72, n.6, p.1503-1509, 2000.
- JOHNSON-HENRY, K.C.; MITCHELL, D.J.; AVITZUR, Y.; GALINDO-MATA, E.; JONES, N.L.; SHERMAN, P.M. Probiotics reduce bacterial colonization and gastric inflammation in *H. pylori*-infected mice. **Digestive Diseases and Sciences**, v.49, n.7/8, p.1095-1102, 2004.
- JONES, P.J.; JEW, S. Functional food development: concept to reality. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, n.7, p.387-390, 2007. 19.498
- JUHKAM, K.; ELIAS, P.; ROASTO, M.; TAMME, T. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt containing inulin or oligofructose during refrigerated storage. **Milchwissenschaft**, v.62, n.1, p.52-54, 2007.
- JUNTUNEN, M.; KIRJAVAINEN, P.V.; OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.J.; ISOLAURI, E. Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, n.2, p.293-296, 2001.
- KAILASAPATHY, K.; SULTANA, K. Survival and β -D-galactosidase activity of encapsulated and free *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in ice-cream. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.58, n.3, p.223-227, 2003.
- KASIMOĞLU, A.; GÖNCÜOĞLU, M.; AKGÜN, S. Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. **International Dairy Journal**, v.14, n.12, p.1067-1073, 2004.
- KIBON. **Produtos**. Disponível em: http://www.kibon.com.br/1/f_index.html. Acesso em: 27 out. 2007.
- KIM, S.H.; DA, H.L.; MEYER, D. Supplementation of infant formula with native inulin has a prebiotic effect in formula-fed babies. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.16, n.1, p.172-177, 2007.
- KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, n.2, p.103-125, 1998.

KOCA, N.; METIN, M. Textural, melting and sensory properties of low-fat fresh kashar cheeses produced by using fat replacers. **International Dairy Journal**, v.14, n.4, p.365-373, 2004.

KOEFERLI, C.R.S.; PICCINALI, P.; SIGRIST, S. The influence of fat, sugar and non-fat milk solids on selected taste, flavor and texture parameters of a vanilla ice-cream. **Food Quality and Preference**, v.7, n.2, p.69-79, 1996.

KOLIDA, S.; GIBSON, G.R. Prebiotic capacity of inulin-type fructans. **Journal of Nutrition**, v.137, n.11, p.2503-2506, 2007.

KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A. SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.3, p.229-347, 2008.

KORUS, J.; GRZELAK, K.; ACHREMOWICZ, K.; SABAT, R. Influence of prebiotic additions on the quality of gluten-free bread and on the content of inulin and fructooligosaccharides. **Food Science and Technology International**, v.12, n.6, p.489-495, 2006.

KULLEN, M.J.; AMANN, M.M.; O'SHAUGHNESSY, M.J.; O'SULLIVAN, D.J.; BUSTA, F.F.; BRADY, L.J. Differentiation of ingested and endogenous bifidobacteria by DNA fingerprinting demonstrates the survival of an unmodified strain in the gastrointestinal tract of humans. **Journal of Nutrition**, v.127, n.1, p.89-94, 1997.

LA TORRE, L.; TAMIME, A.Y.; MUIR, D.D. Rheology and sensory profiling of set-type fermented milks made with different commercial probiotic and yoghurt starter cultures. **International Journal of Dairy Technology**, v.56, n.3, p.163-170, 2003.

LAAKE, K.O.; BJØRNEKLETT, A.; AAMODT, G.; AABAKKEN, L.; JACOBSEN, M.; BAKKA, A.; VATN, M.H. Outcome of four weeks' intervention with probiotics on symptoms and endoscopic appearance after surgical reconstruction with a J-configured ileal-pouch-anal-anastomosis in ulcerative colitis. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.40, n.1, p.43-51, 2005.

LANGLANDS, S.J.; HOPKINS, M.J.; COLEMAN, N.; CUMMINGS, J.H. Prebiotic carbohydrates modify the mucosa associated microflora of the human large bowel. **Gut**, v.53, n.11, p.1610-1616, 2004.

LAPIERRE, L.; UNDELAND, P.; COX, L.J. Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.5, p.1192-1196, 1992.

LARSEN, C.N.; NIELSEN, S.; KÆSTEL, P.; BROCKMANN, E.; BENNEDSEN, M.; CHRISTENSEN, H.R.; ESKESEN, D.C.; JACOBSEN, B.L.; MICHAELSEN, K.F. Dose-response study of probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* BB-12 and *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* CRL-341 in healthy young adults. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.60, n.11, p.1284-1293, 2006.

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

LEE, F.Y.; WHITE, C.H. Effect of ultrafiltration retentates and whey protein concentrates on ice cream quality during storage. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.4, p.1170-1180, 1991.

LEE, Y.K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. **Handbook of probiotics**. New York, Chichester: John Wiley, 1999. 211p.

LEE, Y.K.; LIM, C.Y.; TENG, W.L.; OUWEHAND, A.C.; TUOMOLA, E.M.; SALMINEN, S. Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.9, p.3692-3697, 2000.

LINDSAY, J.O.; WHELAN, K.; STAGG, A.J.; GOBIN, P.; AL-HASSI, H.O.; RAYMENT, N.; KAMM, M.A.; KNIGHT, S.C.; FORBES, A. Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease. **Gut**, v.55, n.3, p.348-355, 2006.

LIONG, M.T. Probiotics: a critical review of their potential role as antihypertensives, immune modulators, hypocholesterolemic, and perimenopausal treatments. **Nutrition Reviews**, v.65, n.7, p.316-328, 2007.

LIONG, M.T. Safety of probiotics: Translocation and infection. **Nutrition Reviews**, v.66, n.4, p.192-202, 2008.

LIOU, B.K.; GRUN, I.U. Effect of fat level on the perception of five flavor chemicals in ice cream with or without fat mimetics by using a descriptive test. **Journal of Food Science**, v.72, n.8, p.595-604, 2007.

LOMER, M.C.E.; PARKES, G.C.; SANDERSON, J.D. Lactose intolerance in clinical practice - Myths and realities. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.27, n.2, p.93-103, 2008.

LORCA, G.L.; WADSTRÖM, T.; VALDEZ, G.F.; LJUNGH, A. *Lactobacillus acidophilus* autolysins inhibit *Helicobacter pylori* in vitro. **Current Microbiology**, v.42, n.1, p.39-44, 2001.

LU, T.J.; CHUANG, C.W.; CHANG, Y.H. Sensory and physicochemical analyses on commercial taro ice products. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.10, n.1, p.55-63, 2002.

LUCAS, A.; SODINI, I.; MONNET, C.; JOLIVET, P.; CORRIEU, G. Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v.14, n.1, p.47-53, 2004.

MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.24, n.5, p.701-714, 2006.

MAGARIÑOS, H.; SELAIVE, S.; COSTA, M.; FLORES, M.; PIZARRO, O. Viability of probiotic micro-organisms (*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.

MAINVILLE, I.; ARCAND, Y.; FARNWORTH, E.R. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v.99, n.3, p.287-296, 2005.

MÄKELÄINEN, H.; TAHVONEN, R.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. *In vivo* safety assessment of two *Bifidobacterium longum* strains. **Microbiology and Immunology**, v.47, n.12, p.911-914, 2003.

MAKRAS, L.; TRIANTAFYLLOU, V.; FAYOL-MESSAOUDI, D.; ADRIANY, T.; ZOUMPOPOULOU, G.; TSAKALIDOU, E.; SERVIN, A.; VUYST, L.D. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. **Research in Microbiology**, v.157, n.3, p.241-247, 2006.

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

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

MARSHALL, R.T. Frozen desserts. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L., eds. **Applied dairy microbiology**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2001. cap.4, p.93-125. (Food science and technology, 110).

MARTÍN-DIANA, A.; JANER, C.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Effect of milk fat replacement by polyunsaturated fatty acids on the microbiological, rheological and sensorial properties of fermented milks. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.84, n.12, p.1599-1605, 2004.

MARUYAMA, L.Y.; CARDARELLI, H.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Textura instrumental de queijo petit-suisse potencialmente probiótico: influencia de diferentes combinações de gomas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.386-393, 2006.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDER, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v.12, n.2/3, p.173-182, 2002.

MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M.; DE VOS, W.M. Future development of probiotic dairy products. In: TAMIME, A., ed. **Probiotic dairy products**: society of dairy technology. Oxford, Ames: Blackwell, 2005. cap.9, p.195-205.

MÄTTÖ, J.; FONDÉN, R.; TOLVANEN, T.; WRIGHT, A.V.; VILPPONEN-SALMELA, T.; SATOKARI, R.; SAARELA, M. Intestinal survival and persistence of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains administered in triple-strain yoghurt. **International Dairy Journal**, v.16, n.10, p.1174-1180, 2006.

MAURER, G.; FUKUDA, G.; NIELSEN, S. Development of bean-based granola bars and cereal. **Cereal Foods World**, v.50, n.1, p. 27-32, 2005.

MCCLEMENTS, D.J. Emulsion ingredients. In: _____. **Food emulsions**: principles, practices, and techniques. 2ed. Boca Raton: CRC Press, 2005. cap.4, p.95-174. (CRC series in contemporary food science).

- MCFARLAND, L.V. A review of the evidence of health claims for biotherapeutic agents. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.12, n.2, p.65-76, 2000.
- MEDELLIN-PEÑA, M.J.; WANG, H.; JOHNSON, R.; ANAND, S.; GRIFFITHS, M.W. Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.13, p.4259-4267, 2007.
- MEHTA, R.S. Dietary fiber benefits. **Cereal Foods World**, v.50, n.2, p.66-71, 2005.
- MENNE, E.; GUGGENBUHL, N.; ROBERFROID. Fn-type chicory inulin hydrolysate has a prebiotic effect in humans. **Journal of Nutrition**, v.130, n.5, p.1197-10199, 2000.
- METTS, J.; FAMULA, T.R.; TRENEV, N.; CLEMENS, R.A. *Lactobacillus acidophilus*, strain NAS (H₂O₂ Positive), in reduction of recurrent candidal vulvovaginitis. **Journal of Applied Research**, v.3, n.4, p.340-348, 2003.
- MEURMAN, J.H.; STAMATOVA, I. Probiotics: contributions to oral health. **Oral Diseases**, v.13, n.5, p.443-451, 2007.
- MOGENSEN, G.; ROWLAND, I.; MIDTVEDT, T.; FONDEN, R. Functional aspects of pro- and prebiotics: a literature review on immune modulation and influence on cancer. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.12, suppl.2, p.40-44, 2000.
- MORO, G.; MINOLI, I.; MOSCA, M.; FANARO, S.; JELINEK, J.; STAHL, B.; BOEHM, G. Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.34, n.3, p.291-295, 2002.
- MORTAZAVIAN, A.M.; EHSANI, M.R.; MOUSAVI, S.M.; REINHEIMER, J.A.; EMAMDJOMEH, Z.; SOHRABVANDI, S.; REZAEI, K. Preliminary investigation of the combined effect of heat treatment and incubation temperature on the viability of the probiotic micro-organisms in freshly made yogurt. **International Journal of Dairy Technology**, v.59, n.1, p.8-11, 2006.
- MORTENSEN, P.B.; CLAUSEN, M.R. Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.31, p.132-148, 1996.
- 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.
- MUSSATTO, S.I.; MANCILHA, I.M. Non-digestible oligosaccharides: a review. **Carbohydrate Polymers**, v.68, n.3, p.587-597, 2007.
- NABESHIMA, E.H.N.; OLIVEIRA, E.S.O.; HASHIMOTO, J.M.; JACKIX, M.N.H. Propriedades do sorvete de baunilha elaborado com substitutos de gordura e sacarose. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v.198, n.2, p.169-182, 2001.
- NEBESNY, E.; ŻYŻELEWICZ, D.; MOTYL, I.; LIBUDZISZ, Z. Dark chocolates supplemented with *Lactobacillus* strains. **European Food Research and Technology**, v.225, n.1, p.33-42, 2007.

NESTLÉ. **Produtos, sorvetes, consumo individual.** Disponível em: http://www.nestle.com.br/PortalNestle/matrixcontainer/Default.aspx? MXMainLoaded=../Produto/wuCategoria.ascx&tpparametro=C&Home=S&cd_categoria=370&nmCategoria=Sorvetes&nmlImagemFamilia=CPR370.gif&nmlImagem=CPR370.gif&intQt=1. Acesso em: 27 out. 2007.

NICOLI, J.R.; VIEIRA, E.C.; PENNA, F.J.; VIEIRA, L.Q.; RODRIGUES, A.C.P.; NEUMANN, E.; SILVA, A.M.; LIMA FILHO, J.V.M.; 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. cap.6, p.123-133.

NIELSEN. Imprensa e Universidades. Releases Nielsen. Fevereiro de 2008 – São Paulo, Brasil. **Resultados do consumo no Brasil em 2007**. Disponível em: <http://br.nielsen.com/news/fechamento2007.shtml>. Acesso em: 11 mar. 2008.

NILSSON, U.; NYMAN, M.; AHRNÉ, S.; SULLIVAN, E.O.; FITZGERALD, G. *Bifidobacterium lactis* Bb-12 and *Lactobacillus salivarius* UCC500 modify carboxylic acid formation in the hindgut of rats given pectin, inulin, and lactitol. **Journal of Nutrition**, v.136, n.8, p.2175-2180, 2006.

O'BRIEN, C.M.; MUELLER, A.; SCANNELL, A.G.M.; ARENDT, E.K. Evaluation of the effects of fat replacers on the quality of wheat bread. **Journal of Food Engineering**, v.56, n.2/3, p.265-267, 2003.

O'HARA, A.M.; SHANAHAN, F. Mechanisms of action of probiotics in intestinal diseases. **TheScientificWorldJournal**, v.7, p.31-46, 2007.

OHMES, R.L.; MARSHALL, R.T.; HEYMANN, H. Sensory and physical properties of ice creams containing milk fat or fat replacers. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.5, p.1222-1228, 1998.

OLSON, D.W.; WHITE, C.H.; WATSON, C.E. Properties of frozen dairy desserts processed by microfluidization of their mixes. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.4, p.1157-1162, 2003.

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N.P. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. **International Dairy Journal**, v.16, n.6, p.446-456, 2006.

ORDONEZ, M.; ROVIRA, J.; JAIME, I. The relationship between the composition and texture of conventional and low-fat frankfurters. **International Journal of Food Science and Technology**, v.36, n.7, p.749-758, 2001.

ØSTLIE, H.M.; TREIMO, J.; NARVHUS, J.A. Effect of temperature on growth and metabolism of probiotic bacteria in milk. **International Dairy Journal**, v.15, n.10, p.989-997, 2005.

OUWEHAND, A.C.; KURVINEN, T.; RISSANEN, P. Use of a probiotic *Bifidobacterium* in a dry food matrix, an *in vivo* study. **International Journal of Food Microbiology**, v.95, n.1, p.103-106, 2004.

PAPADEMAS, P.; BINTSIS, T. Microbiology of ice cream and related products. In: ROBINSON, R.K., ed. **Dairy microbiology handbook**. 3.ed. New York: Wiley Interscience, 2002. cap.6, p.213-260.

PARADA, J.; AGUILERA, J.M. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. **Journal of Food Science**, v.72, n.2, p.21-32, 2007.

PATIL, S.K.; PERERA, C.; BACZYNSKI, M. Wheat proteins as functional and nutritious ingredients. **Cereal Foods World**, v.50, n.5, p.266-269.

PICARD, C.; FIORAMONTI, J.; FRANÇOIS, A.; ROBINSON, T.; NEANT, F.; MATUCHANSKY, C. Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.22, n.6, p.495-512, 2005.

PRINDIVILLE, E.A.; MARSHALL, R.T.; HEYMANN, H. Effect of milk fat, cocoa butter, and whey protein fat replacers on the sensory properties of lowfat and nonfat chocolate ice cream. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.10, p.2216-2223, 2000.

PRADO, F.C.; PARADA, J.L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**, v.41, n.2, p.111-123, 2008.

PROSKY, L.; ASP, N.-G.; SCHWEIZER, T.F.; DEVRIES, J.W.; FURDA, I. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and foods products: interlaboratory study. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v.71, n.5, p.1017-1023, 1988.

PSZCZOLA, D.E. 31 ingredient developments for frozen desserts. **Food Technology**, v.56, n.10, p.46-65, 2002.

PUPIN, A.M. Probióticos, prebióticos e simbióticos: aplicações em alimentos funcionais. In: SEMINÁRIO NOVAS ALTERNATIVAS DE MERCADO -ALIMENTOS FUNCIONAIS & BIOTECNOLOGIA, Campinas, 2002. **Anais**. Campinas: ITAL, 2002. p.133-145.

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

QUIGLEY, E.M.M.; QUERA, R. Small intestinal bacterial overgrowth: roles of antibiotics, prebiotics, and probiotics. **Gastroenterology**, v.130, suppl.2, p.78-90, 2006.

RAFTER, J.; BENNETT, M.; CADERNI, G.; CLUNE, Y.; HUGHES, R.; KARLSSON, P.C.; KLINDER, A.; O'RIORDAN, M.; O'SULLIVAN, G.C.; POOLZOBEL, B.; RECHKEMMER, G.; ROLLER, M.; ROWLAND, I.; SALVADORI, M.; THIJS, H.; VAN LOO, J.; WATZL, B.; COLLINS, J.K. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.85, n.2, p.488-496, 2007.

RAO, V.A. The prebiotic properties of oligofructose at low intake levels. **Nutrition Research**, v.21, n.6, p.843-848, 2001.

RASCHKA, L.; DANIEL, H. Mechanisms underlying the effects of inulin-type fructans on calcium absorption in the large intestine of rats. **Bone**, v.37, n.5, p.728-735, 2005a.

RASCHKA, L.; DANIEL, H. Diet composition and age determine the effects of inulin-type fructans on intestinal calcium absorption in rat. **European Journal of Nutrition**, v.44, n.6, p.360-364, 2005b.

RASTALL, R.A.; GIBSON, G.R.; GILL, H.S.; GUARNER, F.; KLAENHAMMER, T.R.; POT, B.; REID, G.; ROWLAND, I.R.; SANDERS, M.E. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. **FEMS Microbiology Ecology**, v.52, n.2, p.145-152, 2005.

RAUTAVA, S.; ARVILOMMI, H.; ISOLAURI, E. Specific probiotics in enhancing maturation of IgA responses in formula-fed infants. **Pediatric Research**, v.60, n.2, p.221-224, 2006.

RAVULA, R.R.; SHAH, N.P. Viability of probiotic bacteria in fermented frozen dairy desserts. **Food Australia**, v.50, n.3, p.136-139, 1998.

RAY, B. **Fundamental food microbiology**. 3.ed. New York: CRC Press, 2004. 608p.

REDGWELL, R.J.; FISCHER, M. Dietary fiber as a versatile food component: an industrial perspective. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.49, n.6, p.521-535, 2005.

REID, G. How science will help shape future clinical applications of probiotics. **Clinical Infectious Diseases**, v.46, suppl.2, p.62-66, 2008a.

REID, G. Probiotics and prebiotics - Progress and challenges. **International Dairy Journal**, v.18, n.10/11, p.969-975, 2008b.

RESTA-LENERT, S.; BARRETT, K.E. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive Escherichia coli (EIEC). **Gut**, v.52, n.7, p.988-997, 2003.

ROBERFROID, M.B.; GIBSON, G.R.; DELZENNE, N. The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: an approach to calculate its calorific value. **Nutrition Reviews**, v.51, n.5, p.137-146, 1993.

ROBERFROID, M.B.; VAN LOO, J.A.E.; GIBSON, G.R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **Journal of Nutrition**, v.128, n.1, p.11-19, 1998.

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

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

ROBERFROID, M.B. Chicory fructooligosaccharides and the gastrointestinal tract. **Nutrition**, v.16, n.7/8, p.677-679, 2000b.

ROBERFROID, M.B. Introducing inulin-type fructans. **British Journal of Nutrition**, v.93, suppl.1, p.13-25, 2005a.

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

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

ROLFE, R.D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **Journal of Nutrition**, v.130, suppl.2, p.396-402, 2000.

ROMEIH, E.A.; MICHAELIDOU, A.; BILIADERIS, C.G.; ZERFIRIDIS, G.K. Low-fat white-brined cheese made from bovine milk and two commercial fat mimetics: chemical, physical and sensory attributes. **International Dairy Journal**, v.12, n.6, p.525-540, 2002.

ROSENTHAL, A.J. Relation between instrumental and sensory measures of food texture. In: ROSENTHAL, A.J., ed. **Food texture: measurement and perception**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1999. cap.1, p.1-17. (A Chapman & Hall food science book).

ROSSI, E.A.; VENDRAMINI, R.C.; CARLOS, I.Z.; PEI, Y.C.; VALDEZ, G.F. Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties. **European Food Research and Technology**, v.209, n.5, p.305-307, 1999.

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

ROY, D. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v.69, n.3, p.167-182, 2001.

ROY, D. Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. **Lait**, v.85, n.1/2, p.39-56, 2005.

RUTHIG, D.J.; SIDER, D.; MECKLING-GILL, K.A. Health benefits of dietary fat reduction by a novel fat replacer: Mimix. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.52, n.1, p.61-69, 2001.

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

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉM, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v.84, n.3, p.197-215, 2000.

SAARELA, M.; VIRKAJÄRVI, I.; ALAKOMI, H.L.; MATTILA-SANDHOLM, T.; VAARI, A.; SUOMALAINEN, T.; MÄTTÖ, J. Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* cells produced without milk-based ingredients. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, n.6, p.1330-1339, 2005.

SAARELA, M.; VIRKAJÄRVI, I.; ALAKOMI, H.L.; SIGVART-MATTILA, P.; MÄTTÖ, J. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. **International Dairy Journal**, v.16, n.12, p.1477-1482, 2006.

SAARELA, M.; MAUKONEN, J.; VON WRIGHT, A.; VILPPONEN-SALMELA, T.; PATTERSON, A.J.; SCOTT, K.P.; HÄMYNEN, H.; MÄTTÖ, J. Tetracycline susceptibility of the ingested *Lactobacillus acidophilus* LaCH-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 strains during antibiotic/probiotic intervention. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.29, n.3, p.271–280, 2007.

SAAVEDRA, J.M. Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanisms of action and practical aspects. **Nutrition in Clinical Practice**, v.22, n.3, p.351–365, 2007.

SALEM, M.M.E.; FATHI, F.A.; AWAD, R.A. Production of functional ice cream. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, v.102, n.7, p.326–329, 2006.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; ISOLAURI, E. Clinical applications of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, n.5/6, p.563–572, 1998a.

SALMINEN, S.; BOULEY, C.; BOUTRON-ROUAULT, M.C.; CUMMINGS, J.H.; FRANCK, A.; GIBSON, G.R.; ISOLAURI, E.; MOREAU, M.C.; ROBERFROID, M.; ROWLAND, I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **British Journal of Nutrition**, v.80, suppl.1, p.147–171, 1998b.

SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Intestinal colonization, microbiota, and probiotics. **Journal of Pediatrics**, v.149, suppl.3, p.115–120, 2006.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, v.61, n.3, p.91–99, 2003.

SANDERS, M.E. Use of probiotics and yogurts in maintenance of health. **Journal of clinical gastroenterology**, v.42, suppl 2, p.71–74, 2008.

SANZ, Y.; NADAL, I.; SÁNCHEZ, E. Probiotics as drugs against human gastrointestinal infections. **Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery**, v.2, n.2, p.148–156, 2007.

SARKAR, S. Potential of prebiotics as functional foods: a review. **Nutrition & Food Science**, v.37, n.3, p.168–177, 2007.

SARKAR, S. Effect of probiotics on biotechnological characteristics of yoghurt: A review. **British Food Journal**, v.110, n.7, p.717–740, 2008.

SAXELIN, M. Probiotic formulations and applications, the current probiotics market, and changes in the marketplace: A European perspective. **Clinical Infectious Diseases**, v.46, suppl.2, p.76–79, 2008.

SCHAAFSMA, G.; MEULING, W.J.A.; VAN DOKKUM, W.; BOULEY, C. Effects of a milk product, fermented by *Lactobacillus acidophilus* and with fructooligosaccharides added, on blood lipids in male volunteers. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.52, n.6, p.436–440, 1998.

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

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

SEIDEL, C.; BOEHM, V.; VOGELSANG, H.; WAGNER, A.; PERSIN, C.; GLEI, M.; POOLZOBEL, B.L.; JAHREIS, G. Influence of prebiotics and antioxidants in bread on the immune system, antioxidative status and antioxidative capacity in male smokers and non-smokers. **British Journal of Nutrition**, v.97, n.2, p.349-356, 2007.

SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.4, p.894-907, 2000.

SHAH, N.P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v.17, n.11, p.1262-1277, 2007.

SHEU, B.S.; WU, J.J.; LO, C.Y.; WU, H.W.; CHEN, J.H.; LIN, Y.S.; LIN, M.D. Impact of supplement with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* containing yogurt on triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.16, n.9, p.1669-1675, 2002.

SHIHATA, A.; SHAH, N.P. Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.10, n.5/6, p.401-408, 2000.

SINGH, S.K.; CASTELL-PEREZ, M.E.; MOREIRA, R.G. Viscosity and textural attributes of reduced-fat peanut pastes. **Journal of Food Science**, v.65, n.5, p.849-853, 2000.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food: product development, marketing and consumer acceptance: a review. **Appetite**, v.51, n.3, p.456-467, 2008.

SLAČANAC, V.; HARDI, J.; PAVLOVIĆ, H.; VUKOVIĆ, D.; ČUTIĆ, V. Inhibitory effect of goat and cow milk fermented by ABT-2 culture (*Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium lactis* BB-12 and *Streptococcus thermophilus*) on the growth of some uropathogenic *E. coli* strains. **Italian Journal of Food Science**, v.16, n.2, p.209-219, 2004.

SLEATOR, R.D.; HILL, C. New frontiers in probiotic research. **Letters in Applied Microbiology**, v.46, n.2, p.143-147, 2008.

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

SOUZA, C.H.B.; BURITI, F.C.; HEHRENS, J.H.; SAAD, S.M.I. Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in co-culture with a thermophilic culture. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, n.5, p.871-877, 2008.

STABLE MICRO SYSTEMS. **Comparison of the shearing force of two different brands of ice-cream using a knife blade**. Disponível em: <http://www.stablemicrosystems.com/studies.htm#DAIRY>. Acesso em: 16 maio 2008.

STANTON, C.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; SINDEREN, D.V. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, n.2, p.198-203, 2005.

SZCZESNIAK, A.S. Texture is a sensory property. **Food Quality and Preference**, v.13, n.4, p.215-225, 2002.

SZCZESNIAK, A.S.; KAHN, E.L. Texture contrasts and combinations: a valued consumer attribute. **Journal of Texture Studies**, v.15, p. 285-301, 1984.

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.

TAMIME, A.Y.; SAARELA, M.; KORSLUND-SØNDERGAARD, A.; MISTRY, V.V.; SHAH, N.P. Production and maintenance of viability of probiotic micro-organisms in dairy products. In: TAMIME, A., ed. **Probiotic dairy products**: society of dairy technology. Oxford, Ames: Blackwell, 2005. cap.3, p.39-72.

TEN BRUGGENCATE, S.J.M.; BOVEE-OUDEHOFEN, I.M.J.; LETTINK-WISSINK, M.L.G.; KATAN, M.B.; VAN DER MEER, R. Dietary fructooligosaccharides affect intestinal barrier function in health men. **Journal of Nutrition**, v.136, n.1, p.70-74, 2006.

THARMARAJ, N.; SHAH, N.P. Survival of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium animalis* and *Propionibacterium* in cheese-based dips and the suitability of dips as effective carriers of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.14, n.12, p.1055-1066, 2004.

TOMÁS, M.S.J.; OCAÑA, V.S.; WIESE, B.; NADER-MACÍAS, M.E. Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Medical Microbiology**, v.52, n.12, p.1117-1124, 2003.

TRGO, G. Factors affecting texture of ice cream. In: MCKENNA, B.M. **Texture in food**. Boca Raton: CRC Press, 2003/2004. v.1, cap.15, p.373-388. (Woodhead Publishing in food science and technology).

TSEN, J.H.; LIN, Y.P.; KING, V.A.E. Fermentation of banana media by using κ -carrageenan immobilized *Lactobacillus acidophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.91, n.2, p.215-220, 2004.

UDABAGE, P.; AUGUSTIN, M.A.; CHENG, L.J.; WILLIAMS, R.P.W. Physical behaviour of dairy ingredients during ice cream processing. **Lait**, v.85, p.383-394, 2005.

UMBELINO, D.C.; CARDELLO, H.M.A.B.; ROSSI, E.A. Efeito de diferentes sais de ferro sobre as características de "iogurte" de soja. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.51, n.2, p.199-203, 2001.

VAN LOO, J.A. Prebiotics promote good health: the basis, the potential and the emerging evidence. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.38, suppl.6, p.70-75, 2004.

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

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

VINDEROLA, C.G.; GUEIMONDE, M.; DELGADO, T.; REINHEIMER, J.A.; REYES-GAVILÁN, C.G. Characteristics of carbonated fermented milk and survival of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.10, n.3, p.213-220, 2000.

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, n.4, p.271-275, 2000.

WAL, J.S.V.; MCBURNEY, M.I.; CHO, S.; DHURANDHAR, N.V. Ready-to-eat cereal products as meal replacements for weight loss. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.58, n.5, p.331-40, 2007.

WALSTRA, P.; GEURTS, T.J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; VAN BOEKEL, M.A.J.S. Cream products. In: _____. **Dairy technology: principles of milk properties and processes**. New York: Marcel Dekker, 1999. cap.15, p.405-424. (Food science and technology, 90).

WANG, Y.C.; YU, R.C.; YANG, H.Y.; CHOU, C.C. Sugar and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with bifidobacteria. **Food Microbiology**, v.20, n.3, p.333-338, 2003.

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

WANG, Y.C.; YU, R.C.; CHOU, C.C. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. **International Journal of Food Microbiology**, v.93, n.2, p.209-217, 2004b.

WASSENAAR, T.M.; KLEIN, G. Safety aspects and implications of regulation of probiotic bacteria in food and food supplements. **Journal of Food Protection**, v.71, n.8, p.1734-1741, 2008.

WEISBURGER, J.H. Eat to live, not live to eat. **Nutrition**, v.16, n.9, p.767-773, 2000.

WEIZMAN, Z.; ALSHEIKH, A. Safety and tolerance of a probiotic formula in early infancy comparing two probiotic agents: a pilot study. **Journal of the American College of Nutrition**, v.25, n.5, p.415-419, 2006.

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 Press, 2008. cap.2, p.13-38.

WELTY, W.M.; MARSHALL, R.T.; GRUN, I.U.; ELLERSIECK, M.R. Effects of milk fat, cocoa butter, or selected fat replacers on flavor volatiles of chocolate ice cream. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.1, p.21-30, 2001.

WILDT, S.; MUNCK, L.K.; VINTER-JENSEN, L.; HANSEN, B.F.; NORDGAARD-LASSEN, I.; CHRISTENSEN, S.; AVNSTROEM, S.; RASMUSSEN, S.N.; RUMESSEN, J.J. Probiotic treatment of collagenous colitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.12, n.5, p.395-401, 2006.

YAZICI, F.; AKGUN, A. Effect of some protein based fat replacers on physical, chemical, textural, and sensory properties of strained yoghurt. **Journal of Food Engineering**, v.62, n.3, p.245-254, 2004.

YILMAZTEKIN, M.; ÖZER, B.H.; ATASOY, F. Survival of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 in white-brined cheese. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.55, n.1, p.53-60, 2004.

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, n.1/2, p.171-175, 2006.

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, n.5/6, p.473-479, 1998.

ZOULIAS, E.I.; OREOPOULOU, V.; KOUNALAKI, E. Effect of fat and sugar replacement on cookie properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.82, n.14, p.1637-1644, 2002.

ANEXO I: Informações para os Membros das Bancas julgadoras de Mestrado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

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

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

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

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

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

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

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

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

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO II: Protocolo de Aprovação do Comitê de ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Ofício CEP nº 117/2006 / Protocolo CEP nº 387)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 117/2006

São Paulo, 26 de setembro de 2006.

Ilmo(a). Sr(a).

Juliana Bollerini Harami

Orientador: Profa. Susana Maria Isay Saad
FBT

Prezado(a) Senhor(a),

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 25 de setembro de 2006, **APROVOU** o projeto "Desenvolvimento de cereal em barra com gelado comestível simbiótico" (Protocolo CEP nº 387) apresentado por Vossa Senhoria.

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

Atenciosamente,

Prof. Dra. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética Pesquisa
FCF/USP