

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

Desenvolvimento de sorvete simbiótico de açaí (*Euterpe oleracea*) com *Lactobacillus rhamnosus* GG e resistência do probiótico em um modelo de digestão gastrintestinal *in vitro*

Mayra Garcia Maia Costa

Tese para obtenção de grau de

Doutor

Orientadora:

Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad

São Paulo

2014

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

Desenvolvimento de sorvete simbiótico de açaí (*Euterpe oleracea*) com *Lactobacillus rhamnosus* GG e resistência do probiótico em um modelo de digestão gastrintestinal *in vitro*

Mayra Garcia Maia Costa

Tese para obtenção de grau de

Doutor

Orientadora:

Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad

São Paulo

2014

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

Costa, Mayra Garcia Maia
C837d Desenvolvimento de sorvete simbiótico de açaí (*Euterpe oleracea*)
com *Lactobacillus rhamnosus* GG e resistência do probiótico em um
modelo de digestão gastrointestinal *in vitro* / Mayra Garcia Maia
Costa. -- São Paulo, 2014.
183p.

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

Orientador: Saad, Susana Marta Isay

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

664 CDD

MAYRA GARCIA MAIA COSTA

Desenvolvimento de sorvete simbiótico de açaí (*Euterpe oleracea*) com *Lactobacillus rhamnosus* GG e resistência do probiótico em um modelo de digestão gastrointestinal *in vitro*.

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do grau de Doutor

orientador/presidente

1° examinador

2° examinador

3° examinador

4° examinador

São Paulo, _____ de 2014.

*Dedico este trabalho a Deus, aos
meus pais Rubén (in memoriam) e
Sandra, ao meu noivo Marcelo,
com amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

Aos meus pais, que são anjos, um na terra e outro no céu.

Ao meu noivo, Marcelo, pelo amor, compreensão e companheirismo.

Ao meu irmão Márcio, por ser peça essencial para que esse trabalho tenha chegado ao fim.

As minhas irmãs e toda a minha família, que ficaram torcendo de longe.

À minha orientadora Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad, pelo aprendizado, suporte concedido para realização deste trabalho, compreensão e paciência durante esses anos do doutorado.

À Profa. Dra. Inar Castro, por ter me recebido sempre com muita paciência em sua sala e em seu laboratório.

À Marina Padilha, pela amizade e por dividir tantos momentos especiais e aprendizados.

Aos amigos Diogo e Natália, por dividirem comigo experiências, aprendizados e momentos de descontração.

As pós-doutorandas Marta e Raquel, por compartilharem não só o conhecimento técnico, como também conselhos para a vida.

Gostaria de agradecer a minha amiga Dona Lourdes, que foi uma mãe para mim nestes anos do doutorado, não conheço outra pessoa igual a esta, nunca serei grata o bastante.

Aos companheiros de laboratório, Graziela, Clara, Cristina, Douglas, Gabi, Stela, Carol, Felipe, Marina, Fernanda, Rafael Chacon.

À todos os funcionários do Departamento de Tecnologia Bioquímica Farmacêutica, Nilton, Ivani, Alexandre, Elza, Mírian, Tania, Juarez.

Às empresas Clariant, Duas Rodas, Alibra, Orafti, Agropalma, Arla Foods, pela doação de partes dos ingredientes utilizados neste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento pelo incentivo a pesquisa e bolsa concedida.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho

“Não vês que somos viajantes?”

E tu me perguntas:

Que é viajar?

Eu respondo com uma palavra: é avançar!

Experimentais isto em ti

Que nunca te satisfaça com aquilo que és

Para que sejas um dia aquilo que não és.

Avança sempre! Não fiques parado no caminho.”

Santo Agostinho

RESUMO

COSTA, M.G.M. **Desenvolvimento de sorvete simbiótico de açaí (*Euterpe oleracea*) com *Lactobacillus rhamnosus* GG e resistência do probiótico em um modelo de digestão gastrointestinal *in vitro***. 2014. 183p. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da adição de inulina (I – X_1), concentrado proteico de soro de leite (WC – X_2) e/ou isolado proteico de soro de leite (WI – X_3) em sorvete simbiótico de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) sobre a viabilidade do probiótico *L. rhamnosus* GG e a sua sobrevivência frente às condições encontradas no trato gastrointestinal simuladas *in vitro*, bem como sobre as características tecnológicas e a aceitabilidade sensorial dos produtos resultantes, ao longo de seu armazenamento a -18°C por até 112 dias. Adicionalmente, os sorvetes de açaí foram caracterizados quanto à sua composição centesimal, ácidos graxos insaturados e potencial antioxidante. Por último, objetivou-se a otimização do sorvete simbiótico de açaí a partir dos parâmetros de dureza instrumental e fração de derretimento. Para este fim, foi empregado um delineamento experimental para misturas simples (*centroid simplex*) incluindo um ponto axial, utilizando diferentes proporções dos fatores X_1 , X_2 e X_3 . No total, 9 formulações foram avaliadas por um período de até 112 dias de armazenamento congelado. As populações de *L. rhamnosus* GG permaneceram estáveis e entre 8 e 9 log ufc/g para todas as formulações e ao longo de todo o período de armazenamento. Entretanto, houve redução em, pelo menos, 5 ciclos logarítmicos da população do probiótico, após 6 horas de simulação gastrointestinal em todos os períodos estudados, com uma recuperação de *L. rhamnosus* GG próxima a 4 log ufc/g. Apenas ao 7º dia de armazenamento, a resistência *in vitro* do probiótico nas formulações contendo inulina, WC e WI superou em até 0,93 log ufc/g a formulação controle. A composição de ácidos graxos revelou que o ácido oleico esteve em maior quantidade nas formulações (teor médio 46,47%), seguido do ácido palmitoleico (teor médio 42,12%). Os sorvetes apresentaram atividade antioxidante na faixa de 302,03 a 505,41 $\mu\text{mol TE/g}$. A maior atividade antioxidante foi observada para a formulação controle, seguida das formulações WC (4% de WC) e WI (4% de WI). As formulações WC (4% WC) e WI (4% WI) apresentaram os maiores valores de dureza, revelando que os fatores WC e WI exerceram forte influência na dureza dos produtos ($p < 0,05$). As menores taxas de derretimento foram observadas nas formulações WI (4% de WI) e WC-WI (2% de WC; 2% de WI). Exceto para a formulação I-WC-WI ($p < 0,05$), a presença de inulina nas demais formulações não alterou de forma significativa a velocidade de derretimento quando comparada à amostra controle. As formulações I-WI (2% de inulina; 2% de WI) e I-WC-WI (1,33% de inulina; 1,33% WC; 1,33 WI), apresentaram os maiores valores de *overrun* (37,95% e 39,18%, respectivamente). Os escores de aceitabilidade sensorial variaram de 5,83 a 7,63. Apenas as formulações WI (4% WI) e WC-WI (2% WC; 2% WI) aumentaram seus escores médios de aceitabilidade durante os 84 dias de armazenamento ($p < 0,05$). De acordo com os modelos obtidos, WC foi o fator que mais contribuiu tanto para o aumento de dureza como para a velocidade de derretimento das formulações. A partir da otimização simultânea, considerando as respostas avaliadas (textura e fração de derretimento), é desejável que a formulação de sorvete simbiótico açaí seja produzida contendo 1,33% de inulina, 1,33% de WC e 1,33% de WI. Os resultados obtidos sugerem que a utilização dos três ingredientes (inulina, WC e WI) pode ser vantajosa no desenvolvimento de um sorvete probiótico de açaí, uma vez que a presença desses ingredientes contribuiu com o valor nutricional das formulações e também melhorou as características tecnológicas de *overrun*, derretimento e textura.

Palavras-chave: Sorvete, simbiótico, açaí, trato gastrointestinal, aspectos tecnológicos.

ABSTRACT

COSTA, M.G.M. **Development of synbiotic açai (*Euterpe oleracea* Mart.) ice cream with *Lactobacillus rhamnosus* GG and probiotic resistance in an *in vitro* digestion gastrointestinal model.** 2014. 183p. Tese (PhD of science) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The aimed of the present study was to evaluate the effect of inulin (I- X_1), whey protein concentrate (WC- X_2) and whey protein isolate (WI- X_3) addition on the viability and *in vitro* survival of *L. rhamnosus* GG through *in vitro* simulated gastrointestinal tract (GIT), technological properties and sensory acceptance of synbiotic açai ice cream. Additionally, açai ice cream were characterized for their chemical composition, unsaturated fatty acids and antioxidant activity. Finally, we aimed to optimized the synbiotic açai ice cream using parameters of hardness and melting rate. For this purpose, an experimental design was used for simple mixture (*simplex centroid*) including an axial point, using different proportions of X_1 , X_2 and X_3 , nine formulations of synbiotic açai ice cream were studied during frozen storage up to 112 days. A reduction of at least 5 log cycles of *L. rhamnosus* GG was observed in all formulations after 6 hours of the *in vitro* assays for all storage period evaluated. However, *L. rhamnosus* GG recovery was close to 4 log cfu/g for all formulations studied in evaluated periods. Nevertheless, on the 7th day of storage, the probiotic *in vitro* resistance in formulations supplemented with inulin, WC, and WI exceeded up to 0.93 log cfu/g the control formulation. The fatty acids composition showed that oleic acid was the highest fatty acid in synbiotic açai ice cream (mean content 46.47%), followed by palmitoleic acid (mean content 42.12%). The antioxidant activity of ice creams ranged from 302.03 to 505.41 $\mu\text{mol TE/g}$. Formulation C showed the highest antioxidant activity, followed by the formulations WC (WC 4%) and WI (WI 4%). Formulations WC (4% of WC) and WI (4% of WI) showed the highest hardness values, revealing that WC and WI exerted a strong influence on the product firmness. The lowest melting rate values were observed in formulation WI (4% of WI) and WC-WI (2% of WC, 2% of WI). However, the presence of inulin and WC showed strong influence on the melting rate of the ice creams, resulting in higher melting down of these products. I-WI and I-WC-WI formulations presented the highest *overrun* (37.95 and 39.18%, respectively). The sensory acceptability scores ranged from 5.83 to 7.63. WI and WC-WI formulations increased their mean acceptability scores significantly during 84 days of storage, whereas no significant differences were observed in acceptability throughout storage for the other formulations. According to the obtained models, WC was the factor that most contributed to increase both hardness and melting rate. From the simultaneous optimization, considering the responses evaluated (hardness and melting rate), it is desirable a synbiotic açai ice cream containing 1.33% of inulin, 1.33% of WC and 1.33% of WI. The results suggest that the use of the three ingredients (inulin, WC and WI) may be advantageous in the development of a synbiotic açai ice cream, since the presence of these ingredients contributed to the nutritional value of the formulations and also improved the technological characteristics of *overrun*, melting rate and texture.

Keywords: ice cream, synbiotic, açai, gastrointestinal tract, technological properties.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

Figura 1- Superfície de resposta para as possíveis misturas. **40**

Capítulo 2

Figura 1 - Representação espacial das formulações de sorvete de açaí no planejamento adotado. Os vértices correspondem aos componentes (I, WC, WI) puros, os lados às misturas binárias dos componentes, e os pontos do interior do triângulo, a mistura dos três componentes, e os pontos do interior do triângulo, a mistura dos três ingredientes. . **59**

Figura 2 - Sobrevivência de *L. rhamnosus* GG (log ufc/ g) nas formulações de sorvete de açaí, após 7, 28, 56, 84 e 112 dias (i, ii, iii, iv, v, respectivamente) antes (0 h) e durante exposição gástrica (2 h) e entéricas (4 h e 6 h) simuladas *in vitro*..... **74**

Figura 3 - Mudanças morfológicas de *L. rhamnosus* GG em cultura pura durante o ensaio das condições gastrintestinais simuladas *in vitro*. Ao longo do experimento, foram obtidas imagens do tempo zero (células não tratadas) (A); após 2 horas, fase gástrica (pH 2,3-2,6 na presença de pepsina e lipase) (B); após 4 horas, fase entérica I (pH 5,5-6,5 na presença de bile e pancreatina) (C); após 6 horas, fase entérica II (pH 6,5-7,5 na presença de bile e pancreatina) (D)..... **78**

Figura 4 - Mudanças morfológicas de *L. rhamnosus* GG incorporada em sorvete de açaí com 4% de inulina (formulação I) durante o ensaio das condições gastrintestinais simuladas *in vitro*. Ao longo do experimento, foram obtidas imagens do tempo zero (células não tratadas) (A); após 2 horas, fase gástrica (pH 2,3-2,6 na presença de pepsina e lipase) (B); após 4 horas, fase entérica I (pH 5,5-6,5 na presença de bile e pancreatina) (C); após 6 horas, fase entérica II (pH 6,5-7,5 na presença de bile e pancreatina) (D). **79**

Capítulo 3

Figura 1 - Representação espacial das formulações de sorvete de açaí no planejamento adotado. Os vértices correspondem aos componentes (I, WC, WI) puros, os lados às misturas binárias dos componentes e os pontos do interior do triângulo, a mistura dos três componentes..... **94**

Figura 2 - Atividade antioxidante total ($\mu\text{Mol TE/g}$) das formulações de sorvete de açaí.. **109**

Capítulo 4

Figura 1 - Representação espacial das formulações de sorvete de açaí no planejamento adotado. Os vértices correspondem aos componentes (I, WC, WI) puros, os lados às misturas binárias dos componentes e os pontos do interior do triângulo, a mistura dos três componentes..... **122**

Figura 2 - Comportamento das formulações de sorvete de açaí durante o teste de derretimento **135**

Figura 3 - Valores de *overrun* obtidos para as diferentes formulações de sorvetes açaí, após agitação e congelamento a -2° a -3°C em produtora para sorvete. **136**

Figura 4 - Aparência geral dos sorvetes de açaí servidos aos consumidores na análise sensorial..... **143**

Figura 5 - Frequência relativa das notas atribuídas às formulações de sorvete de açaí em cada período de armazenamento avaliado, 7°, 28°, 84° dias (i, ii, iii, respectivamente).**144**

Capítulo 5

Figura 1 - Representação espacial das formulações de sorvete de açaí no planejamento adotado. Os vértices correspondem aos componentes (I, WC, WI) puros, os lados às misturas binárias dos componentes e os pontos do interior do triângulo, a mistura dos três componentes.....**158**

Figura 2 - Diagrama triangular do comportamento de dureza das formulações de sorvete de açaí após 14 dias de armazenamento congelado. (X_1 =inulina, X_2 = WC e X_3 =WI)..... 165

Figura 3 - Diagrama triangular do comportamento de velocidade de derretimento das formulações de sorvete de açaí após 14 dias de armazenamento congelado. (X_1 =inulina, X_2 = WC e X_3 =WI).**167**

Figura 4 - Perfis para os valores preditivos e desejabilidade para as variáveis otimizadas e desejabilidade global.....**173**

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

- Tabela 1** - Delineamento experimental *centroid simplex* empregado na elaboração das formulações de sorvete de açaí estudadas. **60**
- Tabela 2** - Ingredientes fixos e variáveis e respectivas proporções, utilizados na produção das formulações de sorvete de açaí estudadas, de acordo com o planejamento experimental adotado e descrito na Tabela 1. **62**
- Tabela 3** - Valores de pH para as formulações de sorvete de açaí armazenados sob congelamento(-18± 3°C) por até 112 dias. Vide Tabela 1 para a descrição das formulações de sorvete de açaí..... **67**
- Tabela 4** - Viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* GG (log ufc/g) obtidas nas formulações de sorvete de açaí armazenadas sob congelamento (-18± 3°C) por até 112 dias. Vide Tabela 1 para a descrição das formulações. **69**
- Tabela 5** - Populações de *L. rhamnosus* GG, em cultura pura, frente às condições gastrintestinais simuladas *in vitro* **72**

Capítulo 3

- Tabela 1** - Delineamento experimental *centroid simplex* empregado na elaboração dos sorvetes de açaí estudados. **95**
- Tabela 2** - Ingredientes fixos e variáveis e respectivas proporções, utilizados na produção das formulações de sorvete de açaí estudadas, de acordo com o planejamento experimental adotado e descrito na Tabela 1. **98**
- Tabela 3** - Composição centesimal (%), teor de sólidos e valor energético (VET) em g/100g (média ± desvio-padrão) das formulações de sorvete de açaí estudados (vide Tabela 1 para a descrição das formulações). **105**
- Tabela 4** - Composição em nutrientes e valor energético total (VET) obtido para as porções* de 60g para cada formulação de sorvete de açaí estudada (vide Tabela 1 para a descrição das formulações). **106**
- Tabela 5** - Composição qualitativa de ácidos graxos presentes em 100g das formulações de sorvete de açaí (média ± desvio-padrão). Vide Tabela 1 para a descrição das formulações. **108**

Capítulo 4

- Tabela 1**- Delineamento experimental *centroid simplex* empregado na elaboração das formulações de sorvete de açaí estudadas. **123**
- Tabela 2** - Ingredientes fixos e variáveis e respectivas proporções, utilizados na produção das formulações de sorvete de açaí estudadas, de acordo com o planejamento experimental adotado e descrito na Tabela 1. **125**

Tabela 3 - Valores de dureza (N) e velocidade de derretimentos (ml/min) (média ± desvio padrão) obtidos para as formulações de sorvete de açaí aos 14 dias de armazenamento sob congelamento (-18±3°C). Vide Tabela 1 para a descrição das formulações.	130
Tabela 4 - Aceitabilidade sensorial obtida para as formulações de sorvete de açaí armazenadas por até 84 dias sob congelamento (-18±3°C). Vide Tabela 1 para a descrição das formulações.....	140
Tabela 5 - Número de citações dos atributos sensoriais (sabor, textura e cor) mencionados pelos consumidores como mais apreciados e menos apreciados, nos três períodos de análises sensoriais realizadas com as formulações de sorvete de açaí.	142

Capítulo 5

Tabela 1 - Delineamento experimental <i>centroid simplex</i> empregado na elaboração dos sorvetes de açaí estudados.....	159
Tabela 2 - Ingredientes fixos e respectivas proporções, utilizados na produção das formulações de sorvete de açaí e teor de sólidos dos diferentes produtos obtidos.	161
Tabela 3 - Coeficientes calculados por regressão múltipla e respectivos erros-padrão e intervalo de confiança (IC) de 95% obtidos para o modelo linear a partir do resultado de dureza das formulações de sorvete de açaí (X ₁ = inulina, X ₂ =WC e X ₃ =WI).	164
Tabela 4 - Análise de variância obtida para o modelo cúbico especial a partir do resultado de dureza das formulações de sorvete de açaí aos 14 dias de armazenamento congelado (-18±3°C).....	164
Tabela 5 - Coeficientes calculados por regressão múltipla e respectivos erros-padrão e intervalo de confiança (IC) de 95% obtidos para o modelo quadrático a partir do resultado de velocidade de derretimento das formulações de sorvete de açaí (X ₁ = inulina, X ₂ =WC e X ₃ =WI)	166
Tabela 6 - Análise de variância obtida para o modelo quadrático a partir do resultado de velocidade de derretimento das formulações de sorvete de açaí aos 14 dias de armazenamento congelado (-18±3°C).....	166
Tabela 7 - Comparação entre os valores estimados pelos modelos e os valores medidos experimentalmente no ensaio de validação.....	170
Tabela 8 - Valores atribuídos no procedimento de otimização matemática realizado, empregando o programa Statistica (Statsoft).	171

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

EPS – exopolissacarídeo

FAO – Food and agriculture Organization of the United Nations

FOS – Fruto-oligossacarídeos

IDF – International Dairy Federation

LDL – lipoproteína de baixa densidade

Lr GG – *Lactobacillus rhamnosus* GG

MRS – Man, Rogosa e Sharpe

ORAC – oxygen radical absorbance capacity

pH – potencial hidrogeniônico

POLI-P – Polifosfatos inorgânicos

TGI – trato gastrointestinal

VET – valor energético total

WC – concentrado proteico de soro de leite

WHO – World Health Organization

WI – isolado proteico de soro de leite

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	18
Capítulo 1	20
REVISÃO DE LITERATURA	21
1 O intestino como alvo para alimentos funcionais	21
2 Probióticos em alimentos	23
2.1 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	26
3 Inulina – prebiótico com benefícios à saúde e aplicações tecnológicas	28
4 Alimento simbiótico	30
5 Açaí	31
6 Proteínas concentradas de soro de leite	33
7 O sorvete como alimento simbiótico	35
8 Metodologia de superfície de resposta e delineamento experimental do tipo <i>centroid simplex</i>	39
9 Referências bibliográficas	42
Capítulo 2	53
Efeito de inulina e proteínas do soro de leite na sobrevivência do probiótico <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG em sorvete simbiótico de açaí submetido a condições gastrintestinais simuladas <i>in vitro</i>	54
RESUMO	54
1 INTRODUÇÃO	56
2 MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1 Delineamento experimental	58
2.2 Obtenção do micro-organismo e preparo da cultura estoque	60
2.3 Fabricação do sorvete de açaí	61
2.4 Determinação do pH e viabilidade do probiótico <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	63
2.5 Avaliação <i>in vitro</i> da resistência da cultura pura do probiótico <i>L. rhamnosus</i> GG às condições gástrica e entérica simuladas e durante a vida de prateleira dos sorvetes mantidos sob congelamento.	63
2.6 Microscopia eletrônica de varredura	64
2.7 Análise Estatística	65
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
3.1 Valores de pH e viabilidade do probiótico	66

3. 2 Sobrevivência de <i>L. rhamnosus</i> GG frente às condições gastrintestinais simuladas <i>in vitro</i>	71
3.3 Microscopia eletrônica de varredura das fases do ensaio das condições gastrintestinais simuladas <i>in vitro</i> de <i>L. rhamnosus</i> GG em cultura pura e incorporada em sorvete de açaí.	78
4 CONCLUSÃO	82
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
Capítulo 3	89
Caracterização química e potencial antioxidante de sorvete simbiótico de açaí (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.)	90
RESUMO	90
1 INTRODUÇÃO	92
2 MATERIAL E MÉTODOS	94
2.1 Delineamento experimental	94
2.2 Obtenção do micro-organismo e preparo da cultura estoque	96
2.3 Fabricação do sorvete de açaí	97
2.4 Determinação da composição centesimal do produto desenvolvido	99
2.5 Composição de ácidos graxos	100
2.6 Atividade Antioxidante (método – ORAC)	101
2.7 Análise estatística	102
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	103
3.1 Composição centesimal e valor energético dos sorvetes	103
3.2 Composição de ácidos graxos	107
3.3 Atividade antioxidante total	109
4 CONCLUSÃO	112
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
Capítulo 4	117
Inulina e proteínas de soro de leite melhoram os aspectos tecnológicos de sorvete simbiótico de açaí (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.)	118
RESUMO	118
1 INTRODUÇÃO	120
2 MATERIAL E MÉTODOS	122
2.1 Delineamento experimental	122
2.2 Obtenção do micro-organismo e preparo da cultura estoque	123

2.3	Fabricação do sorvete de açaí	124
2.4	Determinação da dureza instrumental	126
2.5	Fração de derretimento	126
2.6	<i>Overrun</i> – Incorporação de ar	127
2.7	Determinação das contagens populacionais dos micro-organismos indicadores	127
2.8	Avaliação sensorial	128
2.9	Análise estatística	129
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	130
3.1	Dureza instrumental e velocidade de derretimento	130
3.2	<i>Overrun</i> – Incorporação de ar	136
3.3	Parâmetros microbiológicos sanitários	139
3.4	Aceitação sensorial dos sorvetes	139
4	CONCLUSÃO	147
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148
Capítulo 5		153
	Obtenção de modelos de regressão, validação e otimização dos parâmetros de textura e derretimento de sorvete simbiótico de açaí, contendo inulina e proteínas do soro de leite	154
	RESUMO	154
1	INTRODUÇÃO	156
2	MATERIAL E MÉTODOS	158
2.1	Delineamento experimental	158
2.2	Obtenção do micro-organismo e preparo da cultura estoque	159
2.3	Fabricação do sorvete de açaí	160
2.4	Avaliação do parâmetro de dureza a partir da análise de textura instrumental	162
2.5	Fração de derretimento	162
2.6	Análise estatística	163
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	163
3.1	Obtenção dos modelos de regressão	163
3.2	Validação dos modelos com o ponto axial	170
3.3	Otimização empregando o <i>Software Statistica</i>	171
4	CONCLUSÃO	174
5	RERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	175
	CONCLUSÃO GERAL	178

APRESENTAÇÃO

O consumo de alimentos que trazem benefícios à saúde cresce mundialmente, face ao maior esclarecimento da população em relação ao impacto direto da dieta com bem estar físico. Uma alimentação saudável deve compreender o consumo de alimentos que supram as necessidades nutricionais básicas, bem como demonstrem a capacidade de regular as funções fisiológicas de forma a auxiliar na prevenção de doenças. Os alimentos probióticos e prebióticos atendem a essas necessidades, uma vez que, quando administrados como parte de uma dieta usual, conferem benefícios à saúde.

Atualmente, as pesquisas com alimentos probióticos e prebióticos buscam alternativas de inovação que atendam as exigências do consumidor em relação aos produtos tradicionais. O sorvete é uma sobremesa de fácil aceitação e possui atributos sensoriais que são atraentes ao consumidor. No mercado brasileiro houve crescimento de 81,6% em termos de consumo no ano de 2013 (ABIS, 2013), estes dados são promissores e demonstram o potencial dessa matriz como veículo de micro-organismos probióticos e fibras prebióticas. Além do aspecto de mercado, a forma de armazenamento congelado favorece a preservação das características funcionais (viabilidade das culturas probióticas) por um tempo mais prolongado (CRUZ et al., 2009; SOUKOULIS et al., 2014).

A incorporação de frutas a sobremesas congeladas, como o sorvete, constitui uma alternativa de melhora do seu conteúdo nutricional. Nesse contexto, o açaí (*Euterpe oleracea*) merece destaque, devido a sua composição, que inclui fibras, ácidos graxos insaturados, minerais e compostos fenólicos (YUYAMA et al., 2012). O desenvolvimento de um sorvete simbiótico de açaí pode oferecer os benefícios combinados dos probióticos, prebióticos, nutrientes e antioxidantes da fruta em um só alimento.

Outros ingredientes que podem agregar valor nutricional aos alimentos são os concentrados e isolados proteicos de soro de leite. Esses ingredientes são utilizados com sucesso no desenvolvimento de alimentos com teor reduzido de calorias, por atuarem como substitutos de gordura, e por apresentarem a vantagem de aumento do conteúdo proteico (AKALIN et al., 2008; MAHDIAN e KARAZHIAN, 2013).

Dessa forma, a combinação de probióticos, prebióticos e proteínas do soro de leite em um sorvete de açaí representa uma excelente alternativa a sorvetes tradicionais, com a vantagem de oferecer múltiplos benefícios à saúde do consumidor.

O presente trabalho será apresentado na forma de artigos divididos nos seguintes capítulos:

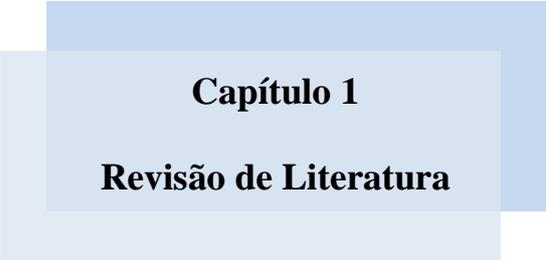
Capítulo 1: Apresenta o embasamento bibliográfico abordando os principais temas envolvidos no trabalho.

Capítulo 2: “Efeito de inulina e proteínas do soro de leite na sobrevivência do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG em sorvete simbiótico de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) submetido a condições gastrintestinais simuladas *in vitro*” – Esta seção teve como objetivo avaliar o efeito dos ingredientes inulina, concentrado (WC) e isolado proteico (WI) de soro de leite sobre a viabilidade e a resistência *in vitro* do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG adicionado a sorvetes de açaí.

Capítulo 3: “Caracterização química e potencial antioxidante de sorvete simbiótico de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)” – Esta seção teve como objetivo caracterizar a composição química e investigar o potencial antioxidante de sorvete simbiótico de açaí suplementado de inulina, concentrado proteico (WC) e isolado proteico (WI) de soro de leite.

Capítulo 4: “Inulina e proteínas de soro de leite melhoram os aspectos tecnológicos de sorvete simbiótico de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)” – Esta seção teve como objetivo investigar a influência dos fatores inulina, concentrado proteico (WC) e isolado proteico de soro de leite (WI) sobre as características tecnológicas e sensoriais de sorvete de açaí suplementado com a cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG e o ingrediente prebiótico fruto-oligossacarídeo (FOS) durante o armazenamento dos sorvetes a -18 °C por até 84 dias.

Capítulo 5: “Obtenção de modelos de regressão, validação e otimização da textura e derretimento de sorvete simbiótico de açaí contendo inulina e proteínas do soro de leite” – Esta seção teve como objetivo otimizar a proporção dos fatores inulina (I), concentrado proteico (WC) e isolado proteico (WI) de soro a serem adicionados em sorvete simbiótico de açaí produzido com o probiótico *L. rhamnosus* GG e o prebiótico fruto-oligossacarídeo (FOS), no sentido de obter uma menor dureza instrumental e, simultaneamente, uma menor fração de derretimento de sorvete de açaí.



Capítulo 1
Revisão de Literatura

REVISÃO DE LITERATURA

1 O intestino como alvo para alimentos funcionais

Os hábitos alimentares e a tendência mundial na produção e consumo de alimentos apresentam um impacto direto na saúde humana. O papel da alimentação na manutenção da saúde, bem-estar e prevenção de doenças continua a receber um crescente interesse científico e comercial, o que vem reforçando o conceito de alimentos funcionais. Em linhas gerais, os alimentos funcionais podem ser definidos como alimentos que fornecem benefícios à saúde além de seus benefícios nutricionais (SHORT et al., 2004; RAMCHANDRAN e SHAH, 2010).

O Japão foi o primeiro país a introduzir o termo “alimentos funcionais” na década de 1980, como resultado de um projeto nacional intitulado “Análise Sistemática e Desenvolvimento da Alimentação”, que estabelecia as relações entre nutrição, satisfação sensorial e modulação de sistemas fisiológicos. Os estudos impulsionados por esse projeto visavam definir quais os produtos alimentícios fortificados com constituintes especiais possuíam efeitos fisiológicos vantajosos à saúde. Adicionalmente, esses estudos tinham como objetivo a prevenção de doenças em adultos e idosos através de uma dieta saudável e a redução de gastos com a saúde pública (KWAK e JUKES, 2001; ARAI et al., 2002; SIRÓ et al., 2008; SHIMIZU e HACHIMURA, 2011).

No cenário atual, alimentos funcionais são aqueles que oferecem benefícios à saúde além da nutrição básica, são similares aos alimentos convencionais e podem ser consumidos como parte de uma dieta usual, proporcionando benefícios fisiológicos e /ou a redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis (SIRÓ et al., 2008). Inicialmente, o foco no desenvolvimento de alimentos funcionais se voltava para alimentos fortificados com vitaminas, minerais, ácidos graxos essenciais, fitosteróis, fibras solúveis, entre outros. No entanto, nos últimos anos, tem havido uma tendência para o desenvolvimento de alimentos funcionais que ofereçam vários benefícios à saúde em um único produto, os chamados alimentos multifuncionais (BIGLIARDI e GALATI, 2013).

Atualmente, diversas pesquisas têm sido voltadas para a relação existente entre a dieta e os eventos metabólicos que ocorrem no intestino como causa de um impacto direto na

saúde dos indivíduos (NICHOLSON et al., 2012; COLLINS et al., 2012). Dessa forma, o intestino pode ser considerado um importante alvo para alimentos funcionais e tem motivado a produção, em países como o Japão e países europeus, de alimentos que promovam a saúde intestinal (SIRÓ et al., 2008). Nesse contexto, destacam-se os alimentos probióticos, considerados uma classe de alimentos funcionais que regulam o equilíbrio da função intestinal do indivíduo (SAAD et al., 2006).

O intestino é o maior órgão que estabelece uma interface com o ambiente externo e é também uma barreira dinâmica que abriga uma complexa comunidade microbiana (SENGUPTA et al., 2013). Estima-se que o intestino de um indivíduo adulto contenha aproximadamente 10^{14} micro-organismos (10 vezes mais células do que todo o corpo humano). As bactérias são certamente os micro-organismos mais representativos estando presentes entre 500 a 1000 espécies, com a maioria pertencente aos filos Firmicutes e Bacteroidetes (GÉRARD et al., 2014). Este conjunto heterogêneo de micro-organismos é chamado de microbiota intestinal e atua como um órgão que exerce ações metabólicas, imunológicas e endócrinas que influenciam a saúde humana (GÉRARD et al., 2014; CAMMAROTA et al., 2014).

Algumas patologias como obesidade, diabetes, aterosclerose, doenças inflamatórias intestinais e enterocolite necrozante estão associadas com alterações na composição da microbiota intestinal (MARQUES et al., 2014). Estudos associam a microbiota intestinal ao estado inflamatório que ocorre em indivíduos obesos (RODRIGUES et al., 2011; TREMAROLI e BACKHED, 2012). Outros estudos relacionam a função e o comportamento cerebral com a microbiota intestinal, tendo em vista que desordens psiquiátricas podem coexistir com disfunções gastrointestinais (BRAVO et al., 2011; COLLINS et al., 2012). No entanto, mais estudos são necessários para se entender a relação entre a microbiota intestinal com outros sítios alvo do hospedeiro.

A microbiota intestinal desenvolve uma série de funções de proteção imunológica e metabólica, atuando diretamente no estado nutricional e na saúde do indivíduo. A microbiota residente e a transitória (associada, por exemplo, ao consumo de alimentos probióticos) influenciam o desenvolvimento e a regulação dos sistemas de defesa do indivíduo através da interação com o epitélio intestinal (LAPARRA e SANZ et al., 2010). Alterações na composição microbiana do intestino têm sido associadas com desenvolvimento de doenças alérgicas, como rinite e eczema atópico (HORMANNSPERGER et al., 2012). Outros tipos de

alergias, como alergia ao leite, também podem estar relacionadas com alterações da microbiota intestinal (GIGANTE et al., 2011). De acordo com CANANI e Di CONSTANZO et al. (2013), evidências sugerem a utilização de micro-organismos probióticos na prevenção ou tratamento de alergias ao leite.

Uma das possibilidades de restauração e manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal é através do consumo de alimentos contendo micro-organismos probióticos e fibras prebióticas. A influência benéfica dos probióticos na saúde do intestino inclui fatores como, produção de compostos antimicrobianos, competição com micro-organismos patogênicos por sítios de adesão e nutrientes e modulação do sistema imunológico (SAAD et al., 2006). Já os prebióticos auxiliam no estímulo da multiplicação, colonização e sobrevivência dos probióticos no intestino, uma vez que são fermentados seletivamente por estes micro-organismos (ROBERFROID et al., 2007).

O trato gastrintestinal é habitado por uma complexa comunidade de micro-organismos que desenvolve mecanismos para regular a absorção e a utilização de nutrientes em simbiose com o indivíduo e em resposta à dieta. A atividade bioquímica desse ecossistema microbiano gera compostos benéficos, assim como prejudiciais, a partir dos alimentos ingeridos através da dieta. O equilíbrio dos metabólitos gerados é essencial para a manutenção da saúde e a inclusão da administração de bactérias probióticas através da dieta pode ser uma estratégia para se atingir este equilíbrio (LAPARRA e SANZ et al., 2010).

Nesse contexto, o desenvolvimento de alimentos probióticos e/ou prebióticos que aliem benefícios à saúde e atrativos sensoriais têm recebido um grande destaque nos últimos anos, uma vez que essa classe de alimentos funcionais pode auxiliar na redução do risco de diversas doenças, bem como na melhoria da qualidade de vida do consumidor.

2 Probióticos em alimentos

A palavra “probióticos” foi inicialmente usada como antônimo da palavra “antibiótico”. É derivada da palavra pró e bioto que querem dizer “para a vida” (HAMILTON et al., 2003).

No início da década de 1950, pesquisas já abordavam o uso de probióticos no emprego da restauração da saúde de indivíduos desnutridos (KOLLATH, 1953). VERGIN (1954) sugeriu que a administração de probióticos poderia restaurar o equilíbrio da microbiota intestinal após um tratamento com antibióticos. O mesmo ponto de vista foi defendido por KOLB (1955), que reconheceu os efeitos prejudiciais de uma terapia com antibióticos e propôs uma prevenção com probióticos. Em 1965, LILLY e STILLWELL definiram probióticos como “substâncias secretadas por um micro-organismo que estimula o crescimento de outro”. Similar a esta abordagem, SPERTI (1971) e FUJII e COOK (1973) descreveram probióticos como compostos que estimulavam o crescimento microbiano ou melhoravam a resposta imune do hospedeiro.

A definição de PARKER (1974) assemelha-se a descrições atuais, pois foi o primeiro pesquisador a utilizar o termo probiótico como “organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal”. Entretanto, em 1992, Fuller ampliou a definição de probióticos, enfatizando a exigência da viabilidade do micro-organismo, e sugeriu que probióticos fossem descritos como “suplemento alimentar de micro-organismos vivos, que afetam benéficamente o hospedeiro, melhorando o equilíbrio microbiano intestinal”.

A definição atualmente aceita é da FAO/WHO (2002) que define probióticos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro.

Comercialmente, as bactérias mais frequentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos pertencem ao gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, ressaltando-se que a seleção dessas bactérias possui como base os seguintes critérios: a espécie a qual pertence a bactéria deve ser de origem humana; a capacidade de aderir à mucosa do intestino, colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrointestinal humano; produzir compostos antimicrobianos; ser metabolicamente ativas no intestino (KOLIDA e GIBSON, 2011). Entre os requisitos, incluem-se, ainda, a segurança para uso humano, ter histórico de não patogenicidade e não deve estar associada a outras doenças, além de não apresentarem genes determinantes de resistência a antibióticos (COLLINS et al., 1998; LEE et al., 1999; SAARELA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2002; VASILJEVIC e SHAH, 2008).

A fim de exercer suas propriedades funcionais, os probióticos devem alcançar as diferentes partes do TGI de forma ativa e viável. Para tanto, é de extrema importância que

esses micro-organismos também estejam viáveis e ativos no veículo de liberação escolhido para que se possa obter os benefícios à saúde. Ainda não há um consenso sobre a concentração mínima de ingestão de probióticos para se atingir os efeitos benéficos no hospedeiro (ALEGRE et al., 2011). Os resultados de estudos dose-reposta ainda são conflitantes, mas geralmente os ensaios clínicos utilizam a dose do micro-organismo na faixa de 10^8 - 10^{10} ufc/dia (SZAJEWSKA et al., 2011). Além da viabilidade celular no alimento, até o momento da ingestão pelo consumidor, o probiótico deve ser capaz de atingir o intestino delgado metabolicamente ativo. Alguns estudos demonstram que a matriz alimentar afeta tanto a estabilidade do micro-organismo ao longo da vida de prateleira, como a sobrevivência do probiótico no ambiente gástrico (SAARELA et al., 2011). Em vista disso, enfatiza-se a importância não somente dos critérios funcionais, bem como de aspectos tecnológicos das culturas probióticas (VASILJEVIC e SHAH, 2008). No Brasil a legislação estabelece que a quantidade mínima de bactérias probióticas viáveis no alimento deve estar entre 10^8 a 10^9 ufc na recomendação diária do produto pronto para o consumo (ANVISA, 2008).

O principal apelo para a utilização de culturas bacterianas probióticas é o fato de esses micro-organismos estimularem a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais do hospedeiro (PUUPPEN-PIMIA et al., 2002; SAAD, 2006). Entretanto, inúmeros outros efeitos benéficos são atribuídos aos probióticos, dentre eles: promoção da resistência gastrintestinal à colonização por patógenos; controle do equilíbrio da microbiota intestinal; estabilização desta microbiota após tratamento com antibióticos; produção de compostos antimicrobianos como o ácido lático e acético e de bacteriocinas, dentre outros; melhora da digestão da lactose em indivíduos intolerantes a esse carboidrato; aumento da absorção de vitaminas e minerais; produção de vitaminas; alívio da constipação; redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori*; estimulação do sistema imunológico; redução dos níveis séricos de colesterol; redução do risco de câncer de cólon (SHAH e LANKAPUTHRA, 1997; CHARTERIS et al., 1998; JELEN e LUTZ, 1998; KLAENHMMER, 2001; TUOHY et al., 2003; SULLIVAN e NORD, 2005; MINOCHA, 2009; SAAD et al., 2011).

Os benefícios à saúde citados parecem ser específicos a determinadas cepas. Portanto, não há nenhum micro-organismo que forneça todos os benefícios propostos. Ainda, a capacidade de uma bactéria probiótica sobreviver à passagem através do estômago e intestino pode ser variável e dependente da cepa (VINDEROLA et al., 2003).

Evidências indicam que as propriedades funcionais desempenhadas pelos probióticos podem ser influenciadas fortemente pela maneira como estes micro-organismos são administrados (SANDERS e MARCO, 2010). Algumas características dos alimentos, como o pH, bem como sua capacidade tamponante podem auxiliar os probióticos na passagem pelo estômago, no qual o pH gástrico pode exercer efeito deletério para estes micro-organismos. Os alimentos também fornecem proteção física para os micro-organismos probióticos, minimizando os efeitos da exposição ao ambiente gastrintestinal (BEDANI et al., 2013). A interação de certos componentes alimentares com os probióticos também pode beneficiar o seu desempenho funcional (RANADHEERA et al., 2012). TOMPKINS et al. (2011) concluíram que a administração de probióticos juntamente com alimentos ou bebidas com pelo menos 1% de gordura assegura uma alta sobrevivência de micro-organismos probióticos viáveis no intestino delgado. Alguns estudos relatam que a presença de uma matriz alimentar, como por exemplo, queijo e iogurte, parece influenciar favoravelmente a sobrevivência de probióticos ao longo do trânsito gastrintestinal (MADUREIRA et al., 2005; GUO et al., 2009; MADUREIRA et al., 2011; BEDANI et al., 2014). Portanto a escolha adequada do alimento que irá veicular os probióticos pode ser um dos meios eficazes para maximizar os benefícios atribuídos a esses micro-organismos no organismo humano.

2.1 *Lactobacillus rhamnosus* GG

Lactobacillus rhamnosus GG (LGG) é uma cepa comprovadamente probiótica isolada a partir de fezes de um indivíduo saudável. Inicialmente, a capacidade de adesão à mucosa intestinal e a resistência ao ácido biliar foram os critérios que selecionaram esta cepa como um potencial micro-organismo probiótico (SILVA et al., 1987; GOLDIN et al., 1992). Segundo a Autoridade Europeia para a Segurança de Alimentos (EFSA) (2011), *L. rhamnosus* GG possui o apelo funcional de modular as defesas do hospedeiro contra patógenos intestinais. Esta alegação de saúde refere-se à defesa contra agentes patogênicos na população em geral.

Em alguns países europeus como a Finlândia, *L. rhamnosus* GG tem sido largamente consumido desde 1990, através de produtos lácteos fermentados ou na forma de cápsula (SAXELIN et al., 1993; TYNKKYNEN et al., 1998). Resultados mostram que *L. rhamnosus* GG sobrevive à passagem pelo trato gastrintestinal e consegue permanecer por alguns dias na

microbiota do intestino, sem que haja uma nova suplementação oral, o que parece ser uma característica importante na prevenção de certas doenças intestinais (GOLDIN et al., 1992; KUMPU et al., 2013).

O consumo de *L. rhamnosus* GG tem demonstrado ser eficaz na redução do risco de infecções intestinais e na diminuição da duração da diarreia (SZAJEWSKA et al., 2007) e no alívio dos sintomas e redução do risco de dermatite atópica (RAUTAVA et al., 2002). Em uma recente meta-análise (SZAJEWSKA et al., 2013) avaliou-se o potencial de LGG no tratamento de diarreia aguda em crianças. O estudo incluiu 11 ensaios clínicos que envolveram 2963 participantes. O probiótico LGG demonstrou eficácia na redução da duração de diarreia quando utilizado em uma dose diária acima de 10^{10} ufc.

A partir de um estudo de meta-análise conduzido por PASSARIELLO et al. (2014), que buscou informações sobre a eficácia dos probióticos no tratamento de diarreia infecciosa em indivíduos de todas as idades, foi possível constatar que *L. rhamnosus* GG é um dos probióticos mais estudados neste cenário, uma vez que seu consumo relaciona-se com redução da duração de diarreia e da frequência de evacuações. *L. rhamnosus* GG possui a capacidade de desenvolver a microbiota intestinal benéfica e especula-se que isto seja devido ao sistema “*quorum sensing*”. A presença de pili é outra característica que permite a adesão desse micro-organismo à mucosa intestinal e promove o deslocamento dos patógenos e a estimulação do sistema imunológico (BAJAJ et al., 2014).

L. rhamnosus GG tem sido utilizado com sucesso no desenvolvimento de novos produtos probióticos. ALAMPRESE et al. (2005) estudaram a sobrevivência de *L. rhamnosus* GG em sorvete não fermentado. Os autores concluíram que a fabricação de sorvetes probióticos pode ser uma alternativa interessante para o consumo desse micro-organismo por adultos e crianças que não apreciam alimentos fermentados. Maçãs minimamente processadas também apresentaram êxito como matriz carreadora de *L. rhamnosus* GG, uma vez que este micro-organismo probiótico foi capaz de sobreviver por 28 dias em concentrações acima de 10^6 ufc/g (ALEGRE et al., 2011). KLU et al. (2012) também observaram uma alta sobrevivência de *L. rhamnosus* GG em manteiga de amendoim com teor de gordura reduzido. Esses pesquisadores verificaram que produtos mantidos refrigerados (4°C) e a temperatura ambiente (25°C) mantiveram populações de LGG de no mínimo 10^6 ufc/g de produto final.

3 Inulina – prebiótico com benefícios à saúde e aplicações tecnológicas

O uso de prebióticos como ingredientes funcionais em alimentos destaca-se pelo efeito que estes possuem em modular a microbiota intestinal. Prebióticos são definidos como “componentes alimentares que são fermentados seletivamente e permitem alterações específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo benefícios à saúde do hospedeiro” (GIBSON e ROBERFROID, 2008).

A inulina é um carboidrato do grupo de polissacarídeos chamados frutanos. Os frutanos representam uma categoria de compostos que abrangem todos os oligo- e polissacarídeos de origem vegetal, no qual uma ou mais ligações frutossil-frutose constituem a maioria das ligações glicosídicas. Portanto, de uma forma genérica, são polímeros de frutose (MEYER et al., 2011; SAAD et al., 2011). Ocorrem naturalmente em uma variedade de plantas, tais como chicória, cebola, alho, alcachofra, aspargo, banana, entre outros. A inulina nativa, que pode ser encontrada em abundância na raiz de chicória, possui grau de polimerização que varia de 2 a 60 unidades de monossacarídeos, com média de 10 monossacarídeos. O produto de sua hidrólise parcial é chamado de oligofrutose e possui grau de polimerização variando de 2 a 8 monossacarídeos. A inulina de cadeia longa possui grau de polimerização médio de 23 monossacarídeos e é originada da inulina nativa através de técnicas específicas de separação (GIBSON e ROBERFROID et al., 2008; MEYER et al., 2011).

Além da característica de resistência à acidez gástrica, à hidrólise por enzimas de mamíferos e à absorção gastrointestinal (GIBSON e ROBERFROID, 2008), a ação prebiótica de frutanos do tipo inulina é confirmada através de vários estudos (GOETZE et al., 2008; THOMAS et al., 2010). A ação prebiótica pode ser caracterizada pelo fato desses polímeros de frutose possuírem fermentação colônica específica voltada para bifidobactérias. As bifidobactérias são capazes de metabolizar a inulina como resultado da ação da enzima β -frutofuranosidase e esta propriedade ocorre como uma vantagem competitiva das bifidobactérias no heterogêneo ambiente que se apresenta a microbiota intestinal (KOLIDA e GIBSON, 2007). De acordo com KOLIDA et al. (2007), o consumo de 5 a 8 g/dia de inulina conferiu efeito bifidogênico em indivíduos adultos saudáveis, evitando-se efeitos colaterais indesejados como flatulência e diarreia.

Os efeitos na saúde atribuídos aos prebióticos estão relacionados à estimulação do metabolismo (fermentação e produtos finais) da microbiota intestinal benéfica. Os resultados de algumas pesquisas sugerem que o consumo de inulina pode contribuir para a redução dos níveis de triglicérides e LDL-colesterol sérico, alívio de constipação, diminuição de doenças gastrintestinais e aumento da absorção de cálcio (LARKIN et al., 2009; DE PRETER et al., 2010; ROBERFROID et al., 2010; PACHIKIAN et al., 2013). Como resultado da fermentação colônica dos prebióticos, há a produção de ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) e outros ácidos orgânicos (como o lactato), acompanhado pela redução do pH do lúmen intestinal, o que favorece a solubilidade e a difusão do cálcio através da mucosa. Alguns ácidos graxos de cadeia curta, como o ácido propiônico, podem inibir a síntese de colesterol hepático e/ou proporcionar a redistribuição do colesterol do plasma para o fígado (AL-SHERAJI et al., 2012). Além de serem fonte de energia para as células do intestino, os ácidos graxos de cadeia curta desempenham efeitos importantes na fisiologia do intestino, uma vez que o butirato, principal fonte de energia para as células do epitélio do cólon (colonócitos), exerce efeito positivo sobre a diferenciação e proliferação celular (ROBERFROID et al., 2010; CAPRILES e ARÊAS, 2012).

Além de estimular o equilíbrio da microbiota benéfica do intestino, a inulina desempenha propriedades tecnológicas importantes nos alimentos, podendo ser utilizada como substituto de gordura e de açúcar, agente espessante, emulsificante e gelificante (MEYER et al., 2011). Quando em solução, a inulina forma um gel de estabilidade física, devido a sua capacidade de aprisionar água. O gel formado é constituído por partículas cristalinas de inulina que são insolúveis em água e resultam em uma estrutura cremosa. Devido a essa característica a inulina tem sido utilizada com sucesso na substituição da gordura em alimentos como sorvetes, iogurtes, molhos e recheios (NAIR et al., 2010).

As aplicações tecnológicas diferenciam-se pelo grau de polimerização da cadeia de inulina. A fração de cadeia curta, a oligofrutose, é mais solúvel e mais doce do que a inulina de cadeia longa, e contribui para melhora do sabor do alimento. Por sua vez, a inulina de cadeia longa é menos solúvel e mais viscosa e pode agir principalmente como modificador de textura (MEYER et al., 2011). A alta solubilidade das frações de inulina, quando comparada a outras fibras clássicas, torna a aplicação desses prebióticos relevante no desenvolvimento de produtos alimentícios mais saudáveis, com características similares a produtos convencionais.

AKALIN e ERISIR (2008) estudaram o efeito da incorporação de inulina e oligofrutose sobre as características reológicas de sorvete de baixo conteúdo de gordura. As amostras de sorvete contendo 4% de inulina ou 4% oligofrutose apresentaram maior firmeza e viscosidade quando comparados à amostra controle (sem inulina e sem oligofrutose). Com base nos resultados obtidos nesse estudo, os autores concluíram que o produto com melhores características de textura (firmeza e propriedade de derretimento) foi aquele adicionado de 4% de inulina.

4 Alimento simbiótico

O termo alimento simbiótico é utilizado quando um produto contém tanto micro-organismos probióticos como ingredientes prebióticos (PICARD et al., 2005; CARDARELLI et al., 2008). Esta combinação pode melhorar a sobrevivência dos probióticos durante a passagem pelo trato gastrointestinal, pois substratos específicos estão disponíveis para sua fermentação (VITALI et al., 2010).

Por outro lado, duas abordagens para a definição de alimentos simbióticos foram propostas. A primeira discute sobre o efeito complementar, em que o probiótico é escolhido com base em seus efeitos específicos desejados e o prebiótico é selecionado de forma independente, com o objetivo de aumentar seletivamente as populações da microbiota intestinal benéfica. O prebiótico pode, indiretamente, favorecer a multiplicação e a atividade do probiótico, mas não como parte de seu objetivo principal. A segunda definição sugere uma ação sinérgica, na qual o probiótico é novamente selecionado com base nos efeitos benéficos sobre o hospedeiro. No entanto, o prebiótico é escolhido especificamente para estimular a multiplicação e a atividade do probiótico selecionado. Nesse tipo de abordagem, o prebiótico pode aumentar as populações de micro-organismos benéficos do hospedeiro, entretanto, seu alvo principal é o probiótico ingerido (KOLIDA e GIBSON, 2011).

A interação entre o probiótico e o prebiótico *in vivo* pode ser favorecida por uma adaptação do probiótico ao substrato prebiótico na matriz alimentícia anterior ao consumo. Isto pode, em alguns casos, resultar em uma vantagem competitiva para o probiótico, caso ele seja consumido juntamente com o prebiótico (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; MACFARLANE et al., 2008). RODRIGUES et al. (2011) observaram que a adição de FOS em queijo curado contendo *L. acidophilus* La-5 contribuiu positivamente para o aumento de

células viáveis do probiótico após 30 dias de maturação. Nessa linha, CARDARELLI et al. (2008) relataram que queijo *petit-suisse* adicionado dos prebióticos inulina e oligofrutose proporcionaram maior multiplicação de *B. animalis* subsp. *lactis* e *L. acidophilus*.

Alguns estudos sugerem que o consumo de alimentos simbióticos pode ajudar no equilíbrio do perfil metabólico, fatores inflamatórios e biomarcadores de estresse oxidativo (ASEMI et al., 2014). Em um grupo de indivíduos saudáveis, o consumo de um alimento simbiótico contendo *L. acidophilus*, *B. longum* e fruto-oligossacarídeos (FOS) aumentou a absorção de aminoácidos e preveniu o acúmulo de produtos tóxicos oriundos da fermentação de aminas e amônia. O aumento de metabólitos como o acetato, butirato e lactato também foi relatado (NDAGIJIMANA et al., 2009).

A aplicação de prebióticos em alimentos lácteos contendo probióticos, como iogurtes e sorvetes, pode ir além dos benefícios fisiológicos associados ao consumo desses produtos. As propriedades dos prebióticos como substitutos de açúcar e gordura podem resultar em alimentos simbióticos mais saudáveis por conterem baixo teor calórico. AKALIN e ERISIR (2008) observaram que a incorporação de inulina melhorou os aspectos de cremosidade e resistência ao derretimento de sorvete probiótico com baixo teor de gordura. ARYANA et al. (2007) relataram que iogurtes produzidos com diferentes comprimentos de cadeia de inulina receberam melhor pontuação sensorial nos aspectos de corpo e textura, quando comparados a um iogurte probiótico natural sem gordura. Esses autores comentaram, ainda, que a incorporação do prebiótico na fabricação de iogurtes probióticos depende do uso pretendido no produto.

5 Açaí

O açaí é o fruto de um gênero de árvores nativas de palmeiras tropicais encontradas em várias áreas da região amazônica. Há três espécies predominantes que produzem frutos comestíveis: *Euterpe edulis* Mart., *Euterpe precatoria* Mart., e *Euterpe oleracea* Mart. Estas espécies produzem um fruto chamado “açaí” ou “juçara”, entretanto, as duas últimas espécies citadas produzem o fruto “açaí”. Nas últimas décadas, o açaí vem sendo considerado uma “super fruta” devido ao seu poder antioxidante e aos seus efeitos anti-inflamatórios (KANG et al., 2012). Na década de 90, a comercialização desta fruta teve um crescimento, não só no mercado brasileiro, como também internacional. Atualmente, o açaí continua se destacando no mercado de exportação, devido às tendências mundiais do consumo de alimentos saudáveis e de

sabores exóticos (POMPEU et al., 2009; PACHECO-PALENCIA et al., 2009; MENEZES, 2011).

A polpa do açaí tem sido objeto de alguns estudos em função de seu valor nutritivo e sensorial (MENEZES et al., 2008; SHAUSS et al., 2010). Para muitos, é considerada um alimento funcional, face ao seu rico conteúdo de antocianinas, pigmentos hidrossolúveis responsáveis pela cor característica do fruto (RUFINO et al., 2011). Estudos recentes aumentam os indícios do potencial efeito anti-inflamatório do açaí (XIE et al., 2012; KANG et al., 2012). Nessa linha, SOUZA et al. (2010) verificaram, em modelo animal, um aumento da atividade antioxidante e do efeito hipocolesterolêmico após o consumo de açaí.

A análise da composição fitoquímica da polpa de açaí mostra que este fruto é rico em compostos fenólicos e, dentre esses compostos, destacam-se os flavonoides, principalmente a classe das antocianinas (SOUZA et al., 2009; GORDON et al., 2012). YUYAMA et al. (2011) analisaram os nutrientes que compõe o suco de açaí e observaram quantidades expressivas de lipídeos, fibra alimentar, antocianinas, ácidos graxos insaturados e minerais. Na fração lipídica, destacou-se a presença de ácido graxo oleico (18:1), com porcentagem média de 68% do total de ácidos graxos. Dentre os minerais, o potássio foi o mais abundante, seguido do cálcio, e o ferro foi encontrado em concentrações minoritárias.

O fruto do açaizeiro apresenta ainda um relevante conteúdo de fibras. RUFINO et al. (2011) analisaram uma nova cultivar de açaí e demonstraram quantidades acima de 70% de fibra alimentar. Este valor pode ser considerado alto, quando comparado a frutas com propriedades funcionais como a Romã, que apresentou conteúdo total de fibra alimentar de 51,1% (VIUDA-MARTOS et al., 2012). Diante da sua composição de nutrientes e do seu alto conteúdo de compostos fenólicos, o açaí tem sido considerado uma fruta de grande apelo funcional, uma vez que seu consumo está associado a benefícios fisiológicos (HOGAN et al., 2010; HEINRICH et al., 2011; KANG et al., 2012).

O açaí apresenta um grande potencial no desenvolvimento de produtos probióticos, uma vez que esses alimentos podem unir os benefícios à saúde atribuídos a esses micro-organismos com os benefícios nutricionais oferecidos por essa fruta. ALMEIDA et al. (2008) desenvolveram iogurte de açaí probiótico, contendo *L. acidophilus* e *B. bifidum*, que mantiveram populações médias de 7 log ufc/ml ao final de 21 dias de armazenamento refrigerado. Da mesma forma, ESPÍRITO-SANTO et al. (2010) observaram que a polpa de

açai não demonstrou efeito negativo na viabilidade das bactérias probióticas *L. acidophilus* L10, *B. animalis* subsp. *lactis* B104 e *B. longum* B105. No trabalho citado, a adição de polpa de açai favoreceu o aumento das populações dos probióticos estudados, demonstrando que produtos probióticos adicionados de polpa de açai podem ser utilizados com sucesso como veículos de culturas probióticas.

6 Proteínas concentradas de soro de leite

As proteínas concentradas de leite são produzidas a partir do soro lácteo remanescente da coagulação quase completa da caseína, sendo, portanto, consideradas subprodutos da fabricação de queijo ou da caseína (SMITHERS et al., 2008). O soro de leite que se separa do coágulo é constituído por 93% de água, 5% de lactose, 0,6% de proteína, 0,6% de minerais e 0,02% de gordura. As proteínas concentradas do soro tornaram-se importantes como matéria-prima no desenvolvimento de produtos alimentícios, devido às suas propriedades funcionais e nutritivas (EL-SALAM et al., 2009). Os ingredientes derivados das proteínas do soro são comumente classificados em “concentrados”, se o seu conteúdo proteico total estiver entre 25% e 80% de proteína, ou como “isolado”, quando o teor de proteína é superior a 90%. A variação existente no teor proteico dos concentrados e isolados é dependente da tecnologia de produção empregada. Técnicas industriais de microfiltração, ultrafiltração e diafiltração são aplicadas para a obtenção de concentrados e isolados proteicos de soro de leite (SURH et al., 2006; SMITHERS, 2008).

Do ponto de vista nutricional, as proteínas concentradas de soro de leite apresentam um alto valor biológico e são utilizadas na suplementação nutricional devido a sua rápida taxa de absorção e síntese proteica muscular (HA e ZEMEL, 2003). Além dos aspectos fisiológicos, essas proteínas possuem propriedades funcionais que lhes possibilitam aplicações no desenvolvimento de produtos alimentícios (DISSANAYAKE, 2010). Os concentrados proteicos são principalmente uma mistura de β -lactoglobulina, α -lactalbumina, albumina de soro bovino e imunoglobulinas (EL-SALAM et al., 2009). A funcionalidade dos concentrados irá depender da estrutura tridimensional dessas proteínas, incluindo tamanho, forma, composição, sequência de aminoácidos, carga líquida, razão hidrofobicidade e hidrofiliabilidade, bem como da influência de outros componentes alimentares presentes no alimento (DISSANAYAKE, 2010). A β -lactoglobulina, proteína mais abundante no soro de

leite, desempenha importantes propriedades gelificante, emulsificante e de formação de espuma.

A incorporação de concentrados e isolados proteicos de soro em formulações alimentícias pode diminuir o teor calórico dos alimentos, devido a atuação dessas proteínas como substitutos de gordura. Essa característica ocorre em virtude da alta capacidade de retenção de água dos concentrados proteicos de soro quando presentes em uma solução, resultando em alterações na textura e palatabilidade dos alimentos (ALFAIFI e STATHOPOULOS, 2010; PANDIYAN et al., 2012). ALFAIFI e STATHOPOULOS (2010) demonstraram que a substituição de gema de ovo por concentrado proteico de soro (WPC-80) melhorou a textura e a incorporação de ar de sorvetes do tipo gelato italiano. De acordo com PANDIYAN et al. (2012) concentrados proteicos de soro podem ser incorporados em uma concentração de até 40% em formulações de sorvete com o objetivo de aumentar o teor de proteínas sem, no entanto, afetar a qualidade sensorial desses produtos.

Além dos aspectos tecnológicos, os concentrados proteicos podem melhorar a viabilidade de culturas probióticas, devido às proteínas e fosfatos presentes, que atuam como agentes tamponantes e inibidores da atividade de proteases digestivas *in vivo* (ANTUNES et al., 2005; KOS et al., 2000). Adicionalmente, as bactérias probióticas podem hidrolisar as proteínas concentradas do soro de leite, gerando peptídeos e aminoácidos imprescindíveis para a manutenção da viabilidade dessas culturas (PESCUMA et al., 2010; PRASANNA et al., 2012).

KOS et al. (2000) estudaram a viabilidade de *L. acidophilus* M92 sob exposição a pH gástrico simulado (pH=2) por um tempo de 4 horas, e concluíram que o micro-organismo sobreviveu melhor na presença de concentrado proteico de soro de leite (*whey protein concentrate* - WPC), em comparação a outros ingredientes, como a caseína, leite desnatado e mucina. Os pesquisadores também observaram que a viabilidade de *L. acidophilus* M92 exposto ao suco gástrico na amostra controle foi de 15%, aumentando para 45% na presença de WPC, sugerindo que a adição deste ingrediente pode aumentar a tolerância de micro-organismos probióticos às condições gástricas.

ANTUNES et al. (2005) estudaram a influência do WPC na viabilidade de culturas probióticas em iogurtes desnatados. Os autores concluíram que WPC potencializou a multiplicação e a viabilidade de *L. acidophilus* e *B. longum*. As espécies de bifidobactérias são bastante exigentes, requerendo fatores de crescimento específicos para o seu crescimento

(SHA et al., 1995). As principais proteínas presentes nos concentrados proteicos (β -lactoglobulina e α -lactoglobulina) são excelentes agentes promotores de crescimento para bifidobactérias (WADA e LONNERDAL, 2014). AKALIN et al. (2007) demonstraram que a suplementação de leite com 1,5% de WPC, para a produção de iogurte, resultou em aumento de 1 ciclo logaritmo de *B. animalis* quando comparado a um iogurte produzido sem esta suplementação.

7 O sorvete como alimento simbiótico

O sorvete é um sistema coloidal constituído por cristais de gelo, células de ar, gotículas de gordura parcialmente coalescidas em uma fase aquosa contínua contendo carboidratos complexos (gomas), açúcares simples (glicose, sacarose, lactose), proteínas e minerais (SOUKOULIS et al., 2014). Devido à sua popularidade em quase todo o mundo e à sua alta aceitação por parte de consumidores de várias faixas etárias, o sorvete pode ser considerado um alimento favorável para incorporação de compostos que proporcionem saúde (SOUKOULIS et al., 2014). A sua forma de armazenamento congelado pode contribuir para a preservação de compostos bioativos por um período prolongado (HOMAYOUNI et al., 2011). A adição de culturas probióticas ao sorvete, além de agregar valor ao produto, oferece a vantagem de torná-lo um alimento funcional. Adicionalmente, o emprego de fibras prebióticas nesses produtos pode contribuir com aspectos tecnológicos de textura e sabor e com aspectos fisiológicos de modulação da microbiota intestinal do consumidor.

Cada fase do processo de produção do sorvete deve ser otimizada, visando um aumento da sobrevivência das bactérias probióticas, de forma a garantir a propriedade funcional do produto final. Desafios envolvidos na produção de sorvetes convencionais devem ser levados em consideração durante o desenvolvimento de sorvetes probióticos. Estes desafios incluem: contribuições das microestruturas e das propriedades coloidais fornecidas pelos ingredientes e/ou componentes presentes na formulação, o conhecimento e o controle da cristalização do gelo, a escolha de estabilizadores adequados e, ainda, uma compreensão e controle da desestabilização da gordura e da funcionalidade do emulsificante (GOFF, 2013; CRUZ et al., 2009).

A incorporação de bactérias probióticas em uma formulação de sorvete não deve afetar a qualidade global do produto. Portanto, parâmetros físico-químicos envolvidos no

controle de qualidade destes produtos, tais como a taxa de derretimento e as características sensoriais, devem ser os mesmos ou ainda melhores, quando comparados a um sorvete convencional (CRUZ et al., 2009). Nesse aspecto, os prebióticos são uma alternativa para auxiliar na manutenção de características sensoriais adequadas de sorvetes. A substituição parcial da sacarose por inulina e oligofrutose pode melhorar aspectos de sabor e textura de sobremesas lácteas ou não lácteas (SOUKOULIS et al., 2014). Adicionalmente, o papel da inulina como um potencial substituto de gordura tem sido intensamente abordado no desenvolvimento de produtos de origem láctea mais saudáveis ao consumidor (MEYER et al., 2011).

Em linhas gerais, as etapas de processamento de sorvete probiótico incluem: recepção/pesagem dos ingredientes envolvidos (leite, emulsificante, estabilizadores, leite em pó, açúcar); mistura; pasteurização; refriamento à temperatura entre 37-40 °C para a adição do fermento liofilizado (geralmente culturas *starters* de iogurte) e/ou das culturas probióticas; fermentação até que se alcance pH entre 4,7-4,8 (etapa presente apenas quando se tratar de um *frozen*); manutenção dessa mistura a 4 °C por 24 horas para maturação. A mistura é posteriormente batida sob temperatura de congelamento, de modo a se obter o produto final (CRUZ et al., 2009).

Diferentes técnicas são descritas para a incorporação de micro-organismos probióticos em sorvetes. Entre essas técnicas, destacam-se: cultivo dos probióticos na mistura de sorvete, propiciando a sua multiplicação nessa matriz (FAVARO-TRINDADE et al., 2006; AKALIN e ERISIR, 2008); adição de leite fermentado à mistura de sorvete (MAGARIÑOS et al., 2007; TURGUT e CAKMAKCI, 2009); adição das células bacterianas ativadas ao sorvete (ALAMPRESE et al., 2002; ABGHARI et al., 2011; NOUSIA et al., 2011).

ABGHARI et al. (2011) sugeriram que o pH de sorvetes não fermentados dá ao produto uma vantagem sobre sorvetes fermentados ou *frozen* iogurtes e pode possibilitar uma viabilidade satisfatória de bactérias probióticas. Os autores sugeriram, ainda, que os compostos crioprotetores presentes no sorvete, como gordura do leite, caseína, lactose e açúcar, geralmente promovem a proteção contra danos celulares ocasionados pelo congelamento.

Estudos mostram que culturas probióticas são capazes de manter sua viabilidade em produtos alimentícios congelados, com uma perda mínima verificada durante o

armazenamento (ALAMPRESE et al., 2002, 2005; HARAMI, 2008; ABGHARI et al., 2011; NOUSIA et al., 2011). De acordo com RANADHEERA et al. (2012), três probióticos estudados (*L. acidophilus* La-5, *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12, *P. jensenii* 702) demonstraram baixa tolerância gástrica em iogurte de fruta. Entretanto, os referidos probióticos, quando em sorvete, apresentaram maior manutenção de viabilidade durante o trânsito gástrico (com simulação do suco gástrico feito a pH 2,0).

Nesse sentido, ABGHARI et al. (2011) produziram um sorvete não fermentado contendo culturas probióticas *L. acidophilus* e *L. rhamnosus*, a fim de avaliar se essa matriz era adequada como veículo desses micro-organismos. Após 84 dias de armazenamento a -19 °C, os autores observaram que não houve decréscimo significativo nas células viáveis de *L. rhamnosus*, o qual permaneceu com concentração de 10^9 ufc/g ao final do estudo. *L. acidophilus* que possuía uma população de 10^8 ufc/g no início da estocagem apresentou um declínio para 10^7 ufc/g após 12 semanas de armazenamento congelado. Os autores afirmaram que apesar desse declínio na concentração de células viáveis de *L. acidophilus*, a concentração celular de ambas as culturas probióticas foi superior à menor dose terapêutica recomendada (concentração de 10^6 – 10^7 ufc/g de produto) que é sugerida pela *International Dairy Federation* (IDF, 1992). Resultados similares foram encontrados por ALAMPRESE et al. (2005), os quais relataram a sobrevivência de *L. rhamnosus* em sorvete não fermentado por um período de 1 ano armazenado a -28 °C.

NOUSIA et al. (2011) produziram um sorvete probiótico não fermentado com a incorporação de células ativadas de *L. acidophilus*. Os autores observaram manutenção da viabilidade celular ao final de 45 semanas, com estocagem a -15 °C e -25 °C.

ALAMPRESE et al. (2002) conduziram um estudo com sorvete suplementado com *L. johnsonii* La1, simulando condições industriais. Quatro formulações contendo diferentes quantidades de gordura (5% e 10% m/v) e açúcar (15% e 22% m/v) foram preparadas. Para cada formulação, sorvete com e sem La1 foram preparados e armazenados em temperatura de -16 ° e -28 °C. As células puras de La1 e as amostras das formulações de sorvete foram submetidas após o congelamento a testes preliminares de resistência à bile, antibióticos e acidez. Os micro-organismos mostraram-se resistentes à maioria desses fatores de estresse. Os autores observaram altas taxas de sobrevivência dos probióticos durante oito meses de armazenamento dos sorvetes, sem redução na população inicialmente inoculada (10^7 ufc/g).

Além disso, a adição do micro-organismo probiótico não promoveu alterações físico-químicas no produto acabado.

Em trabalho realizado por HARAMI (2008), a adição de inulina em uma porção de gelado comestível melhorou a sobrevivência de *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis* Bb-12, contribuindo para que ao final de 90 dias de armazenamento a -18 °C, populações de pelo menos 10⁶ ufc/g ainda pudessem ser obtidas.

Em alguns casos, esforços adicionais podem ser necessários no desenvolvimento de sorvetes probióticos, que incluem o uso de microencapsulação de culturas e da suplementação com prebióticos. A adição de inulina, por exemplo, surge como uma alternativa para esses produtos, a fim de auxiliar na sobrevivência e estabilidade de micro-organismos probióticos. A inulina pode atuar também como agente estabilizante, controlando a recristalização do gelo, uma vez que apresenta efeitos crioprotetores em combinação com outros ingredientes, como xarope de glicose, e, dessa forma, pode prevenir formação de cristais de gelo durante as variações de temperatura que podem ocorrer durante o armazenamento (SCHALLERPOVOLNY e SMITH, 1999; AKALIN e ERISIR, 2008).

De acordo com DI CRISCIO et al. (2011), doses elevadas de inulina (10%) alteraram de forma significativa as propriedades sensoriais e físicas de sorvetes. No entanto, em formulações com 2,5% de inulina foi possível obter sorvetes com características similares às de sorvetes convencionais, além de representarem 40% do consumo de prebiótico que é necessário para se obter efeito positivo na modulação da microbiota intestinal. Os autores desse estudo concluíram que é possível a produção de sorvetes simbióticos adicionados de 3% de inulina e de micro-organismos probióticos a fim de se obter um produto funcional.

Assim, o sorvete é uma sobremesa que apresenta potencial como veículo de culturas probióticas e fibras prebióticas. Contudo, há de se levar em consideração a influência de diferentes fatores nas etapas de processamento, a fim de manter os micro-organismos viáveis e capazes de conferir benefícios à saúde do consumidor. Nesse contexto, também é necessário considerar a concentração do inóculo, a etapa do processo que este será adicionado, bem como a seleção da cultura a ser utilizada (CRUZ et al., 2009). No caso de prebióticos, deve-se considerar a dose a ser utilizada, tendo em vista que doses elevadas além de alterarem de forma significativa as características dos produtos, podem ainda exercer efeito laxativo no consumidor.

Com o objetivo de verificar a viabilidade de obtenção de um sorvete simbiótico para fins de congelamento, é necessário que se estude a sobrevivência dos probióticos, bem com as características do produto. Com o intuito de assegurar os benefícios atribuídos ao consumo desse tipo de alimento, é necessário avaliar, também, se essas culturas probióticas resistem às diferentes condições do trato gastrointestinal, para garantir o efeito probiótico desse produto *in vivo*. O emprego do prebiótico inulina, que atua como substituto de gordura e confere efeito crioprotetor a produtos congelados, pode resultar em um sorvete simbiótico em potencial. O emprego de proteínas do soro de leite, na forma concentrada e isolada pode auxiliar na manutenção das quantidades adequadas dos micro-organismos durante a passagem pelo TGI, aumento da tolerância dos probióticos às condições adversas do estômago e do intestino delgado. Dessa forma, é possível a obtenção de um novo alimento funcional que pode ser armazenado sob congelamento, dessa maneira aumentando a probabilidade de favorecer a administração de um número razoável de bactérias probióticas para atuarem no intestino do indivíduo, favorecendo, de uma maneira geral, o equilíbrio da microbiota do intestino, uma vez que poderia, também, estimular a multiplicação de bifidobactérias no colón.

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

A metodologia de superfície de resposta (ou RSM, de *Response Surface Methodology*) é um conjunto de técnicas baseadas no uso do planejamento fatorial, aplicado com grande sucesso para a modelagem de processos industriais. Esta metodologia é baseada no uso do “método dos mínimos quadrados” ajustado para a construção de modelos empíricos simples (em geral lineares ou quadráticos) que descrevem o comportamento do sistema em estudo, com base nas respostas obtidas a partir de planejamentos fatoriais (BARROS NETO et al., 2007). Na maioria das aplicações da RSM, várias respostas são medidas para cada grupo de condições experimentais e um modelo é ajustado para cada resposta. Um exemplo de derivação da RSM é o caso de ensaios envolvendo misturas, empregados neste trabalho. A RSM para modelagem de misturas vem sendo utilizada por vários pesquisadores na área de alimentos (CASTRO et al., 2003; CARDARELLI et al., 2008; BURITI et al., 2010). Em misturas, as propriedades são determinadas pelas proporções de seus ingredientes, que são considerados variáveis dependentes (cujos valores são dependentes). Assim, as respostas para as

misturas são determinadas pelas proporções mantidas entre variáveis e não pela quantidade total de cada uma.

O sistema de coordenadas usado para os valores de X_i ($i= 1, 2, 3, \dots, q$) é chamado de sistema de coordenadas *simplex* e a descrição geométrica da representação espacial irá depender do número q de componentes, podendo assumir a forma de um triângulo equilátero para $q=3$.

O delineamento experimental geralmente empregado para determinar os valores dos coeficientes do modelo cúbico especial é conhecido como *centroid simplex*, que acrescenta um ponto central, representando a mistura ternária em partes iguais.

Misturas ternárias são formadas por três componentes, ou seja, três fatores independentes. Observa-se que os fatores são representados por X_1 , X_2 e X_3 , que devem somar 1, ou 100%, e correspondem geometricamente a um triângulo equilátero. As diferentes composições possíveis são representadas pelos pontos pertencentes ao triângulo. Os vértices correspondem aos componentes puros e os lados às misturas binárias, enquanto os pontos no interior do triângulo representam as possíveis misturas dos três componentes. A variação de um determinado parâmetro (variável-resposta medida) em função da composição da mistura pode ser representada por uma superfície de resposta desenhada acima do triângulo (Figura 1).

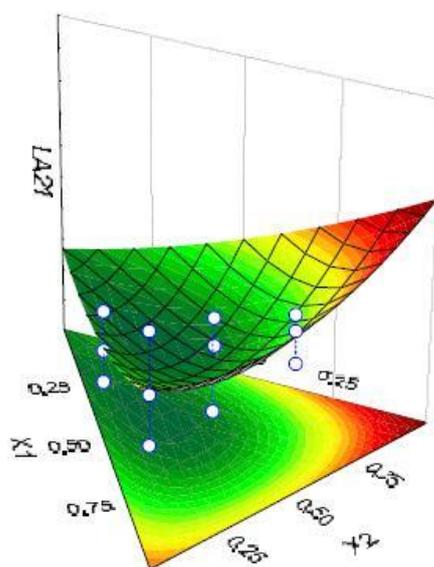


Figura 1- Superfície de resposta para as possíveis misturas.

Quando várias respostas são envolvidas, prefere-se o termo otimização de respostas combinadas (CASTRO et al., 2003) ou otimização multi-resposta (ARTEGA et al., 1994; CARDARELLI et al., 2008).

A otimização pode ser definida como a escolha da melhor alternativa dentre um grupo específico de possibilidades. Portanto, quando se desenvolve um produto ou fórmula trabalha-se essencialmente com um problema de otimização. A otimização de processos ou produtos exige o planejamento de ensaios para se determinar os níveis ótimos dos componentes. Esses componentes são as variáveis-dependentes ou respostas que devem ser otimizadas (maximizadas ou minimizadas) (CASTRO et al., 2003).

A otimização pela metodologia da superfície de resposta é a mais usada na ciência e tecnologia de alimentos, possivelmente porque a sua teoria é completa, eficiente e simples (BOX e DRAPER, 1987). Através deste conjunto de técnicas, é possível avaliar os efeitos dos principais fatores que forneçam a melhor multi-resposta.

9 Referências bibliográficas

- ABHARI, A.; SHEIKH-ZEINODDIN, M.; SOLEIMANIAN-ZAD, S. Nonfermented ice cream as a carrier for *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus*. **International Journal of Food Science & Technology**, v.46, p.84-92, 2011.
- AKALIN, A.S.; ERISIR, D. Effects of inulin and oligofructose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic ice-cream. **Journal of Food Science**, v.73, p.184-188, 2008.
- AKALIN, A.S.; GÖNÇ, S.; ÜNAL, G.; FENDERYA, S. Effects of fructooligosaccharide and whey protein concentrate on the viability of starter culture in reduced-fat probiotic yogurt during storage. **Journal of Food Science**, v.72, p.M222-M227, 2007.
- ALAMPRESE, C.; FOSCHINO, R.; ROSSI, M.; POMPEI, C.; CORTI, S. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG addition in ice cream. **International Journal of Dairy Technology**, v.58, p.200-206, 2005.
- ALAMPRESE, C.; FOSCHINO, R.; ROSSI, M.; POMPEI, C.; SAVANI, L. Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and the influence of its addition in retail-manufactured ice-cream produced with different sugar and fat concentration. **International Dairy Journal**, v.12, p.201-208, 2002.
- ALEGRE, I.; VIÑAS, I.; USALL, J.; ANGUERA, M.; ABADIAS, M. Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Food Microbiology**, v.28, p.59-66, 2011.
- ALFAIFI, M.S.; STATHOPOULOS, C.E. Effect of egg yolk substitution by sweet whey protein concentrate (WPC), on physical properties of Gelato ice cream. **International Food Research Journal**, v.17, p.787-793, 2010.
- AL-SHERAJI, S.H.; ISMAIL, A.; MANAP, M.Y.; MUSTAFA, S.; YUSOF, R.M.; HASSAN, F.A. Hypocholesterolaemic effect of yoghurt containing *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 or *Bifidobacterium longum* BB536. **Food Chemistry**, v.135, p.356-361, 2012.
- ANTUNES, A.E.C.; CAZETTO, T.F.; BOLINI, H.M.A. Viability of probiotic microorganisms during storage, postacidification and sensory analysis of fat-free yogurts with added whey protein concentrate. **International Journal of Dairy Technology**, v.58, p.169-173, 2005.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 10 junho. 2013.
- ARAI, S. Global view on functional foods: Asian perspectives. **British Journal of Nutrition**, v.88, p.S139-S143, 2002.

ARTEGA, G.E.; LI-CHAN, E.; VAZQUEZ-ARTEAGA, M.C.; NAKAI, S. Systematic experimental design for product formula optimization. **Trends in Food Science & Technology**, v.5, n.8, p.243-254, 1994. [Review].

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**, v.3, p.79-84, 2007.

ASEMI, Z.; KHORRAMI-RAD, A.; ALIZADEH, S.; SHAKERI, H.; ESMAILZADEH, A. Effects of synbiotic food consumption on metabolic status of diabetic patients: A double-blind randomized cross-over controlled clinical trial. **Clinical Nutrition**, v.33, p.198-203, 2014.

BAJAJ, J.S.; HEUMAN, D.M.; HYLEMON, P.B.; SANYAL, A.J.; PURI, P.; STERLING, R.K.; LUKETIC, V.; STRAVITZ, R.T.; SIDDIQUI, M.S.; FUCHS, M., THACKER, L.R.; WADE, J.B.; DAITA, K.; SISTRUN, S.; WHITE, M.B.; NOBLE, N.A.; THORPE, C.; KAKIYAMA, G.; PANDAK, W.M.; SIKAROODI, M.; GILLEVET, P.M. Randomized clinical trial: *Lactobacillus* GG modulates gut microbiome, metabolome and endotoxemia in patients with cirrhosis. **AP&T Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.39, p.1113-1125, 2014

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

BEDANI, R.; ROSSI, E.A.; SAAD, S.M.I. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v.34, p.382-389, 2013.

BEDANI, R.; VIEIRA, A.D.S; ROSSI, E.A.; SAAD, S.M.I. Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to *in vitro* gastrointestinal stress in synbiotic soy yoghurt with okara during storage. **LWT – Food Science and Technology**, v.55, p.436-443, 2014.

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

BIGLIARDI, B.; GALATI, F. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.31, p.118-129, 2013.

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

CAMMAROTA, G.; IANIRO, G.; BIBBÒ, S.; GASBARRINI, A. Gut microbiota modulation: probiotics, antibiotics or fecal microbiota transplantation? **International Emergency Medicine**, v.9, p.365-373, 2014.

CANANI, R.B.; Di COSTANZO, M. Gut microbiota as potential therapeutic target for the treatment of cow's milk allergy. **Nutrients**, v.5, p.651-662. 2013. [Review].

CAPRILES, V.D.; ARÊAS, J.A.G. Frutanos do tipo inulina e aumento da absorção de cálcio: uma revisão sistemática. **Revista de Nutrição**, v.25, p.147-159, 2012.

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

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

CHAMPAGNE, C.P.; ROSS, R.P.; SAARELA, M.; HANSEN, K.F.; CHARALAMPOPOULOS, D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**, v.149, p.185-193, 2011.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **International Journal of Dairy Technology**, v.51, p.123-136, 1998.

COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, v.8, p.487-490, 1998.

COLLINS, S.M.; SURETTE, M., BERCIK, P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. **Nature Reviews**, v.10, p.735-742, 2012.

CRUZ, A.G.; ANTUNES, A.E.C, SOUSA, A.L.O.P.; FARIA, J.A.F., SAAD, S.M.I. Ice-cream as a probiotic food carrier. **Food Research International**, v.42, p.1233-1239, 2008.

DE PRETER, V.; FALONY, G.; WINDEY, K.; HAMER, H.M.; VUYST, L.; VERBEKE, K. The prebiotic, oligofrutose-enriched inulin modulates the faecal metabolites profile: An *in vitro* analysis. **Molecular Nutrition and Food Research**, v.54, p.1791-1801, 2010.

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

DISSANAYAKE, M.; KELLY, A.L.; VASILJEVIC, T. Gelling properties of microparticulated whey proteins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.58, p.6825-6832, 2010.

EFSA. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific opinion on the substantiation of a health claim related to *Lactobacillus rhamnosus* GG and maintenance of defence against pathogenic gastrointestinal microorganisms pursuant to article 13(5) of Regulation (EC) No 1924/2006. **EFSA Journal**, v.9, n.6, p.2167, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**: Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London: Ontário: FAO, 2002. 11p.

FAVARO-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 (*Malpighiaemarginata* DC.) ice cream. **Journal of Food Science**, v.71, p.492-495, 2006.

FUJII, A.; COOK, E.S. Probiotics. Antistaphylococcal and antifibrinolytic activities of omega-guanidine acids and omega-guanidinoacyl-L-histidines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.16, p.1409–1411, 1973.

GÉRARD, P. Metabolism of cholesterol and bile acids by the gut microbiota. **Pathogens**, v.3, p.14-24, 2014.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. In: _____, eds. **Handbook of prebiotics**. Boca Raton: CRC Press, 2008. 485p.

GIGANTE, G.; TORTORA, A.; LANIRO, G.; OJETTI, V.; PURCHIARONI, F.; CAMPANALE, M.; CESARIO, V. Role of gut microbiota in food tolerance and allergies. **Digestive Diseases**, v.29, p.540-549, 2011.

GOETZE, O.; FRUEHAUF, H.; POHL, D.; GIARRÈ, M.; ROCHAT, F.; ORNSTEIN, K.; MENNE, D.; FRIED, M.; THUMSHIRN, M. Effect of a prebiotic mixture on intestinal comfort and general wellbeing in health. **British Journal of Nutrition**, v.100, p.1077-1085, 2008.

THOMAS, D.W.; GREER, F.R. Clinical report – probiotics and prebiotics in pediatrics. **Pediatrics**, v.126, p.1217-1231, 2010.

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

GOLDIN, B.; GORBACH, S.L.; SAXELIN, M.; BARAKAT, S.; GUALTIERI, L.; SALMINEN, S. Survival of *Lactobacillus* species (Strain GG) in human gastrointestinal tract. **Digestive Diseases and Sciences**, v.37, p.121-128, 1992.

GORDON, A.; CRUZ, A.P.G.; CABRAL, L.M.C.; FREITAS, S.C.; TAXI, C.M.A.D.; DONANGELO, C.M.; MATTIETTO, R.A.; FRIEDRICH, M.; MATTA, V.M.; MARX, F. Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açaí fruits (*Euterpeoleraceae* Mart.) during ripening. **Food Chemistry**, v.133, p.256-263, 2012.

GUO, Z., WANG, J.; YAN, L.; CHEN, W.; LIU, X.; ZHANG, H. *In vitro* comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. **LWT – Food Science and Technology**, v.42, p.1640-1646, 2009.

HA, E.; ZEMEL, M.B. Functional properties of whey, whey componentes, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (Review). **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.14, p.251-258, 2003.

HAMILTON-MILLER, J. M. T; GIBSON, G. R, BRUCK, W. Some insight into the derivation and early uses of the word ‘probiotic’. **British Journal of Nutrition**, v.90, p.845, 2003.

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

HOGAN, S.; CHUNG, H.; ZHANG, L.; LI, J.; LEE, Y.; DAI, Y.; ZHOU, K. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açaí. **Food Chemistry**, v.118, p.208-214, 2010.

HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. Açai (*Euterpeoleracea* Mart.)—A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. **Phytochemistry Letters**, v.4, p.10-21, 2011.

KANG, J.; THAKALI, K.M.; XIE, C., KONDO, M.; TONG, Y., OU, B., JENSEN, G., MEDINA, M.B., SCHAUSS, A.G., WU, X. Bioactivities of açai (*Euterpe precatória* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpeoleracea* Mart. **Food Chemistry**, v.133, p.671-677, 2012.

HOMAYOUNI, A.; AZIZI, A.; JAVADI, M.; MAHDIPOUR, S.; EJTAHED, H. Factors Influencing Probiotic Survival in Ice Cream: A Review. **International Journal of Dairy Science**, v.7, p.1-10, 2012.

JELLEN, P.; LUTZ, S. Functional milk and dairy products. In: MAZZA, G., ed. **Functional foods: biochemical & processing aspects**. Lancaster: Technomic Publishing, 1998. cap.11, p.357-381. (Functional foods & nutraceuticals series).

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

KLU, Y.A.K.; WILLIAMS, J.H.; PHILIPS, R.D.; CHEN, J. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG as influenced by storage conditions and product matrixes. **Journal of Food Science**, v.77, p.M659-63, 2012.

KOLB, H. Die Behandlung acuter Infekteunterdem Gesichtswinkel der Prophylaxechronischer Leiden. Über die Behandlungmitphysiologischenbakterien. **Microecology and Therapeutics**, v.1, p.15–19, 1955.

KOLIDA, S.; GIBSON, G.R. Synbiotics in health and disease. **Annual Review of Food Science and Techonology**, v.2, p.373-393, 2011.

KOLIDA, S.; MEYER, D.; GIBSON, G.R. A double-blind placebo-controlled study to establish the bifidogenic dose of inulin in healthy humans. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.61, p.1189-1195, 2007.

KOLLATH, W. Nutrition and the tooth system; general review with special reference to vitamins. **Deutsche zahnärztlicheZeitschrift**, v.8, p.7–16, 1953.

KOS, B.; SUSKOVIC, J. GORETA, J.; MATOSIC, S. Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. **Food Technology Biotechnology**, v.38, p.121-127, 2000.

KUMPU, M.; SWASNLJUNG, E.; TYNKKYNNEN, S.; HATAKKA, K.; KEKKONEN, R.A., JARVENPAA, S.; KORPELA, R.; PITKARANTA, A. Recovery of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in tossil tissue after oral administration: randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial. **British Journal of Nutrition**, v.109, p.2240-2246, 2013.

KWAK, N.; JUKES, D.J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. **Food Control**, v.12, p.99-107, 2001.

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

- LARKIN, T.A.; ASTHEIMER, L.B.; PRICE, W.E. Dietary combination of soy with a probiotic or prebiotic food significantly reduces total and LDL cholesterol in mildly hypercholesterolaemic subjects. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.63, p.238-245, 2009.
- LEE, Y.K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, 1999. 211p.
- LILLY, D.M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v.147, p.747-748, 1965.
- MACFARLANE, G.T.; STEED, H.; MACFARLANE, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.305-344, 2008.
- MADUREIRA, A.R.; PEREIRA, C.I.; TRUSZKOWSKA, K.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. **International Dairy Journal**, v.15, p.921-927, 2005.
- MADUREIRA, A.R.; AMORIM, M.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v.44, p.465-470, 2011.
- MAGARIÑOS, H.; SELAIVE, S.; COSTA, M.; FLORES, M.; PIZARRO, O. Viability of probiotic micro-organisms (*Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12) in ice cream. **International Journal of Dairy Technology**, v.60, n.2, p.128-134, 2007.
- MARQUES, T.M.; CRYAN, J.F.; SHANAHAN, F.; FITZGERALD, G.F.; ROSS, R.P.; DINAN, T.G.; STANTON, C. Gut microbiota modulation and implications for host health: Dietary strategies to influence the gut-brain axis. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.22, p.239-247, 2014.
- MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v.12, p.173-182, 2002.
- MENEZES, E.M.S.; TORRES, A.T.; SRUR, A.U.S. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. **Acta Amazonic**, v.38, p.311-316, 2008.
- MENEZES, E.; DELIZA, R.; CHAN, H.L.; GUINARD, J. Preferences and attitudes towards açai-based products among North American consumers. **Food Research International**, v.44, p.1997-2008, 2011.
- MEYER, D.; BAYARRI, S.; TÁRREGA, A.; COSTELL. Inulin as texture modifier in dairy products. **Food Hydrocolloids**, v.25, p.1881-1890, 2011.
- MINOCHA, A. Probiotics for preventive health. **Nutrition in Clinical Practice**, v.24, p.227-241, 2009.
- NAIR, K.K.; KHARB, S.; THOMPSON, D.K. Inulin dietary fiber with functional and health attributes – A review. **Food Reviews International**, v.26, p.189-203, 2010.

NDAGIJIMANA, M.; LAGHI, L.; VITALI, B.; PLACUCCI, G.; BRIGIDI, P.; GUERZONI, M.E. **International Journal of Food Microbiology**, v.134, p.147-153, 2009.

NICHOLSON J.K. Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. **Science**, v.336, p.1262-1267, 2012.

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

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, p.1-21, 2002.

PACHECO-PALENCIA, L.A.; DUNCAN, C.E.; TALCOTT, S.T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. **Food Chemistry**, v.115, p.1199-1205, 2009.

PANDIYAN, C.; ANNAL VILLI, R.; KUMARESAN, G.; RAJARAJAN, G.; ELANGO, A. Effect of incorporation of whey protein on quality of ice cream. **Tamilnadu Journal Veterinary & Animal Sciences**, v.8, p.189-193, 2012.

PARKER, R.B. Probiotics, the other half of the story. **Animal Nutrition and Health**, v.29, p.4-8, 1974.

PASSARIELLO, A.; AGRICOLE, P.; MALFERTHEINER, P. A critical appraisal of probiotics (as drugs or food supplements) in gastrointestinal diseases. **Current Research & Opinion**, v.30, p.1055-1064, 2014.

PESCUMA, M.; HÉBERT, E.M.; MOZZI, F.; VALDEZ, G. F. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p.73-81, 2010.

PRASANNA, P.H.P.; GRANDISON, A.S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Effect of dairy-based protein sources and temperature on growth, acidification and exopolysaccharide production of *Bifidobacterium* strains in skim milk. **Food Research International**, v.47, p.6-12, 2012.

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, p.495-512, 2005.

POMPEU, D.R.; SILVA, E.M.; ROGEZ, H. Optimization of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. **Bioresource Technology**, v.100, p.6076-6082, 2009.

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 Food Science Technology**, v.13, p.3-11, 2002.

RAMCHANDRANA, L.; SHAH, N.P. Characterization of functional, biochemical and textural properties of synbiotic low-fat yogurts during refrigerated storage. **Food Science and Technology**, v.43, p.819-827, 2010.

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

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

RAUTAVA, S.; KALLIOMAKI, M.; ISOLAURI, E. Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.109, p.119-121, 2002.

ROBERFROID, M.B. Inulin-type fructans: Functional Food Ingredients. **Journal of Nutrition**, v.137, p.2493S-2502S, 2007.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G.R.; HOYLES, L.; McCARTNEY, A.L.; RASTALL, R.; ROWLAND, I.; WOLVES, D.; WATZL, B.; SZAJEWSKA, STAHL, B.; GUARNER, F.; RESPONDEK, F.; WHELAN, K.; COXAM, V.; DAVICCO, M.; LÉOTOING, L.; WITTRANT, Y.; DELZENNE, N.M.; CANI, P.D.; NEYRINCK, A.; MEHEUST, A. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v.104, suppl.2, p.S1-S63, 2010.

RODRIGUES, A. Microbiota intestinal e sua possível relação com a obesidade. **Revista da Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO)**, v.53, p.6-7, 2011.

RUFINO, M.S.M.; JIMÉNEZ, J.P.; ARRANZ, S., ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; OLIVEIRA, M.S.P. SAURA-CALIXTO, F. Açai (*Euterpe oleraceae*) 'BRS Pará': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. **Food Research International**, v.44, p.2100-2106, 2011.

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

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

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

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

SAARELA, M.; ALAKOMI, H.L.; MATTO, J.; AHONEN, A.M.; TYNKKYNEN, S. Acid tolerant mutants of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* with improved stability in fruit juice. **LWT – Food Science and Technology**, v.44, p.1012-1018, 2011.

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

SAXELIN, M.; AHOKAS, M.; SALMINEN, S. Dose response on the faecal colonization of *Lactobacillus* strain GG administered in two different formulations. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.6, p.119-122, 1993.

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, p.555-559, 1999.

SENGUPTA, R.; ALTERMANN, E.; ANDERSON, R.C.; MCNABB, W.C.; MOUGHAN, P.J.; ROY, N.C. The Role of Cell Surface Architecture of Lactobacilli in Host-Microbe Interactions in the Gastrointestinal Tract. **Mediators of Inflammation**, v.2013, p.1-16, 2013.

SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt. **International Dairy Journal**, v.7, p.349-356, 1997.

SCHAUSS, A.G.; CLEWELL, A.; BALOGH, L.; SZAKONYI, I.P.; FINANCSEK, I.; HORVÁTH, J.; THUROCZY, J.; BÉRES, E.; VÉRTESI, A.; HIRKA, G. Safety evaluation of an açai-fortified fruit and berry functional juice beverage (MonaVie Active®). **Toxicology**, v.278, p.46-54, 2010.

SHIMIZU, M.; HACHIMURA, S. Gut as a target for functional food. **Trends in Food Science & Technology**, v.22, p.646-650, 2011.

SHORTT, C.; SHAW, D.; MAZZA, G., 2004. Overview of opportunities for health-enhancing functional dairy products. In: SHORTT, C.; O'BRIEN, J., eds. **Handbook of functional dairy products**. Boca Raton: CRC Press, 2004. p.1-12. (Functional foods and nutraceuticals series).

SILVA, M.; JACOBUS, N.V.; DENEKE, C.; GORBACH, S.L. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.31, p.1231-1233, 1987.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing consumer acceptance. **Appetite**, v.51, p.456-467, 2008.

SMITHERS, G.W. Whey and whey proteins-From 'gutter-to-gold'. **International Dairy Journal**, v.18, p.695-704, 2008.

SOUKOULIS, C.; FISK, I.D.; BOHN, T. Ice cream as a vehicle for incorporating health-promoting ingredients: Conceptualization and overview of quality and storage stability. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.13, p.627-655, 2014.

SOUZA, M.O.; SILVA, M.; SILVA, M.E.; OLIVEIRA, R.P.; PEDROSA, M.L. Diet supplementation with açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. **Nutrition**, v.26, p.804-810, 2010.

SOUZA, M. O. **Suplementação da dieta com polpa do fruto do Açai (*Euterpe oleraceae* Martius) Melhora o perfil lipídico e capacidade antioxidante – Uma avaliação *in vivo***. Ouro Preto, 2009. [Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Ouro Preto].

SPERTI, G.S. **Probiotics**. Westpoint: Avi Publishing, 1971. p.121.

SULLIVAN, A.; NORD, C.E. Probiotics and gastrointestinal diseases. **Journal of Internal Medicine**, v.257, p.78-92, 2005.

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

SZAJEWSKA, H.; WANKE, M.; PATRO, B. Meta-analysis: the effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation for the prevention of healthcare-associated diarrhea in children. **AP&T Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.34, p.1079-1087, 2011.

SZAJEWSKA, H.; SKORKA, A.; RUSZCZYNSKI, M.; GIERUSZZAK-BIATEK, D. Meta-analysis: *Lactobacillus* GG for treating acute gastroenteritis in children – updated analysis of randomized controlled trials. **AP&T Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.38, p.467-476, 2013.

TOMPKINS, T.A.; MAINVILLE, I.; ARCAND, Y. The impact of meals on a probiotic during transit through a model of the human upper gastrointestinal tract. **Beneficial Microbes**, v.2, p.295-303, 2011.

TREMAROLI, V.; BACKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, v.489, p.242-249, 2012.

TUOHY, K.M.; PROBERT, H.M.; SMEJKAL, C.W.; GIBSON, G.R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today, Haywards Heath**, v.8, p.692-700, 2003.

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

TYNKKYNEN, S.; SINGH, K.V.; VARMANEN, P. Vancomycin resistance factor of *Lactobacillus rhamnosus* GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (van) genes. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, p.195-204, 1998.

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

VERGIN, F. Anti- und Probiotika. **Hippokrates**, v.25, p.116–119, 1954.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “*in vitro*” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, v.36, p.895-904, 2003.

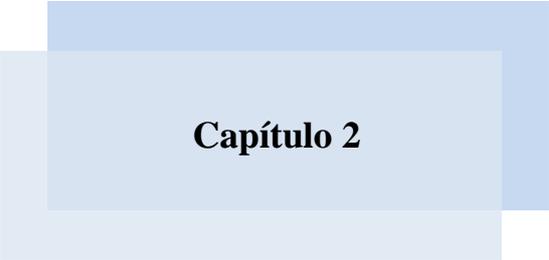
VITALI, B.; NADGIJIMANA, M.; CRUCIANI, F.; CARNEVALI, P.; CANDELA, M.; GUERZONI, M.E.; BRIGIDI, P. Impact of a synbiotic food on the gut microbial ecology and metabolic profiles. **BMC Microbiology**, v.10, p.1-13, 2010.

VIUDA-MARTOS, M.; NAVAJAS-RUIZ, Y.; MARTIN-SÁNCHEZ, A.; SÁNCHEZ-ZAPATA, E.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; SENDRA, E.; SAYAS-BARBERÁ, E.; NAVARRO, C.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. Chemical, physico-chemical and functional properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses poder co-product. **Journal of Food Engineering**, v.110, p.220-224, 2012.

WADA, Y.; LONNERDAL, B. Bioactive peptides derived from human milk proteins – mechanisms of action. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.25, p.503-514, 2014.

XIE, C.; KANG, J.; LI, Z.; SCHAUSS, A.G.; BADGER, T.M.; NAGARAJAN, S.; WU, T.; WU, X. The açai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF- α and IL-6 production through inhibiting NF- κ B activation and MAPK pathway. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.23, n.9, p.1184-1191, 2012.

YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; SILVA FILHO, D.F.; YUYAMA, K.; VAREJÃO, M.J.; FÁVARO, D.I.T.; VASCONCELLOS, M.B.A.; PIMENTEL, S.A.; CARUSO, M.S.F. Caracterização físico-química do suco de açai de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. **Acta Amazonica**, v.41, n.4, p.545-552, 2011.



Capítulo 2

Efeito de inulina e proteínas do soro de leite na sobrevivência do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG em sorvete simbiótico de açaí submetido a condições gastrintestinais simuladas *in vitro*

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos ingredientes inulina, concentrado (WC) e isolado proteico (WI) de soro de leite sobre a viabilidade e a resistência *in vitro* do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG adicionado a sorvetes de açaí. A viabilidade de *L. rhamnosus* GG manteve-se estável em todas as formulações estudadas até os 112 dias de armazenamento congelado, preservando populações próximas a 9 log ufc/g. O probiótico demonstrou melhor resistência às condições gastrintestinais simuladas quando incorporado aos sorvetes de açaí comparado a cultura fresca, apontando que a presença da matriz contribuiu para a sobrevivência do micro-organismo. Para todas as formulações, houve redução em, pelo menos, 5 ciclos logaritmos da população de *L. rhamnosus* GG, após 6 horas de simulação gastrintestinal em todos os períodos estudados. A adição de inulina, WC e WI não demonstrou efeito significativo para a resistência do probiótico *in vitro*. Entretanto a recuperação de *L. rhamnosus* GG esteve próxima a 4 log ufc/g para todas as formulações nos períodos avaliados. Apenas no 7º dia de armazenamento a resistência *in vitro* do probiótico nas formulações contendo inulina, WC e WI superou em até 0,93 log ufc/g a formulação controle (isenta dos fatores estudados). A partir do estudo de microscopia, foi possível a visualização de *L. rhamnosus* em cultura pura e adicionado ao sorvete. O probiótico adicionado ao sorvete apresentou menos mudanças morfológicas, quando comparado a cultura pura. Dessa forma, o sorvete de açaí demonstrou ser uma matriz adequada como veículo do probiótico *L. rhamnosus* GG.

Palavras chave: Probiótico, sorvete de açaí, *Lactobacillus rhamnosus* GG, Simbiótico

Effect of inulin and milk whey proteins on *Lactobacillus rhamnosus* GG survival in synbiotic açai ice cream under simulated gastrointestinal conditions.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of the ingredients inulin, whey protein concentrate (WC), and whey protein isolate (WI) on the viability and the *in vitro* survival through *in vitro* simulated gastrointestinal tract (GIT) conditions of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG incorporated to açai ice cream. *L. rhamnosus* GG viability was stable in all formulations studied up to 112 days of frozen storage, preserving populations close to 9 log cfu/g. The probiotic strain showed higher survival to simulated GIT conditions when incorporated to açai ice cream, compared to fresh culture, indicating that the presence of the matrix contributed for the micro-organism survival. A reduction of at least 5 log cycles of *L. rhamnosus* GG was observed in all formulations after 6 hours of the *in vitro* assays for all storage periods evaluated. The addition of inulin, WC, and WI did not show any significant effect on the resistance of the probiotic in the *in vitro* assays. However, *L. rhamnosus* GG recovery was close to 4 log cfu/g for all formulations studied in evaluated periods. Nevertheless, on the 7th day of storage the probiotic *in vitro* resistance in formulations supplemented with inulin, WC, and WI exceeded up to 0.93 log cfu/g the control formulation (without these ingredients). Based on microscopy study, it was possible to visualize *L. rhamnosus* GG in pure culture and added to ice cream. Compared to the pure culture, fewer morphological changes were observed when the probiotic was added to ice cream. Thus, the açai ice cream was shown to be a suitable matrix for the probiotic *L. rhamnosus* GG strain.

Keywords: Probiotic, Açai ice cream, *Lactobacillus rhamnosus* GG, Synbiotic

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos probióticos destacam-se dentro da categoria de produtos funcionais, uma vez que ajudam a manter o equilíbrio da microbiota intestinal (AURELI et al., 2011), a partir desta premissa efeitos positivos na saúde são observados. A redução do risco de doenças intestinais, tais como, diarreia, síndrome do intestino irritável, constipação e doenças inflamatórias intestinais são alguns dos efeitos desejáveis relatados (SAAD et al., 2013). Outros benefícios atribuídos aos probióticos incluem redução de intolerância a lactose, aumento da biodisponibilidade de nutrientes, prevenção e redução de alergias, propriedades anticarcinogênica, hipocolesterolêmica, anti-hipertensiva e efeito imunomodulador (MASOOD et al., 2011; ARGYRI et al., 2013). Embora ainda não haja um consenso sobre a quantidade de células viáveis de probióticos a ser consumida para obter efeitos desejáveis à saúde (CHAMPAGNE et al., 2011), a manutenção da viabilidade celular durante o trânsito do trato gastrointestinal é essencial (FAO/WHO, 2002; PITINO et al., 2012).

A forma mais tradicional de se comercializar produtos probióticos é como produtos lácteos fermentados. Recentemente, novos produtos lácteos não fermentados, como queijos e sobremesas lácteas, estão sendo explorados como veículos de probióticos (PITINO et al., 2012). Entretanto, a incorporação de probióticos em uma matriz alimentar adequada é uma forma de potencializar a eficácia destes micro-organismos no organismo humano. Isto por que a composição dos alimentos pode fornecer uma proteção para os probióticos, reduzindo a sua exposição física ao ambiente adverso do trato gastrointestinal (RANADHEERA et al., 2010). Sorvetes surgem como um grande potencial para o uso como veículo de culturas probióticas, devido a sua composição, que inclui as proteínas do leite, gordura e lactose, assim como outros compostos (CRUZ et al., 2009; CRUZ et al., 2011). Além disso, fatores como armazenamento congelado e o pH mais elevado do produto podem favorecer a manutenção da viabilidade celular das culturas (CRUZ et al., 2011).

Mesmo no caso da viabilidade celular do probiótico no momento da ingestão do alimento ser alta, esse micro-organismo pode não conseguir sobreviver à digestão e, assim, a sua funcionalidade no intestino estará comprometida (MADUREIRA et al., 2011). Testes de simulações gastrointestinais *in vitro* têm sido desenvolvidos e aplicados para avaliar a característica da resistência de cepas probióticas e, ainda, seu desempenho em diferentes matrizes alimentares (ANDRIANTSOANIRINA et al., 2013; BEDANI et al., 2013). A

avaliação das propriedades probióticas das cepas inclui a determinação da tolerância ao ácido gástrico e bile. Apesar desses testes não serem totalmente adequados para prever a funcionalidade do probiótico no organismo humano, a seleção de uma matriz alimentar adequada que contribua para a tolerância do probiótico a condições gastrintestinais parece ser útil (BURITI et al., 2010).

Lactobacillus rhamnosus GG é uma cepa probiótica de origem humana com efeitos benéficos à saúde amplamente documentados (GORBACH e GOLDIN, 1992; HOJSAK et al., 2010). Segundo a *European Food Safety Authority* (EFSA, 2011) *L. rhamnosus* GG ajuda a manter a defesa contra patógenos intestinais, esta alegação de saúde refere-se à defesa contra patógenos intestinais na população em geral.

Resultados mostram que *L. rhamnosus* GG sobrevive ao trato gastrintestinal e consegue permanecer por alguns dias na microbiota do intestino, sem que haja nova suplementação oral. Esta característica parece ser importante na prevenção de certas doenças intestinais (GORBACH e GOLDIN, 1992; KUMPU et al., 2013). Em alguns países, esse probiótico tem sido largamente consumido desde 1990 através de produtos lácteos fermentados ou na forma de cápsula. Os resultados de estudos dose-resposta ainda são conflitantes, mas geralmente os ensaios clínicos utilizam a dose do micro-organismo na faixa de 10^8 - 10^{10} ufc/dia (TYNKKYNEN et al., 1998; SZAJEWSKA et al., 2011).

A inulina é um carboidrato não digerível que além do efeito prebiótico, pode exercer efeito de proteção sob micro-organismos durante o período de estocagem de alimentos probióticos, bem como durante a passagem através do trato gastrintestinal (BURITI et al., 2010; BEDANI et al., 2013). Esta proteção está associada com a resistência da inulina a hidrólise enzimática e com a capacidade de formação de um gel capaz de aprisionar água (FRANK, 2008; MEYER et al., 2011). Uma possível proteção física dada por esta estrutura que envolve a célula do probiótico dentro da matriz do alimento é sugerida em alguns trabalhos (FRANK et al., 2008; BURITI et al., 2010; BEDANI et al., 2013). Outros ingredientes como as proteínas do soro do leite (concentrados proteicos; isolados proteicos) podem desempenhar efeito protetor similar (DOHERTY et al., 2010), devido as propriedades físico-químicas que abrangem, formação de um gel coeso estável e capacidade tamponante. Essas propriedades poderiam auxiliar na manutenção da viabilidade celular ao longo da vida de prateleira, bem como a resistência do probiótico ao longo do trato gastrintestinal.

Com o intuito de agregar benefícios a saúde, grande interesse tem sido dado à incorporação de frutas tropicais no desenvolvimento de alimentos funcionais. O açaí (*Euterpe oleracea*) é uma fruta nativa da região norte da América do Sul que tem sido bastante estudada pelo potencial antioxidante e anti-inflamatório (RUFFINO et al., 2011; KANG et al., 2012,). O desenvolvimento de sorvete de açaí probiótico é uma possibilidade de fornecer tanto os benefícios atribuídos a esses micro-organismos como aqueles conferidos pela fruta.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da adição de inulina, concentrado (WC) e isolado (WI) proteico de soro de leite, em diferentes proporções, em sorvete de açaí sobre a viabilidade do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG incorporado ao produto e a sua resistência *in vitro* a condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento experimental

Foram realizados ensaios, no sentido de avaliar os fatores inulina (X_1), concentrado proteico de soro ($WC = X_2$) e isolado proteico de soro ($WI = X_3$), adicionados durante a fabricação do sorvete, em diferentes proporções, mas sempre totalizando 4% do total das formulações do produto. Foi utilizado o delineamento experimental para misturas simples (*centroid simplex*) incluindo um ponto axial, que corresponde a um ponto interno (escolhido aleatoriamente) ao simplex, a **Figura 1** apresenta o desenho experimental do planejamento adotado. O ponto axial adicionado ao planejamento foi realizado para posterior estudo estatístico mais detalhado (BOX e DRAPER, 1987; BARROS NETO, 2007). A **Tabela 1** mostra as diferentes formulações realizadas, dentro do planejamento experimental proposto.

Foi avaliada, ainda, uma formulação controle não adicionada dos ingredientes inulina, WC e WI ($X_1, X_2, X_3 = 0, 0, 0$).

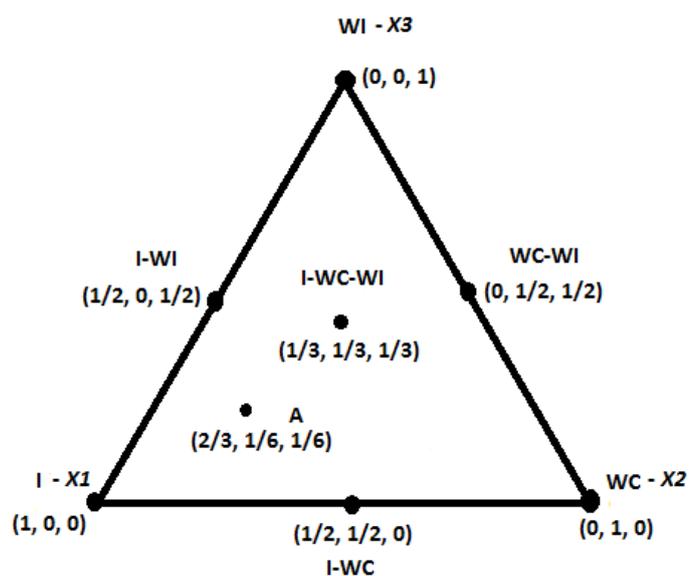


Figura 1 - Representação espacial das formulações de sorvete de açaí no planejamento adotado. Os vértices correspondem aos componentes (I, WC, WI) puros, os lados às misturas binárias dos componentes, e os pontos do interior do triângulo, a mistura dos três componentes, e os pontos do interior do triângulo, a mistura dos três ingredientes.

Tabela 1 - Delineamento experimental *centroid simplex* empregado na elaboração das formulações de sorvete de açaí estudadas.

Formulações	Proporção de cada ingrediente da mistura (X_1, X_2, X_3)	Quantidade de cada ingrediente (g) em 100 g de sorvete ¹		
		Inulina ² I (X_1)	WC ³ (X_2)	WI ⁴ (X_3)
I	(1, 0, 0)	4,00	0,00	0,00
WC	(0, 1, 0)	0,00	4,00	0,00
WI	(0, 0, 1)	0,00	0,00	4,00
I-WC	(1/2, 1/2, 0)	2,00	2,00	0,00
I-WI	(1/2, 0, 1/2)	2,00	0,00	2,00
WC-WI	(0, 1/2, 1/2)	0,00	2,00	2,00
I-WC-WI	(1/3, 1/3, 1/3)	1,33	1,33	1,33
A ⁵	(2/3, 1/6, 1/6)	2,60	0,70	0,70
C ⁶	---	0,00	0,00	0,00

¹Para cada 100 g de produto, 4 g da mistura total (inulina + WC +WI) foi adicionada aos demais ingredientes utilizados nas formulações de sorvete de açaí; ²Orafti®GR (Beneo-Orafti); ³Lacprodan 80® (Arlafoods); ⁴Lacprodan DI9224® (Arlafoods); ⁵formulação aleatória, ⁶formulação controle.

2.2 Obtenção do micro-organismo e preparo da cultura estoque

Para o preparo da cultura pura, o micro-organismo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG foi isolado a partir de cápsulas comerciais (Culturelle, Amerifit, EUA) e mantido em caldo MRS com glicerol (50% v/v) em temperatura de -80°C. A análise da sequência obtida a partir do gene 16S do RNA ribossômico da cultura estoque preparada demonstrou 99% de similaridade (nº de descrição do GenBank FM179322.1) com *Lactobacillus rhamnosus* GG quando submetida à comparação no programa BLASTn, o qual

utiliza-se do banco de dados NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). A ativação e preparo do pré-inóculo foi realizada com 1 mL da cultura estoque previamente ativada em caldo MRS por 20h a 37°C. O pré-inóculo (4% v/v) foi transferido para um volume maior de caldo MRS e incubado a 37°C por 16 h, até que se atingisse a fase exponencial, após este período o micro-organismo apresentou uma população de cerca de 10⁹ ufc/mL. Após a incubação, as células do micro-organismo foram colhidas por centrifugação (5251,4 g x 10 min) em centrífuga Sorvall (modelo RC-5C), lavadas em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%), repetindo-se o processo de centrifugação e lavagem duas vezes.

A cultura do micro-organismo *Lactobacillus rhamnosus* GG foi ressuspensa em leite em pó desnatado reconstituído estéril 10%. Posteriormente, essa cultura ativada foi adicionada à mistura para a elaboração do sorvete.

2.3 Fabricação do sorvete de açaí

De acordo com o planejamento experimental adotado e descrito na **Tabela 1**, as formulações de sorvete de açaí foram produzidas em lotes de 4 Kg. Os ingredientes listados na **Tabela 2** foram misturados até completa uniformização da massa em misturador Geiger UMMSK-12 (Geiger, Pinhais, Brasil;), após a sua pesagem e mistura manual prévia (primeiramente, ingredientes líquidos, depois sólidos e, por último, ingredientes lipídicos). A mistura obtida foi pasteurizada a 85°C por 25 segundos, no próprio misturador. A seguir, a temperatura da massa foi reduzida a 40°C, para a adição do leite contendo a cultura probiótica. Após esta etapa, a mistura foi transferida para cabine refrigerada a 4 °C (Metalfrio, São Paulo, Brasil) para maturação da calda por 20 horas. Posteriormente, foi transferida para sorveteira Skymesen BSK-16 (Metalúrgica Skymesen, Brusque, Brasil), onde ocorreram os processos de batimento e congelamento simultâneos, por 15 minutos. Decorrida essa etapa, o produto foi acondicionado em potes plásticos de polipropileno próprios para alimentos (68 mm de diâmetro, 32 mm de altura, 55 mL de volume total, Tries Aditivos Plásticos, São Paulo, Brasil), em porções de 20 g. Os produtos obtidos foram armazenados em congelador vertical (Metalfrio, São Paulo, Brasil) a -18 °C e foram analisados, quanto a viabilidade do probiótico, e pH do produto após 1, 7, 14, 28, 56, 84 e 112 dias, e a resistência do probiótico a condições gastrintestinais simuladas foram analisadas após 7, 28, 56, 84 e 112 dias.

Tabela 2 - Ingredientes fixos e variáveis e respectivas proporções, utilizados na produção das formulações de sorvete de açaí estudadas, de acordo com o planejamento experimental adotado e descrito na Tabela 1.

Ingredientes (%)	Formulações							A*	C**
	I	WC	WI	I-WC	I-WI	WC-WI	I-WC-WI		
Ingredientes fixos									
Polpa congelada de açaí ¹	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Leite em pó desnatado ²	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0
Sacarose ³	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Gordura Vegetal ⁴	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Glicose em pó ⁵	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
FOS ⁶	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Emulsificante/Estabilizante ⁷	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Cultivo de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG em leite	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Saborizante e aromatizante artificial de açaí ⁸	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Goma carragena ⁹	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Goma guar ¹⁰	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
Ingredientes variáveis									
Inulina (I)	4,0	-	-	2,0	2,0	-	1,33	2,6	-
WC	-	4,0	-	2,0	-	2,0	1,33	0,7	-
WI	-	-	4,0	-	2,0	2,0	1,33	0,7	-
Água	45,0	45,0	45,0	45,0	45,0	45,0	45,0	45,0	49,0
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

¹Polpa de açaí médio (Icefruit – Icefruit Comércio de alimentos, Tatuí, Brasil); ²Molico (Nestlé, Araçatuba, Brasil); ³Açúcar refinado (União, Limeira, Brasil); ⁴Gordura de palma 370SE (Agropalma, Belém, Pará); ⁵(Nutre, São Paulo, Brasil); ⁶Beneo® P95 (Orafit, Oreya, Bélgica); ⁷Emustab-Emulsificante e estabilizante neutro(Duas Rodas, Jaraguá do Sul, Brasil); ⁸Selecta tropical (Duas Rodas, Jaraguá do Sul, Brasil); ⁹Carrageenan(Danisco, Redhill, Reino Unido); ¹⁰Grindsted®Guar(Danisco, Redhill, Reino Unido); *A = formulação aleatória; **C = formulação controle.

2.4 Determinação do pH e viabilidade do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG

Os valores de pH foram obtidos das amostras de sorvetes de cada formulação produzida, em cada período de amostragem, em medidor de pH Orion Modelo Three Stars (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA) com a utilização de eletrodo tipo penetração para alimentos sólidos e semi-sólidos, modelo 2A04-GF (Analyser, São Paulo, Brasil).

Decorridos os tempos de armazenamento, porções de 10 g de sorvete (retiradas em condições de assepsia) foram homogeneizadas com 90 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}), utilizando-se um homogeneizador de amostras “Bag Mixer” (Interscience, St. Nom, França). Diluições decimais subsequentes foram preparadas, utilizando o mesmo diluente.

Para a enumeração de *L. rhamnosus* GG, foi utilizada a técnica de semeadura em profundidade (*pourplate*) de 1,0 mL de cada diluição em ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). A incubação foi realizada a 37°C por 72 h, em aerobiose.

2.5 Avaliação *in vitro* da resistência da cultura pura do probiótico *L. rhamnosus* GG às condições gástrica e entérica simuladas e durante a vida de prateleira dos sorvetes mantidos sob congelamento.

A avaliação da sobrevivência do probiótico em cultura pura e nos sorvetes de açaí congelados submetidos a condições gastrintestinais simuladas foi realizada de acordo com o método *in vitro* adaptado de LISERRE et al. (2007) com adaptações realizadas por BURITI et al. (2010), com a modificação para o pH 2,5 (estômago), ao invés de 1,5. De cada triplicata da diluição do sorvete de açaí e da cultura pura em solução de NaCl 0,85% (m/v), 10 mL foram transferidos para 3 frascos estéreis, totalizando 9 frascos contendo as amostras. Posteriormente, o pH foi ajustado para o intervalo de 2,3-2,6 com HCl 1N (Merck, cidade, país). Foram adicionadas as enzimas pepsina (pepsina obtida de mucosa gástrica suína, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e lipase (Amano lipase obtida de *Penicillium camemberti*, Sigma-Aldrich) em concentrações 3 g/L e de 0,9 mg/L, respectivamente. Todos os frascos foram incubados a 37°C, sob agitação de 150 rpm (Banho Metabólico Dubnoff MA-095, Marconi, Piracicaba, Brasil), durante 2 horas, representando a fase gástrica. Após este período, o pH das amostras foi ajustado para o intervalo entre 4,5 e 5,0, utilizando solução alcalina [150 mL de NaOH 1N (Synth, Diadema, Brasil) e 14 g de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$ (Synth) e

água destilada até 1 L]. Bile (bile bovina, Sigma-Aldrich) e pancreatina (pancreatina obtida de pâncreas suíno, Sigma-Aldrich) foram adicionadas em concentrações de 10 g/L e 1 g/L, respectivamente. As amostras foram, novamente, incubadas a 37°C, mantendo-se a agitação de 150 rpm por mais 2 horas, conduzindo a fase entérica 1. Na última etapa, o pH foi ajustado para o intervalo entre 6,5 e 7,5, utilizando a mesma solução alcalina da etapa anterior. Foram adicionadas, novamente, bile e pancreatina, afim de manter as concentrações de 10 g/L e 1 g/L, respectivamente. As amostras foram incubadas, novamente, a 37°C por 2 horas sob agitação, representando a fase entérica 2 e totalizando 6 horas de ensaio.

A quantificação da cepa probiótica *L. rhamnosus* GG foi realizada, utilizando alíquotas coletadas de cada triplicata de amostra, após 2 h, 4 h e 6 h (três diferentes frascos de cada formulação para cada tempo). Alíquotas de 1 mL foram semeadas em profundidade (*pourplate*) em ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). A incubação foi realizada a 37°C por 72 h, em aerobiose. Os resultados foram expressos como log ufc/ml.

2.6 Microscopia eletrônica de varredura

Para as análises de microscopia eletrônica de varredura foram comparadas *L. rhamnosus* GG em cultura pura e o probiótico na formulação I (4% de inulina). A escolha da formulação I para o estudo de microscopia baseou-se no fato de que em dois períodos de armazenamento estudados não foi possível a detecção do probiótico *L. rhamnosus* GG após a fase entérica I (4 horas de ensaio) para a referida formulação de sorvete. As amostras obtidas, conforme descrito na metodologia de resistência gastrointestinal simulada *in vitro*, foram centrifugadas a 5000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi suspenso em solução de NaCl (0,9% v/v) em uma concentração final de 5 log ufc/mL. Alíquotas de 1 mL da suspensão de células foram filtradas, utilizando uma membrana de 0,2 mm de tamanho (filtros de membrana Isopore, Milipore, Billerica, MA, EUA) e fixada durante 24 horas em solução de glutaraldeído 2% (v/v). Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes com água purificada (Mili-Q, Milipore), desidratadas com soluções de etanol, 25%, 50%, 75%, 90% e 95% e, finalmente, etanol 100% (três vezes) e secagem ao ponto crítico do CO₂. As membranas secas foram transferidas para bases de alumínio, por pulverização catódica revestida com ouro e analisadas, utilizando microscopia de varredura

eletrônica (JEOL JSM-7401F; JEOL, Tokyo, Japão) a 2,5 kV nas instalações do Instituto de Química (IQ) da Universidade de São Paulo, Brasil).

2.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Para a análise estatística, foi verificada a normalidade dos resultados, através do teste Hartley, com $\alpha = 0,05$. Foi constatada a distribuição normal dos resultados. Portanto, foi empregada a Análise de Variância (ANOVA), com utilização do teste de Tukey (teste de comparação de médias).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Valores de pH e viabilidade do probiótico

Os valores de pH das formulações de sorvete de açaí durante armazenamento congelado estão apresentados na **Tabela 3**, tendo variado de 5,58 a 6,03. Não foi verificada variação significativa ($p > 0,05$) para as formulações WI, WC-WI e I-WC-WI durante o período estudado. Entretanto, para as demais, um pequeno, porém significativo, aumento ($p < 0,05$) foi observado nos valores de pH. Estudos anteriores relatam que valores de pH de sorvetes produzidos com a adição de bactérias lácticas se mantiveram constantes ao longo do armazenamento (BASYGIT et al., 2006; FÁVARO-TRINDADE et al., 2007). Contudo, a presença de WC e WI nos sorvetes de açaí do presente estudo pode ter levado ao aumento dos valores de pH das formulações, uma vez que a presença desses ingredientes resulta em um aumento da capacidade tamponante do meio no qual é adicionado, devido às proteínas e fosfatos presentes (ANTUNES et al., 2005).

Para sorvetes não fermentados, os valores de pH normalmente descritos são em torno de 6,3. Esse valor está relacionado com a composição do sorvete. Assim, quanto maior a quantidade de sólidos não gordurosos do leite no produto, menor o valor de pH. A adição de polpa de frutas também influencia, uma vez que, quanto mais ácida for a fruta, mais baixo o valor de pH encontrado para o sorvete. Nesse sentido, é provável que os valores de pH encontrados possam estar relacionados à presença da polpa de açaí (pH $4,83 \pm 0,02$) (SUN-WATERHOUSE et al., 2013; GOFF e HARTELL, 2013).

Tabela 3 - Valores de pH para as formulações de sorvete de açaí armazenados sob congelamento ($-18 \pm 3^\circ\text{C}$) por até 112 dias. Vide **Tabela 1** para a descrição das formulações de sorvete de açaí.

Tempo (dias)	Formulações								
	I	WC	WI	I-WC	I-WI	WC-WI	I-WC-WI	A	C
1	$5,58 \pm 0,05^{\text{Bc}}$	$5,71 \pm 0,07^{\text{ABb}}$	$5,77 \pm 0,08^{\text{ABa}}$	$5,71 \pm 0,05^{\text{ABb}}$	$5,81 \pm 0,14^{\text{ABa}}$	$5,88 \pm 0,05^{\text{Aab}}$	$5,80 \pm 0,08^{\text{ABabc}}$	$5,80 \pm 0,03^{\text{ABc}}$	$5,67 \pm 0,16^{\text{ABb}}$
7	$5,58 \pm 0,08^{\text{Cc}}$	$5,75 \pm 0,06^{\text{Bab}}$	$5,66 \pm 0,04^{\text{BCa}}$	$5,75 \pm 0,10^{\text{Bb}}$	$5,79 \pm 0,07^{\text{Ba}}$	$5,75 \pm 0,07^{\text{Bab}}$	$5,70 \pm 0,03^{\text{BCc}}$	$5,96 \pm 0,02^{\text{Ab}}$	$5,70 \pm 0,18^{\text{BCb}}$
14	$5,66 \pm 0,12^{\text{Aabc}}$	$5,83 \pm 0,10^{\text{Aab}}$	$5,63 \pm 0,17^{\text{Aa}}$	$5,80 \pm 0,03^{\text{Aab}}$	$5,89 \pm 0,21^{\text{Aa}}$	$5,69 \pm 0,23^{\text{Ab}}$	$5,78 \pm 0,13^{\text{Aabc}}$	$6,03 \pm 0,03^{\text{Ba}}$	$5,80 \pm 0,09^{\text{Aab}}$
28	$5,62 \pm 0,04^{\text{Dbc}}$	$5,66 \pm 0,11^{\text{CDb}}$	$5,80 \pm 0,09^{\text{ABa}}$	$5,72 \pm 0,04^{\text{BCDb}}$	$5,71 \pm 0,13^{\text{BCDa}}$	$5,78 \pm 0,05^{\text{BCab}}$	$5,75 \pm 0,04^{\text{BCDbc}}$	$5,93 \pm 0,02^{\text{Ab}}$	$5,72 \pm 0,05^{\text{BCDab}}$
56	$5,70 \pm 0,07^{\text{Cab}}$	$5,78 \pm 0,05^{\text{ABCab}}$	$5,78 \pm 0,12^{\text{ABCa}}$	$5,75 \pm 0,04^{\text{BCb}}$	$5,91 \pm 0,21^{\text{ABa}}$	$5,92 \pm 0,04^{\text{Aab}}$	$5,92 \pm 0,09^{\text{ABa}}$	$5,93 \pm 0,02^{\text{Ab}}$	$5,81 \pm 0,04^{\text{ABCab}}$
84	$5,76 \pm 0,14^{\text{Aab}}$	$5,73 \pm 0,17^{\text{Aab}}$	$5,82 \pm 0,19^{\text{Aa}}$	$5,96 \pm 0,01^{\text{Aa}}$	$5,91 \pm 0,20^{\text{Aa}}$	$5,87 \pm 0,19^{\text{Aab}}$	$5,87 \pm 0,07^{\text{Aab}}$	$5,94 \pm 0,03^{\text{Ab}}$	$5,93 \pm 0,13^{\text{Aa}}$
112	$5,79 \pm 0,13^{\text{CDa}}$	$5,91 \pm 0,11^{\text{ABCa}}$	$5,79 \pm 0,09^{\text{CDa}}$	$5,70 \pm 0,01^{\text{Db}}$	$5,96 \pm 0,15^{\text{ABCa}}$	$6,00 \pm 0,16^{\text{ABa}}$	$5,76 \pm 0,05^{\text{CDbc}}$	$6,09 \pm 0,10^{\text{Aa}}$	$5,84 \pm 0,07^{\text{BCDab}}$

^{A,B,C} letras maiúsculas sobrescritas distintas indicam diferença significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes formulações para o mesmo período de amostragem; ^{a,b,c,d} letras minúsculas sobrescritas distintas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes períodos de amostragem para uma mesma formulação.

A **Tabela 4** apresenta as populações de *L. rhamnosus* GG (Lr GG) nas formulações de sorvete de açaí estudadas ao longo do armazenamento. A viabilidade do probiótico nos sorvetes esteve próxima a 9 log ufc/g ao primeiro dia de armazenamento para todas as formulações. Em geral, a adição de inulina, WC e WI não influenciou a viabilidade do probiótico durante o período de estocagem. Algumas variações na população de Lr GG foram observadas. Todavia, essas alterações não demonstram relevância microbiológica, uma vez que estas estiveram sempre abaixo de 0,5 log ufc/g.

A legislação brasileira preconiza uma quantidade mínima de 8 a 9 log ufc de bactérias probióticas viáveis por porção diária do alimento pronto para o consumo. Podemos observar que, para todas as formulações, a viabilidade do micro-organismo esteve acima do que é exigido pela legislação e o consumo de uma porção de sorvete 60 g já forneceria uma quantidade entre 9 a 10 log ufc de Lr GG.

Similarmente aos resultados obtidos no presente estudo, ALAMPRESE et al. (2005) observaram elevada taxa de sobrevivência de Lr GG por até 1 ano, sem decréscimo na população inicialmente inoculada (8 log ufc/g) em sorvete de creme não fermentado. Esses resultados demonstram o potencial tecnológico da cepa Lr GG para ser adicionada em sobremesas congeladas, sem que haja perda de viabilidade ao longo do armazenamento.

Alguns fatores podem afetar a viabilidade de probióticos em sorvetes. O estresse causado pelo congelamento pode resultar em danos à parede celular ou ruptura da membrana por conta dos cristais de gelo formados dentro e fora da célula. Além disso, os processos de batimento e congelamento também podem causar danos ao micro-organismo, podendo resultar na redução de viabilidade (CRUZ et al., 2009). Apesar disso, a viabilidade do probiótico Lr GG não foi afetada pelo processo de produção do sorvete, assim como relatado por DI CRISCO et al. (2010), que observaram manutenção da viabilidade celular de *L. casei* e *L. rhamnosus* quando incorporados em sorvete de creme de fruta e baunilha.

Por outro lado, a manutenção da viabilidade celular de probióticos parece ser cepa dependente, uma vez que PANDIYAN et al. (2010) observaram redução significativa na viabilidade de *L. acidophilus* em sorvete fermentado durante o processo de congelamento. Os autores alegaram que as etapas de fabricação do sorvete, incluindo estresse mecânico, processo de congelamento e incorporação de ar, influenciaram na perda de viabilidade do probiótico.

Tabela 4 - Viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* GG (log ufc/g) obtidas nas formulações de sorvete de açaí armazenadas sob congelamento (-18± 3°C) por até 112 dias. Vide **Tabela 1** para a descrição das formulações.

Tempo (dias)	Formulações								
	I	WC	WI	I-WC	I-WI	WC-WI	I-WC-WI	A	C
1	9,05 ± 0,09 ^{Aa}	9,07 ± 0,07 ^{Aabc}	9,01 ± 0,11 ^{ABab}	8,91 ± 0,06 ^{BCab}	9,01 ± 0,06 ^{ABab}	9,01 ± 0,14 ^{ABa}	9,10 ± 0,08 ^{Aa}	8,78 ± 0,08 ^{Ca}	8,89 ± 0,04 ^{ABab}
7	8,99 ± 0,03 ^{Aab}	9,09 ± 0,06 ^{Aab}	9,02 ± 0,11 ^{Aab}	8,95 ± 0,11 ^{Aa}	9,00 ± 0,08 ^{Aabc}	9,04 ± 0,18 ^{Aa}	9,00 ± 0,03 ^{Abc}	8,78 ± 0,19 ^{Ba}	9,01 ± 0,15 ^{Aa}
14	9,00 ± 0,05 ^{Aab}	9,11 ± 0,09 ^{Aa}	9,02 ± 0,08 ^{Aab}	9,04 ± 0,19 ^{Aa}	9,10 ± 0,14 ^{Aa}	8,98 ± 0,08 ^{Aa}	9,04 ± 0,05 ^{Aab}	8,73 ± 0,12 ^{Ba}	9,02 ± 0,14 ^{Aa}
28	9,00 ± 0,11 ^{Aa}	9,02 ± 0,06 ^{ABabc}	9,07 ± 0,10 ^{Aa}	8,92 ± 0,08 ^{Bab}	8,91 ± 0,07 ^{Bbc}	8,98 ± 0,11 ^{ABa}	8,98 ± 0,07 ^{ABbc}	8,74 ± 0,18 ^{Ca}	8,96 ± 0,07 ^{ABab}
56	8,92 ± 0,08 ^{ABb}	9,01 ± 0,06 ^{Abc}	8,97 ± 0,10 ^{Aab}	8,91 ± 0,08 ^{ABab}	8,91 ± 0,12 ^{ABbc}	8,99 ± 0,13 ^{Aa}	8,96 ± 0,09 ^{Abc}	8,82 ± 0,08 ^{Ba}	8,90 ± 0,08 ^{ABab}
84	9,01 ± 0,05 ^{Aab}	9,06 ± 0,10 ^{Aabc}	8,91 ± 0,06 ^{Bb}	8,95 ± 0,10 ^{Ba}	8,89 ± 0,09 ^{Bc}	8,93 ± 0,13 ^{Bab}	8,93 ± 0,08 ^{Bc}	8,81 ± 0,06 ^{Ca}	8,83 ± 0,18 ^{Cb}
112	8,93 ± 0,11 ^{ABb}	8,99 ± 0,04 ^{Ac}	8,90 ± 0,07 ^{ABb}	8,81 ± 0,05 ^{BCb}	8,92 ± 0,06 ^{Abc}	8,82 ± 0,07 ^{Bb}	8,97 ± 0,07 ^{Abc}	8,78 ± 0,07 ^{Ca}	8,84 ± 0,06 ^{Bb}

^{A,B,C} letras maiúsculas sobrescritas distintas indicam diferença significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes formulações para o mesmo período de amostragem; ^{a,b,c,d} letras minúsculas sobrescritas distintas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes períodos de amostragem para uma mesma formulação.

Apesar de o sorvete ser uma matriz alimentar que normalmente apresenta potencial como veículo de bactérias probióticas, alguns fatores como congelamento podem ocasionar dano celular, levando à morte das células. Alguns trabalhos relatam perda de viabilidade de micro-organismos em sorvetes armazenados sob congelamento (HEKMAT e MACMAHON, 1992; AKIN et al., 2007). Entretanto, a sobrevivência bacteriana também está fortemente relacionada com a composição do meio (SUCCI et al., 2007). AKALIN e ERISIR (2008) observaram que a adição de prebióticos (inulina e oligofrutose) a formulações de sorvetes contribuíram para a sobrevivência das culturas probióticas *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis* Bb-12 durante armazenamento congelado. Em nosso estudo, os fatores inulina, WC e WI não afetaram a viabilidade celular. Entretanto, a formulação controle (ausente dos fatores), também não demonstrou decréscimo de viabilidade do probiótico, o que indica que a composição fixa do sorvete de açaí pode ter auxiliado para a sobrevivência do micro-organismo.

SAGDIC et al. (2012) demonstraram que é possível a produção de sorvete probiótico utilizando *L. casei* Shirota suplementado com compostos fenólicos. O micro-organismo demonstrou boa adaptação ao meio, com elevada sobrevivência (viabilidade ao redor de 7, 21 log ufc/mL) observada por um período de 60 dias. Alguns autores encontraram grande variabilidade na estabilidade de cepas probióticas em polpas de frutas (VINDEROLA et al., 2002; CELIK e BAKIRCI, 2003). CHAMPAGNE e GARDNER (2008) observaram melhor viabilidade de *L. rhamnosus* comparado a *L. acidophilus*, em sucos de frutas refrigerados (4°C) por um período de 80 dias. Em sucos de frutas tropicais, a viabilidade de probióticos demonstra ser linhagem dependente. Estudos conduzidos com suco de melão, caju e abacaxi, observaram crescimento e manutenção da viabilidade de *L. casei* (PEREIRA et al., 2011; FONTELES et al., 2011; COSTA et al., 2013). Entretanto, sucos de abacaxi e Kiwi apresentaram efeito negativo na sobrevivência de *L. acidophilus* (VINDEROLA et al., 2002). No presente estudo, o probiótico Lr GG demonstrou boa adaptação a polpa de açaí, corroborando com Espírito Santo et al. (2010), que observaram aumento na viabilidade *L. acidophilus* L10, *B. animalis* ssp. *lactis* B104 e *B. longum* B105 em leite adicionado de polpa de açaí ao final de 28 dias de armazenamento refrigerado.

3. 2 Sobrevivência de *L. rhamnosus* GG frente às condições gastrintestinais simuladas *in vitro*

A sobrevivência de *Lactobacillus rhamnosus* GG nas formulações de sorvete de açaí e em cultura pura submetida às condições gástricas entéricas simuladas *in vitro* é apresentada na **Tabela 5** e **Figuras 1 (i, ii, iii, iv, v)**. Comparando a sobrevivência de Lr GG em cultura pura e nas formulações de sorvete de açaí, observa-se que a presença da matriz contribuiu para a sobrevivência do probiótico em todos os períodos estudados.

De um modo geral a população de *L. rhamnosus* GG reduziu significativamente ($p < 0,05$) em pelo menos 5 ciclos logaritmos, após 6 horas de simulação gastrintestinal nas diferentes formulações em todos os períodos estudados. Na etapa gástrica (após 2 h de ensaio) a queda da viabilidade foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para todas as formulações, com redução na faixa de 4 a 5 log. Em alguns períodos de armazenamento estudados, não foi possível contabilizar a viabilidade do probiótico em algumas das formulações, I e WC (7 dias), I, WI, I-WC e WC-WI (28 dias), WI e WC-WI (56 dias), após 4 h de ensaio (fase entérica I). Entretanto, na etapa seguinte o micro-organismo pode ser recuperado, com o aumento do pH entre 6,5-7,5 (fase entérica II). Essa recuperação em alguns casos não demonstrou diferença significativa ($p > 0,05$) do valor encontrado na etapa gástrica (2h).

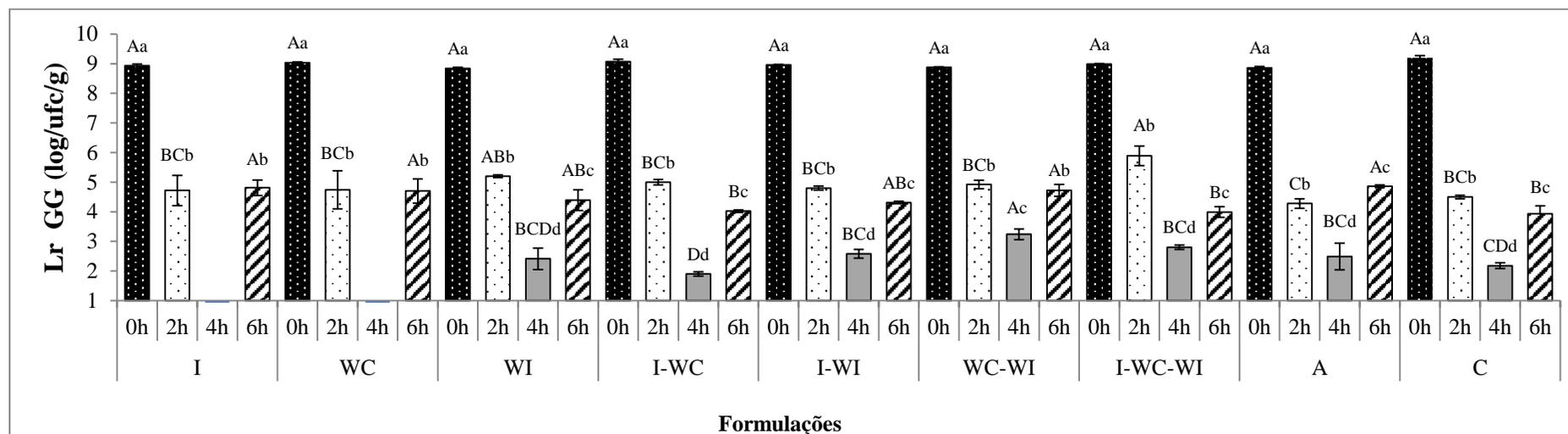
No 7° dia de armazenamento, as formulações I, WC, WC-WI e A apresentaram maior sobrevivência ($p < 0,05$) de Lr GG, 4,80 log ufc/g, 4,70 log ufc/g, 4,72 log ufc/g e 4,86 log ufc/g, respectivamente, após 6 h de ensaio, comparado a formulação controle F9 (3,93 log ufc/g). Entretanto, esse comportamento não foi reproduzido nos demais períodos de armazenamento estudados. Desse modo, não foi demonstrado efeito protetor dos fatores inulina, WC e WI, em suas diferentes proporções, sobre o probiótico ao final do teste de simulação gastrintestinal. Aos 112 dias de armazenamento, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as formulações quanto à viabilidade do probiótico após as 6 h de ensaio, com valores expressos entre 4,3 log ufc/g e 4,74 log ufc/g.

Tabela 5 - Populações de *L. rhamnosus* GG, em cultura pura, frente às condições gastrintestinais simuladas *in vitro*

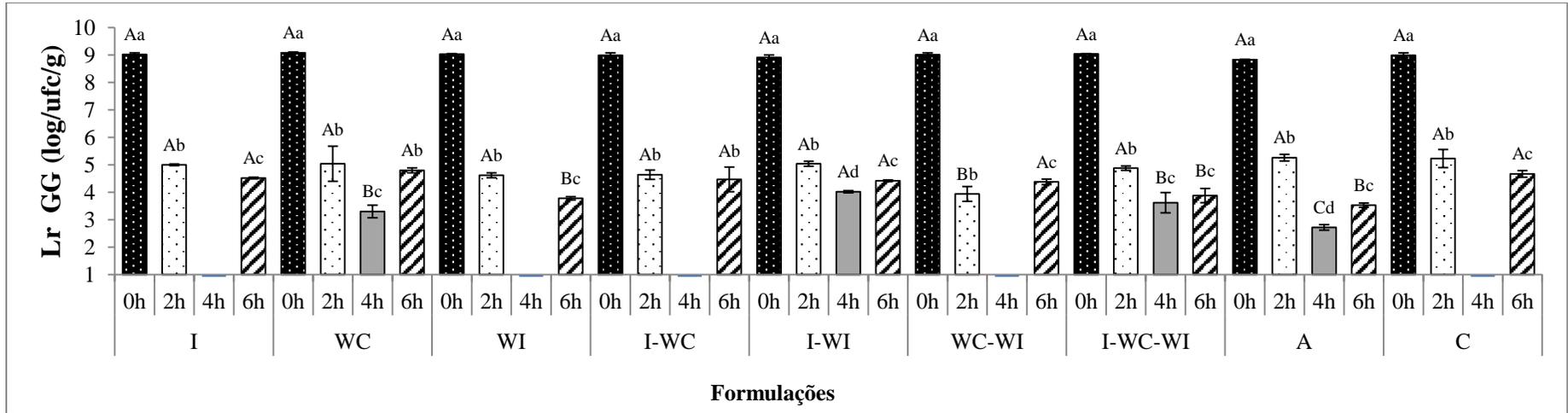
Tempo (h)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (log ufc/ml)
0	9,17 ± 0,18
2	4,80 ± 0,35
4	<1,00
6	2,86 ± 0,24

Valores expressos como média ± desvio padrão

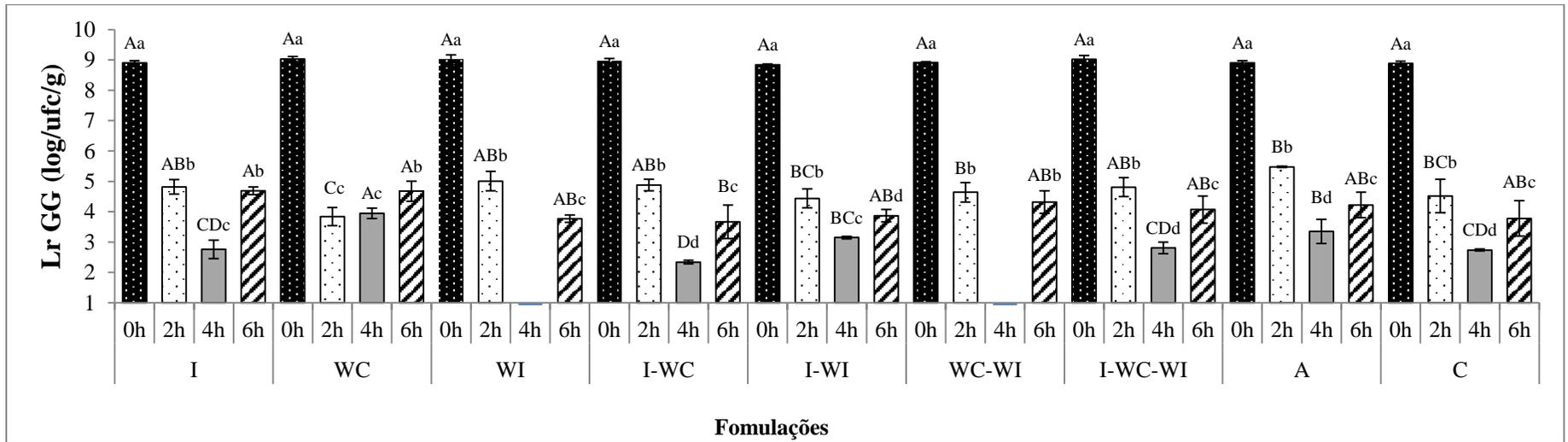
(i)



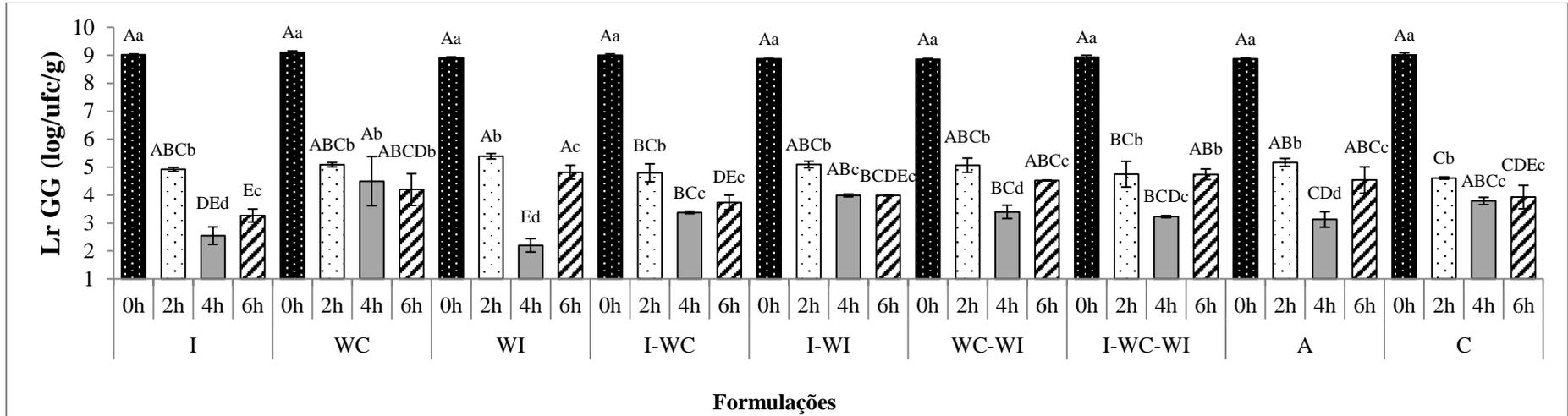
(ii)



(iii)



(iv)



(v)

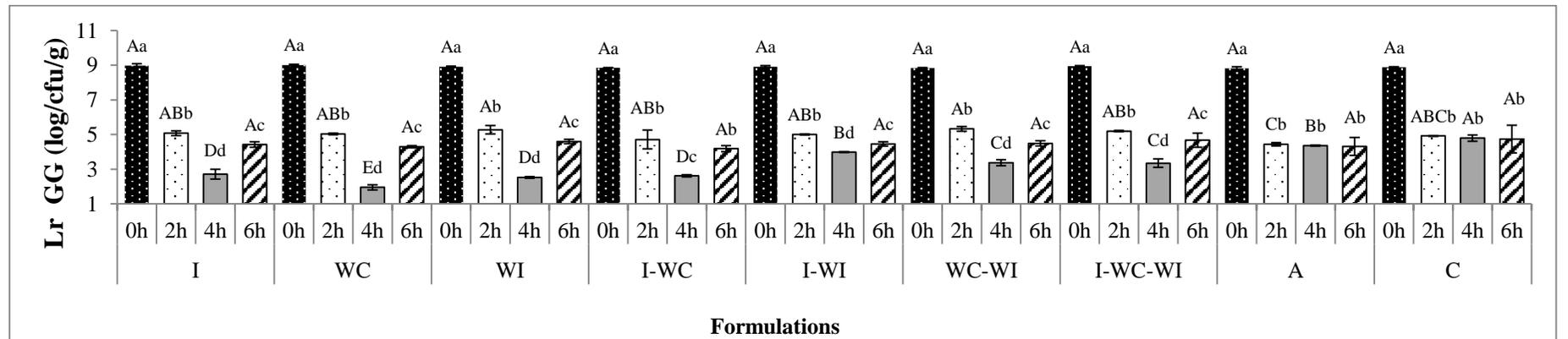


Figura 2 - Sobrevivência de *L. rhamnosus* GG (log ufc/ g) nas formulações de sorvete de açaí, após 7, 28, 56, 84 e 112 dias (i, ii, iii, iv, v, respectivamente) antes (0 h) e durante exposição gástrica (2 h) e entéricas (4 h e 6 h) simuladas *in vitro*. ^{A,B,C} letras maiúsculas sobrescritas distintas indicam diferença significativa (p<0,05) entre as diferentes formulações para o mesmo período de amostragem do ensaio *in vitro*; ^{a,b,c,d} letras minúsculas sobrescritas distintas indicam diferença significativa (p<0,05) entre os diferentes períodos de amostragem do ensaio *in vitro* para uma mesma formulação

O efeito protetor da matriz alimentícia sobre o probiótico, comparado à cultura pura, ao ambiente hostil do trato gastrointestinal tem sido relatado por outros autores (SHARP et al., 2008; WANG et al., 2009; BEDANI et al., 2013). A ação tamponante conferida pelos alimentos de base láctea é descrita como um possível efeito protetor. Adicionalmente, outros componentes, como a gordura, podem promover um ambiente mais favorável para a passagem dos micro-organismos pelo trato gastrointestinal (PITINO et al., 2012).

Em nosso estudo, o probiótico *L. rhamnosus* GG demonstrou melhor sobrevivência às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*, quando incorporado aos sorvetes comparado à cultura pura. Esses resultados estão de acordo com WANG et al. (2009), que relataram melhor taxa de sobrevivência de *L. casei* Zhang (submetido a suco gástrico simulado pH 2), quando esse micro-organismo esteve presente em leite bovino fermentado, quando comparado à cultura pura. Em produto fermentado à base de soja, BEDANI et al. (2013) relataram melhor sobrevivência às condições gastrointestinais simuladas *in vitro* dos probióticos *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis* Bb-12, comparado a esses micro-organismos em cultura pura. SAXELIN et al. (1993) observaram aumento na concentração fecal de *L. rhamnosus* GG, quando o micro-organismo foi administrado oralmente através de leite fermentado, comparado ao mesmo probiótico administrado na forma de pó liofilizado. Os autores alegam que a capacidade tamponante do leite fermentado pode promover estabilidade da cepa as condições gastrointestinais, quando comparado à sua administração na forma liofilizada.

Apesar da redução significativa ($p < 0,05$) da viabilidade do probiótico na etapa gástrica, a identificação do micro-organismo no meio de cultivo não foi prejudicada. Entretanto, esse comportamento não foi observado na etapa entérica I, pois em alguns casos, Lr GG não foi identificado pela técnica de cultivo empregada. Alguns autores atribuem essa observação ao estresse causado pelo ambiente ácido e condições arbitrarias do meio, que podem promover alteração da atividade metabólica da célula do micro-organismo, o que limita a capacidade da formação de colônias. Este fato pode afetar a identificação, uma vez que a célula bacteriana entra em um estado de células viáveis, mas não cultiváveis, em resposta à lesão temporária (OLIVER et al., 2005; BURITI et al., 2010; VILARREAL et al., 2013).

Todas as formulações de sorvete desenvolvidas mantiveram quantidades próximas a 9 log ufc/g do probiótico pelo período de 112 dias de armazenamento. Após as 6 h de ensaio de resistência às condições gastrointestinais simuladas, esses valores reduziram para,

aproximadamente, 4 log ufc/g. A dose a ser consumida para se ter um efeito desejado na saúde ainda é bem discutida. Entretanto, alguns estudos indicam que fatores como tipo de linhagem e a matriz alimentícia podem influenciar nesta dosagem (RANADHEERA et al., 2010; CHAMPAGNE et al., 2011; AURELI et al., 2011).

De acordo com a legislação brasileira, os micro-organismos probióticos devem alcançar uma quantidade mínima situada na faixa de 10^8 a 10^9 unidades formadoras de colônias (ufc) na recomendação diária do produto pronto para o consumo. Segundo a mesma legislação, valores menores podem ser aceitos, necessitando da comprovação de sua eficácia. Um estudo de dose resposta conduzido com cultura de *L. rhamnosus* GG liofilizada, indicou que consumo de 10 log ufc/g bactérias por dia é necessário para detectar esta linhagem nas fezes (SAXELI et al., 1991). No entanto, um estudo clínico posterior demonstrou que o probiótico *L. rhamnosus* GG foi recuperado em fezes, após o consumo de uma dose bem inferior a 8 log ufc/g quando consumido através de leite (HATAKKA et al., 2001, SAXELIN et al. 2010). MADUREIRA et al. (2011) relatam que alguns micro-organismos, uma vez atingindo a porção final do intestino delgado e grosso, possuem a capacidade de se aderir a parede do intestino e desempenhar suas atividades biológicas desejadas. Essa propriedade de aderência às células intestinais tem sido bem descrita para o probiótico *L. rhamnosus* GG (SAXELIN et al., 1993; DEEPIKA et al., 2009). Ainda, o efeito complementar do prebiótico fruto-oligossacarídeo que foi incorporado em todas as formulações dos sorvetes como ingrediente fixo poderia auxiliar na multiplicação do Lr GG e posterior colonização do mesmo na mucosa do intestino.

De um modo geral, a adição dos fatores inulina, WC e WI nos sorvetes de açaí não foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quanto à sobrevivência de *L. rhamnosus* GG frente às condições gástricas e entéricas simuladas. Entretanto, aos 84 dias de armazenamento dos sorvetes, a formulação contendo 4% de WC demonstrou maior viabilidade igual (4,50 log ufc/g) ($p < 0,05$) após a fase entérica I, comparada às demais formulações, que demonstraram valores na faixa de 2,55 log ufc/g a 3,99 log ufc/g. CRITTENDEN et al. (2006) e DOHERTY et al. (2010) sugeriram que a presença de proteína nas formulações protege o probiótico contra o estresse ácido do trato gastrointestinal. Alguns estudos demonstram a efetividade de proteínas do leite em proteger as células de probióticos ao ambiente arbitrário encontrado através da digestão. Entretanto, esses estudos fazem aplicação de microcápsulas dessas proteínas como agentes microencapsulantes (DOHERTY et al., 2011). BURGAIN et al. (2013) relataram que a melhor formulação para a produção de micropartículas capazes de

proteger Lr GG às condições gástricas simuladas consistiu de micelas de caseínas e proteínas do soro de leite.

Trabalhos que comprovam a efetividade de inulina e proteínas de soro incorporadas aos alimentos na proteção gástrica e entéricas de probióticos ainda são poucos. Entretanto, BURITI et al. (2010) demonstraram que inulina combinada com gordura de creme de leite foi mais favorável a sobrevivência de *L. acidophilus* presente em musses de goiaba congeladas submetidas às condições gastrintestinais simuladas *in vitro*, comparado a inulina adicionada com WC.

Adicionalmente, MANTZOURIDOU et al., 2012 demonstrou que uma emulsão de molho para salada incorporada de inulina proporcionou ambiente favorável para a viabilidade da cultura probiótica *L. paracasei* durante o período de armazenamento, e a capacidade da cepa de sobreviver ao ataque de enzimas do trato gastrintestinal também favorecida.

3.3 Microscopia eletrônica de varredura das fases do ensaio das condições gastrintestinais simuladas *in vitro* de *L. rhamnosus* GG em cultura pura e incorporada em sorvete de açaí.

As **Figuras 3 e 4** mostram as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura do probiótico *L. rhamnosus* GG, em cultura pura e incorporada em sorvete simbiótico de açaí na formulação I (4% de inulina), antes, durante e após os ensaios das condições gastrintestinais simuladas *in vitro*.

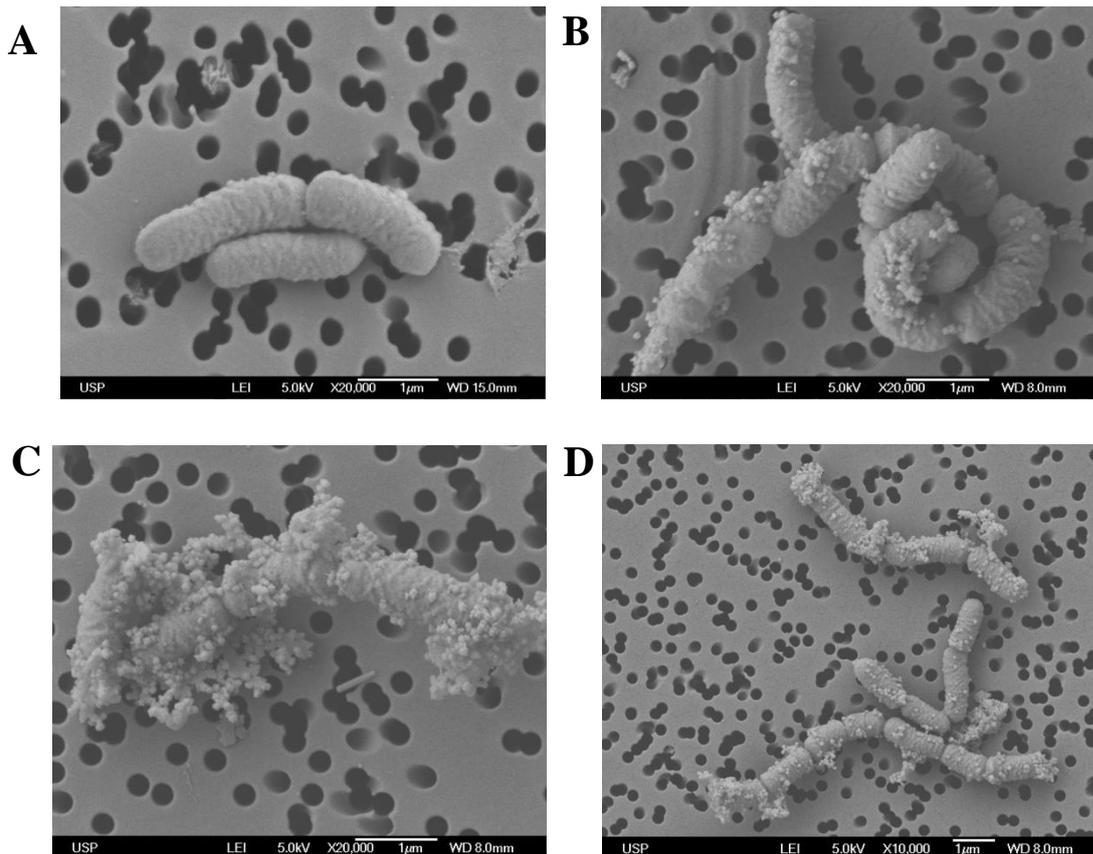


Figura 3 - Mudanças morfológicas de *L. rhamnosus* GG em cultura pura durante o ensaio das condições gastrintestinais simuladas *in vitro*. Ao longo do experimento, foram obtidas imagens do tempo zero (células não tratadas) (A); após 2 horas, fase gástrica (pH 2,3-2,6 na presença de pepsina e lipase) (B); após 4 horas, fase entérica I (pH 5,5-6,5 na presença de bile e pancreatina) (C); após 6 horas, fase entérica II (pH 6,5-7,5 na presença de bile e pancreatina) (D).

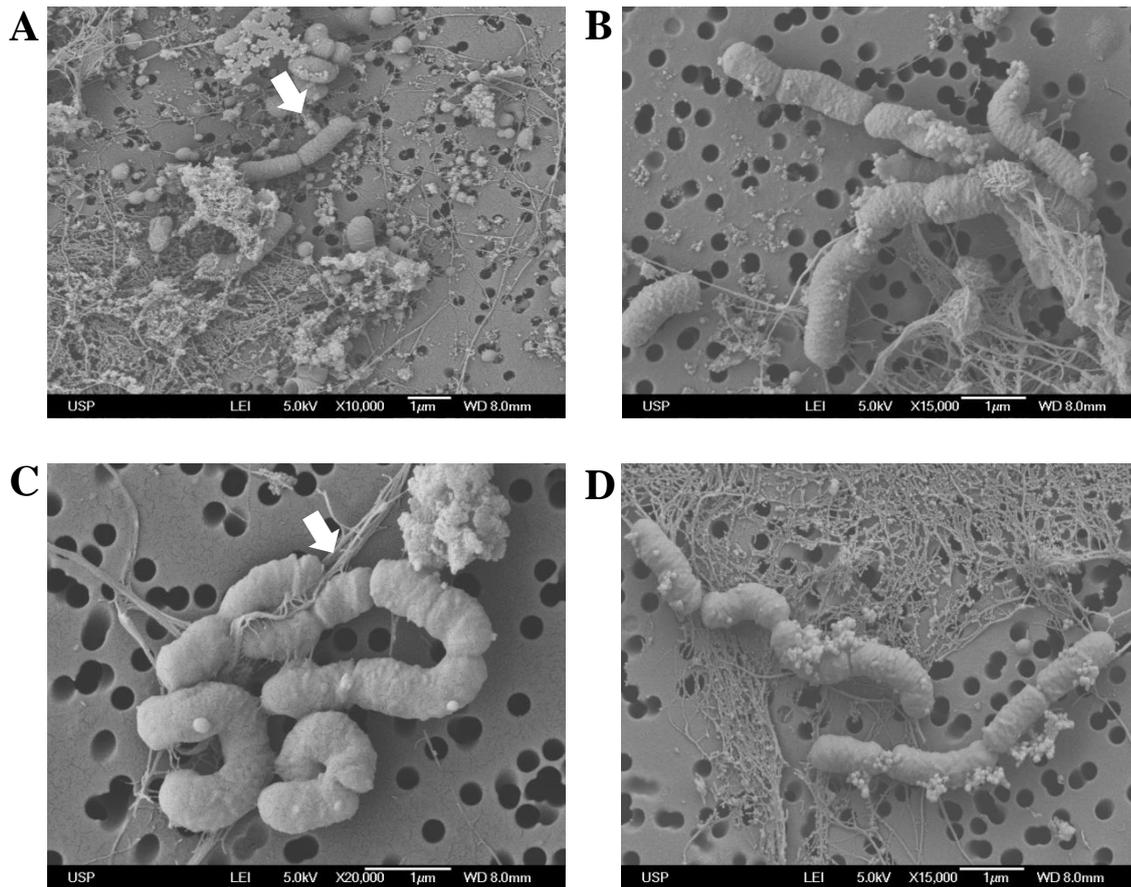


Figura 4 - Mudanças morfológicas de *L. rhamnosus* GG incorporada em sorvete de açaí com 4% de inulina (formulação I) durante o ensaio das condições gastrintestinais simuladas *in vitro*. Ao longo do experimento, foram obtidas imagens do tempo zero (células não tratadas) (A); após 2 horas, fase gástrica (pH 2,3-2,6 na presença de pepsina e lipase) (B); após 4 horas, fase entérica I (pH 5,5-6,5 na presença de bile e pancreatina) (C); após 6 horas, fase entérica II (pH 6,5-7,5 na presença de bile e pancreatina) (D).

A figura 3A apresenta a célula de *L. rhamnosus* GG (Lr GG) em cultura pura, no tempo 0, ou seja, antes de ser submetida ao ensaio gastrintestinal simulado. Podemos observar que a célula está íntegra e em formato de bastonete, característico do gênero *Lactobacillus*. Ao longo do ensaio, podemos observar que o probiótico Lr GG sofre mudanças morfológicas. Após a fase gástrica (figura 3B), a morfologia da célula bacteriana muda, perdendo a sua forma inicial de bastonete e parece se encurvar sobre si mesma. Nesta mesma fase, podemos observar o acúmulo de uma substância sobre a célula que, provavelmente consiste de conteúdo intracelular que migra para fora, em virtude do estresse ao qual as células foram submetidas. Na fase seguinte, figura 2C, essa substância parece se pronunciar e ficar aderida sobre toda a célula a ponto de não conseguirmos visualizar a membrana. Curiosamente, nesta fase, que simula a fase entérica I, não foi possível a quantificação das células de Lr GG pela

técnica de cultivo empregada no presente estudo. Ao final do ensaio com a cultura pura (figura 2D), podemos observar algumas células da cultura pura de Lr GG intactas, porém ainda com algum material aderido a sua superfície.

Diferentemente do que foi observado em cultura pura, o probiótico Lr GG adicionado ao sorvete aparece em meio a algumas substâncias que, possivelmente, fazem parte da formulação do sorvete de açaí. As células de Lr GG apresentam menos mudanças morfológicas após a fase gástrica (figura 4B) e é visível nas imagens a presença de um material com aspecto de fibra que, em alguns casos, parece recobrir as células. A maior mudança morfológica pode ser observada, na etapa entérica I (Figura 4C), onde a célula se mostra encurvada e em alguns casos murcha. Nesta mesma etapa também é observado o material fibroso que envolve a célula. Na etapa seguinte, fase entérica II (Figura 4D), observa-se algumas células ainda encurvadas, porém seu aspecto de bastonete ainda está bem pronunciado. O material aderido à célula do probiótico que foi observado também na cultura pura aparece em maior quantidade na fase final do estudo (figura 4D), porém em menor quantidade comparado à cultura pura.

A habilidade de persistir às condições adversas do trato gastrointestinal (TGI) é uma das características vitais que permite uma bactéria probiótica sobreviver e transitoriamente colonizar o intestino do hospedeiro (THOMPCKINS et al., 2011; RANADHEERA et al., 2012). Relata-se que o ambiente arbitrário do TGI afeta a estrutura da superfície celular, influenciado pela regulação da expressão de algumas proteínas. Os lactobacilos desempenham algumas propriedades de adaptação que são importantes para a sobrevivência dessas bactérias no estômago e no intestino (KOSKENNIEMI et al., 2011). Conforme observado no presente trabalho já na etapa do teste *in vitro*, no caso da cultura pura do probiótico Lr GG, e nas etapas finais, no caso da proteção conferida pelo produto alimentício testado, de acordo com SENGUPTA et al. (2013), o revestimento celular externo é o primeiro alvo do estresse físico-químico e ambiental o qual os lactobacilos encontram no TGI.

Fatores como baixo pH, presença de sais biliares, estresse oxidativo, estresse osmótico e falta de nutrientes levaram os lactobacilos a desenvolverem mecanismos de adaptação para sobrevivência frente a estas condições. Algumas respostas que permitem às células dos probióticos resistirem e se adaptarem ao ambiente do TGI são relatadas, como: biossíntese de exopolissacarídeos (EPS), formação de biofilmes, regulação da síntese proteica

e produção de Poli-P. Entretanto esses mecanismos de adaptação parecem ser cepa dependente (SCILIANO et al., 2012; SENGUPTA et al., 2013; ALCÁNTARA et al., 2014).

Em estudo realizado por KOSKENNIEMI et al. (2011), foram observadas alterações na expressão de genes associados a vias que contribuíram para a adaptação de Lr GG ao estresse causado pelos sais biliares. Os autores observaram, também, uma diminuição da biossíntese de exopolissacarídeo por parte das células do probiótico, quando expostas aos sais biliares. Os autores discutiram que este evento, de alguma forma, melhoraria as propriedades de adesão e persistência do probiótico no intestino. De acordo com LEEBER et al. (2007), condições como baixo pH e presença de ácidos biliares podem afetar significativamente a superfície celular de Lr GG e podem modular a formação de biofilme por este probiótico. Os autores comentaram que a formação de biofilme faz parte do nicho dos lactobacilos, uma vez que são importantes para a colonização e adesão ao TGI.

Polifosfatos inorgânicos (Poli-P) são moléculas presente em organismos vivos que consistem de cadeias lineares de fosfatos, unidas por ligações fosfoanidros. Poli-P inicialmente foi considerada uma molécula de armazenamento de energia para bactérias. Entretanto, estudos posteriores demonstraram seu envolvimento em diversos processos fisiológicos e regulatórios das células bacterianas (ALCANTARA et al., 2014). Recentemente, essa molécula tem sido associada com respostas a estresses oxidativo, ácido, osmótico e proveniente da falta de nutrientes em bactérias lácticas e probióticas. Um estudo identificou a síntese de Poli-P extracelular por *L. brevis* e este fator esteve associado à manutenção da homeostase da célula frente às condições do trato gastrointestinal (SEGAWA et al., 2011). ALCANTARA et al. (2014) investigaram 20 espécies de *Lactobacillus* quanto a formação de Poli-P. Através desse estudo, foi possível constatar a presença de grânulos de Poli-P e sua correlação com a presença dos genes que codificam a enzima polifosfato quinase (enzima envolvida na conversão de Poli-P) em *Lactobacillus rhamnosus* GG.

O material granular visualizado nas imagens do probiótico Lr GG em cultura pura e adicionado ao sorvete, provavelmente está ligado a algum mecanismo de resposta ao estresse que este probiótico sofreu ao longo do ensaio gastrointestinal simulado. Através das imagens também foi possível observar que as células de Lr GG modificaram sua morfologia em algumas etapas do ensaio *in vitro*. Entretanto, não foram observadas células rompidas. Esses fatores podem explicar a perda temporária da capacidade de multiplicação em meio de cultivo, uma vez que o probiótico entra em um estado de células viáveis, porém não

cultiváveis (VILARREAL et al., 2013). Na fase do ensaio *in vitro* em que o micro-organismo resultou em maior dificuldade de detecção em meio de cultivo (MRS) coincidiu com as imagens em que observamos maiores mudanças morfológicas e acúmulo de uma substância que recobria a célula do probiótico.

4 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a viabilidade de *L. rhamnosus* GG nas nove formulações de sorvete de açaí desenvolvidas manteve-se estável até os 112 dias de armazenamento congelado, com populações médias iniciais de 9 log ufc/g, não sendo observada redução significativa desta viabilidade ao longo do estudo. Apesar do efeito protetor dos ingredientes inulina, WC e WI incorporados aos sorvetes não apresentarem significância estatística ($p > 0,05$), a matriz do sorvete de açaí melhorou a sobrevivência de *L. rhamnosus* GG, o qual apresentou populações médias de 4,30 log ufc/g, comparado à cultura fresca, que demonstrou sobrevivência de 2,86 log ufc/g, quando submetidos à resistência gastrintestinal *in vitro*.

A partir do estudo de microscopia de varredura foi possível visualizar as células de *L. rhamnosus* GG nas diferentes fases do ensaio gastrintestinal simulado. As mudanças morfológicas e o acúmulo de uma substância sobre as células do probiótico, possivelmente ocorreu como mecanismo de defesa ao estresse causado pelo ensaio gastrintestinal simulado. Foi possível observar que a matriz do sorvete pode servir como uma barreira física que protege a célula do probiótico das condições do trato gastrintestinal. Portanto, o sorvete de açaí pode ser considerado como um bom veículo da cultura probiótica *L. rhamnosus* GG e pode desempenhar um papel importante na sua proteção contra condições adversas encontradas através do trato digestivo. Entretanto, mais pesquisas serão necessárias para otimizar a sobrevivências de *L. rhamnosus* GG *in vitro* e, ainda, para se estabelecer qual a população sobrevivente do probiótico no organismo que resulta em efeitos benéficos à saúde humana.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 the physical and sensory characteristics in probiotic ice cream. **Food Chemistry**, v.104, n.1, p.93-99, 2007.

ALCÁNTARA, C.; BLASCO, A.; ZUÑIGA, M.; MONEDERO, V. Accumulation of polyphosphate in *Lactobacillus* spp. and its involvement in stress resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, v.80, n.5, p.1650-1659, 2014.

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

ANDRIANTSOANIRINA, V.; ALLANO, S.; BUTEL, M.J.; AIRES, J. Tolerance of *Bifidobacterium* human isolates to bile, acid and oxygen. **Anaerobe**, v.21, p.39-42, 2013.

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

ARGYRI, A.A.; ZOUMPOPOULOU, G.; KARATZAS, K.-A.G.; TSAKALIDOU, E.; NYCHAS, G.-J.E.; PANAGOU, E.Z.; TASSOU, C.C. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. **Food Microbiology**, v.33, n.2, p.282-291, 2013.

AURELI, P.; CAPURSO, L.; CASTELLAZZI, A.M.; CLERICI, M.; GIOVANNINI, M.; MORELLI, L.; POLI, A.; PREGLIASCO, F.; SALVINI, F.; ZUCCOTTI, G.V. Probiotics and health: an evidence-based review. **Pharmacological Research**, v.63, n.5, p.366-376, 2011.

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

BEDANI, R.; ROSSI, E.A.; SAAD, S.M.I. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v.34, n.2, p.382-389, 2013.

BURGAIN, J.; GAIANI, C.; CAILLIEZ-GRIMAL, C.; JEANDEL, C.; SCHER, J. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG in microparticles: influence of casein to whey protein ratio on bacterial survival during digestion. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.19, p.233-242, 2013.

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

CELIK, S.; BAKIRCI, I. Some properties of yogurt produced by adding mulberry pekmez (concentrated juice). **International Journal of Dairy Technology**, v.56, n.1, p.26-29, 2003.

CHAMPAGNE, C.P.; GARDNER, N.J. Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. **Food Research International**, v.41, n.5, p.539-543, 2008.

CHAMPAGNE, C.P.; ROSS, R.P.; SAARELA, M.; HANSEN, K.F.; CHARALAMPOPOULOS, D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**, v.149, n.3, p.185-193, 2011.

COSTA, M.G.M.; FONTELES, T.V.; JESUS, A.L.T.; RODRIGUES, S. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: process optimization and product stability. **Food Chemistry**, v.139, n.1/4, p.261-266, 2013.

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

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

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

DEEPIKA, G.; GREEN, R.G.; FRAZIER, R.A.; CHARALAMPOPOULOS, D. Effect of growth time on the surface and adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, n.4, p.1230-1240, 2009.

DI CRISCIO, T.; FRATIANNI, A.; MIGNOGNA, R.; CINQUANTA, L.; COPPOLA, R.; SORRENTINO, E.; PANFILI, G. Production of functional probiotic, prebiotic, and symbiotic ice creams. **Journal of Dairy Science**, v.93, n.10, p.4555-4564, 2010.

DOHERTY, S.B.; AUTY, M.A.; STANTON, C.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; BRODKORB, A. Application of whey protein micro-bead coatings for enhanced strength and probiotic protection during fruit juice storage and gastric incubation. **Journal of Microencapsulation**, v.29, n.8, p.713-728, 2012.

DOHERTY, S.B.; GEE, V.L.; ROSS, R.P.; STANTON, C.; FITZGERALD, G.F.; BRODKORB, A. Efficacy of whey protein gel networks as potential viability-enhancing scaffolds for cell immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Journal of Microbiological Methods**, v.80, n.3, p.231-241, 2010.

DOHERTY, S.B.; GEE, V.L.; ROSS, R.P.; STANTON, C.; FITZGERALD, G.F.; BRODKORB, A. Development and characterization of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. **Food Hydrocolloids**, v.25, n.6, p.1604-1617, 2011.

EFSA. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific opinion on the substantiation of a health claim related to *Lactobacillus rhamnosus* GG and maintenance of defence against pathogenic gastrointestinal microorganisms pursuant to article 13(5) of Regulation (EC) No 1924/2006. **EFSA Journal**, v.9, n.6, p.2167, 2011.

ESPÍRITO SANTO, A.P.; SILVA, R.C.; SOARES, F.A.S.M.; ANJOS, D.; GIOIELLI, L.A.; OLIVEIRA, M.N. Açai pulp addition improves fatty acid profile and probiotic viability in yoghurt. **International Dairy Journal**, v.10, n.6, p.415-422, 2010.

FÁVARO-TRINDADE, C.S.; 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.

FONTELES, T.V.; COSTA, M.G.M.; JESUS, A.L.T.; RODRIGUES, S. Optimization of the fermentation of cantaloupe juice by *Lactobacillus casei* NRRL B-442. **Food and Bioprocess Technology**, v.5, n.7, p.2819-2826, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food: Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food**. London: Ontário: FAO, 2002. 11p.

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

GOFF, H.D.; HARTEL, R.W. Ice cream and frozen desserts. In HUI, Y.H.; CULBERTSON, J.D., eds. **Handbook of food science, technology and engineering**. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis, 2006. v.4, p.154-1-154-48. (Food science and technology, 148).

GOLDIN, B.R.; GORBACH, S.L.; SAXELIN, M.; BARAKAT, S.; GUALTIERI, L.; SALMINEM, S. Survival of *Lactobacillus* species (Strain GG) in human gastrointestinal tract. **Digestive Diseases and Sciences**, v.37, n.1, p.121-128, 1992.

HATAKKA, K.; SAVILAHTI, E.; PÖNKÄ, A.; MEURMAN, J.H.; POUSSA, T.; NÄSE, L.; SAXELIN, M.; KORPELA, R. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomized trial. **BMJ [British Medical Journal]**, v.322, n.7298, art.1327, p.1-5, 2001.

HEKMAT, S.; MCMAHON, D.J. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.6, p.1415-1422, 1992.

HOJSAK, I.; ABDOVIC, S.; SZAJEWSKA, H.; MILOSEVIC, M.; KRZANARIC, Z.; KOLACEK, S. *Lactobacillus* GG in the prevention of nosocomial gastrointestinal and respiratory tract infections. **Pediatrics**, v.125, n.5, p.e1171-e1177, 2010.

HOMAYOUNI, A.; AZIZI, A.; JAVADI, M.; MAHDIPOUR, S.; EJTAHED, H. Factors influencing probiotic survival in ice cream: a review. **International Journal of Dairy Science**, v.7, n.1, p.1-10, 2012. [Review].

KANG, J.; THAKALI, K.M.; XIE, C.; KONDO, M.; TONG, Y.; OU, B.; JENSEN, G.; MEDINA, M.B.; SCHAUSS, A.G.; WU, X. Bioactivities of açai (*Euterpeprecatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. **Food Chemistry**, v.133, n.3, p.671-677, 2012.

KOSKENNIEMI, K.; LAAKSO, K.; KOPONEN, J.; KANKAINEN, M.; GRECO, D.; AUVINEN, P.; SAVIJOKI, K.; NYMAN, T.A.; SURAKKA, A.; SALUSJARVI, T.; VOS, W.M.; TYNKKYNNEN, S.; KALKKINEN, N.; VARMANEN, P. Proteomics and transcriptomics characterization of bile stress response in probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.10, n.2, art.10.1074/mcpM110.002741, p.1-18, 2011..

KUMPU, M.; SWASNLJUNG, E.; TYNKKYNNEN, S.; HATAKKA, K.; KEKKONEN, R.A.; JARVENPAA, S.; KORPELA, R.; PITKARANTA, A. Recovery of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in tossil tissue after oral administration: randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial. **British Journal of Nutrition**, v.109, n.12, p.2240-2246, 2013.

LEBBER, S.; VERHOEVEN, T.L.A.; VÉLEZ, M.P.; VANDERLEYDEN, J.; KEERSMAECKER, S.C.J. Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.6768-6775, 2007.

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

MADUREIRA, A.R.; AMORIM, M.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v.44, n.1, p.465-470, 2011.

MANTZOURIDOU, F.; SPANOU, A.; KIOSSEOGLU, V. An inulin-based dressing emulsion as a potential probiotic food carrier. **Food Research International**, v.46, n.1, p.260-269, 2012.

MASOOD, M.I.; QADIR, M.I.; SHIRAZI, J.H.; KHAN, I.U. Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. **Critical Reviews in Microbiology**, v.37, n.1, p.91-98, 2011.

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

OLIVER, J.D. The viable but nonculturable state in bacteria. **Journal of Microbiology**, v.43, sp.iss., p.93-100, 2005.

PANDIYAN, C.; ANNAL VILLI, R.; KUMARESAN, G.; MURUGAN, B.; GOPALAKRISHNAMURTHY, T.R. Development of symbiotic ice cream incorporating *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces boulardii*. **International Food Research Journal**, v.19, n.3, p.1233-1239, 2012.

PEREIRA, A.L.F.; MACIEL, T.C.; RODRIGUES, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, v.44, n.5, p.1276-1283, 2011.

- PITINO, I.; RANDAZZO, C.L.; CROSS, K.L.; PARKER, M.L.; BISIGNANO, C.; WICKHAM, M.S.J.; MANDALARI, G.; CAGGIA, C. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains inoculated in cheese matrix during simulated human digestion. **Food Microbiology**, v.31, n.1, p.57-63, 2012.
- RANADHEERA, C.S.; EVANS, C.A.; ADAMS, C.M.; BAINES, S.K. *In vitro* analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Research International**, v.49, n.2, p.619-625, 2012.
- RUFINO, M.S.M.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; OLIVEIRA, M.S.P.; SAURA-CALIXTO, F. Açai (*Euterpe oleraceae*) 'BRS Pará': a tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. **Food Research International**, v.44, n.7, p.2100-2106, 2011.
- SAAD, N.; DELATRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J.M.; BRESSOLLIER, P. An overview of the last advances in probiotic and probiotic field. **LWT – Food Science and Technology**, v.50, n.1, p.1-16, 2013.
- SAGDIC, O.; OZTURK, I.; CANKURT, H.; TORNUK, F. Interaction between some phenolic compounds and probiotic bacterium in functional ice cream production. **Food and Bioprocess Technology**, v.5, n.8, p.2964-2971, 2012.
- SAXELIN, M.; AHOKAS, M.; SALMINEN, S. Dose response on the faecal colonization of *Lactobacillus* strain GG administered in two different formulations. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.6, n.3, p.119-122, 1993.
- SAXELIN, M.; ELO, S.; SALMINEN, S.; VAPAATALO, H. Dose response colonization of faeces after oral administration of *Lactobacillus casei* strain GG. **Microbial Ecology in Health and Disease** v.4, n.4, p.209–214, 1991.
- SAXELIN, M.; LASSIG, A.; KARJALAINEN, H.; TYNKKYNNEN, S.; SURAKKA, A.; VAPAATALO, H.; JARVENPAA, S.; KOPERLA, R.; MUTANEN, M.; HATAKKA, K. Persistence of probiotic strains in the gastrointestinal tract when administered as capsules, yoghurt, or cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, n.2, p.293–300, 2010.
- SEGAWA, S.; FUJIYA, M.; KONISHI, H.; UENO, N.; KOBAYASHI, N.; SHIGYO, T.; KOHGO, Y. Probiotic-derived polyphosphate enhances the epithelial barrier function and maintains intestinal homeostasis through Integrin-p38 MAPK pathway. **PloS ONE**, v.6, n.8, art.23278, p.1-15, 2011.
- SENGUPTA, R.; ALTERMANN, E.; ANDERSON, R.C.; MCNABB, W.C.; MOUGHAN, P.J.; ROY, N.C. The role of cell surface architecture of lactobacilli in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract. **Mediators of Inflammation**, v.2013, art.237921, p.1-16, 2013. [Review].
- SUCCI, M.; TREMONTE, P.; REALE, A.; SORRENTINO, E.; GRAZIA, L.; PACIFICO, S.; COPPOLA, R. Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. **FEMS Microbiology Letters**, v.244, n.1, p.129-137, 2005.

SUN-WATERHOUSE, D.; EDMONDS, L.; WADHWA, S.S.; WIBISONO, R. Producing ice cream using a substantial amount of juice from kiwifruit with green, gold or red flesh. **Food Research International**, v.50, n.2, p.647-656, 2013.

SZAJEWSKA, H.; WANKE, M.; PATRO, B. Meta-analysis: the effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation for the prevention of healthcare-associated diarrhea in children. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.34, n.9, p.1079-1087, 2011.

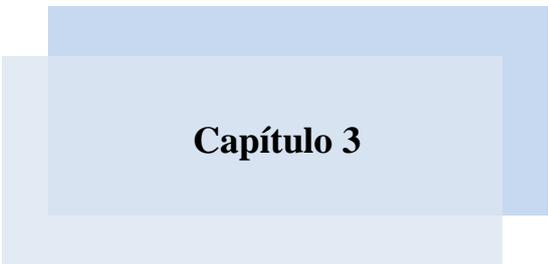
TOMPKINS, T.A.; MAINVILLE, I.; ARCAND, Y. The impact of meals on a probiotic during transit through a model of the human upper gastrointestinal tract. **Beneficial Microbes**, v.2, n.4, p.295-303, 2011.

TYNKKYNNEN, S.; SINGH, K.V.; VARMANEN, P. Vancomycin resistance factor of *Lactobacillus rhamnosus* GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (van) genes. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, n.3, p.195-204, 1998.

VIDEROLA, C.G.; COSTA, G.A.; REGENAHRDT, S.; REINHEIMER, J.A. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.12, n.7, p.579-589, 2002.

VILLARREAL, M.L.M.; PADILHA, M.; VIEIRA, A.D.S.; FRANCO, B.D.G.M.; MARTINEZ, R.C.R.; SAAD, S.M.I. Advantageous direct quantification of viable closely related probiotics in *petit-suisse* cheeses under *in vitro* gastrointestinal conditions by propidium monoazide – qPCR. **PloS One**, v.8, n.12, art.e82102, p.1-11, 2013.

WANG, J.; GUO, Z.; ZHANG, Q.; YAN, L.; CHEN, W.; LIU, X.M.; ZHANG, H.P. Fermentation characteristics and transit tolerance of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang in soymilk and bovine milk during storage. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.6, p.2468-2476, 2009.



Capítulo 3

Caracterização química e potencial antioxidante de sorvete simbiótico de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)**RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a composição química e investigar o potencial antioxidante de sorvete simbiótico de açaí suplementado de inulina (I; X_1), concentrado proteico (WC; X_2) e isolado proteico (WI; X_3) de soro de leite e elaborado com a adição da cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG e do prebiótico fruto-oligossacarídeo (FOS). Para esse fim, foi empregado um delineamento experimental *centroid simplex* de três fatores e um ponto central, utilizando diferentes proporções dos fatores X_1 , X_2 e X_3 , que compreenderam 4% do total dos ingredientes das formulações, totalizando 9 formulações de sorvete. A incorporação de WC e WI nas formulações aumentou o conteúdo proteico das formulações. A polpa de açaí adicionada às formulações contribuiu, em média, com 1% do total de gordura observada. As porções de 60 g das formulações desenvolvidas apresentaram, em média, 100 kcal. A composição de ácidos graxos revelou que o ácido oleico esteve em maior quantidade nas formulações (teor médio 46,47%), seguido do ácido palmítico (teor médio 42,12%) e, ainda, quantidades relevantes de ácido esteárico e ácido linoleico foram encontradas. Os sorvetes apresentaram atividade antioxidante na faixa de 302,03 a 505,41 $\mu\text{mol TE/g}$. A maior atividade antioxidante foi observada para a formulação controle, seguida das formulações WC (4% de WC) e WI (4% de WI). Através do presente estudo, foi possível constatar que associação de um sorvete de açaí adicionado de prebióticos e probióticos representa uma alternativa de se desenvolver uma sobremesa congelada com ingredientes diferenciados e potencial como alimento funcional.

Palavras chave: Sorvete, açaí, simbiótico, alimento funcional, atividade antioxidante.

Chemical characterization and antioxidant potential of synbiotic açai (*Euterpe oleracea* Mart.) ice cream**ABSTRACT**

The aim of this study was to characterize the chemical composition and investigate the potential antioxidant of symbiotic açai ice cream supplemented with inulin, (I; X_1), whey protein concentrate (WC; X_2), and whey protein isolate (WI; X_3) and produced with the addition of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG and the prebiotic fructo-oligosaccharide (FOS). For this purpose, an experimental *centroid simplex* design was conducted with three factors and a central point, using different proportions of the factors X_1 , X_2 , and X_3 , which comprised 4% of the total formulation ingredients, resulting in 9 ice cream formulations. The addition of WC and WI increased the protein content of the formulations. Açai pulp added contributed with around 1% of total ice cream fat. A 60 g portion of synbiotic açai ice cream presented around 100 kcal. The fatty acids composition showed that oleic acid was the fatty acid with the highest quantity in synbiotic açai ice cream (mean content 46.47%), followed by palmitic acid (mean content 42.12%) and also significant amounts of stearic and linoleic acid were found. The antioxidant activity of ice creams ranged from 302.03 to 505.41 $\mu\text{mol TE/g}$. Formulation C showed the highest antioxidant activity, followed by the formulations WC (WC 4%) and WI (WI 4%).

Keywords: Ice cream, açai, synbiotic, functional food, antioxidant activity.

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a exigência dos consumidores em relação aos alimentos mudou consideravelmente, tendo em vista o fato de que cada vez mais é demonstrado que a alimentação contribui diretamente para a saúde. Nesse contexto, a decisão quanto ao consumo de um alimento, além da satisfação sensorial e saciedade, passa pelos nutrientes que aquele alimento oferece, bem como potenciais compostos que propiciem benefícios fisiológicos (BIGLIARDI e GALATI, 2013). O sorvete é uma sobremesa apreciada por uma ampla faixa etária de consumidores. No entanto, a maioria das formulações comerciais contém grandes quantidades de gordura e açúcar e, por outro lado, é carente de compostos bioativos que favorecem a saúde (SUN-WARTERHOUSE et al., 2011).

Os probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). O sorvete possui potencial para a veiculação de culturas probióticas, devido a sua composição e forma de armazenamento congelado, o qual favorece a manutenção da viabilidade celular dessas culturas (CRUZ et al., 2009; SOUKOULIS et al., 2014). Já os prebióticos, podem ser definidos como ingrediente alimentar, não digerível, que afeta benéficamente o hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias benéficas no cólon, dessa forma, proporcionando equilíbrio da microbiota intestinal (NAIR et al., 2010).

As frutas são uma alternativa para agregar valor nutricional a sobremesas congeladas como os sorvetes (SUN-WARTERHOUSE et al., 2011). O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma fruta nativa da América do Sul, que nos últimos anos tem recebido atenção internacional, em virtude das tendências mundiais do consumo de alimentos saudáveis e com promessas terapêuticas (PACHECO-PALENCIA et al., 2009; POMPEU et al., 2009). A análise da composição nutricional mostra que a polpa de açaí é rica em lipídeos, fibras e minerais como o cálcio. Na fração lipídica, destaca-se a presença do ácido graxo oleico (56,2%), seguido do ácido palmítico (24,1%) e ácido linoleico (12,5%), sendo este último considerado um ácido graxo essencial (SCHAUSS et al., 2006). Dessa forma, a utilização do açaí no desenvolvimento de sorvetes funcionais pode resultar em produtos com maior valor nutricional.

Além dos benefícios nutricionais, o açaí é considerado uma fruta com alto poder antioxidante (KANG et al., 2012). É considerado um antioxidante um conjunto heterogêneo

de substâncias que protege o sistema biológico contra o efeito nocivo de processos ou reações que podem causar oxidação excessiva de outras substâncias (MAKSIMOVIC et al., 2013). A alta capacidade antioxidante de frutas e vegetais têm sido associada à presença de compostos fenólicos. No açaí, compostos fenólicos como as antocianinas, as proantocianidinas, os flavonoides e as lignanas, entre outros, estão diretamente relacionados com o alto poder antioxidante dessa fruta (KANG et al., 2011).

Alguns ingredientes como a inulina e concentrados e isolados proteicos de soro de leite são incorporados no desenvolvimento de sobremesas lácteas congeladas, como sorvetes, devido as suas propriedades tecnológicas. Esses ingredientes podem atuar como substitutos de gordura e açúcar em formulações com baixo conteúdo de gordura (AKALIN et al., 2008), bem como por exercerem efeitos fisiológicos benéficos à saúde (DELZENNE et al., 2013; KERASIOTI et al., 2014). A inulina é considerada um prebiótico, uma vez que ao atingir o cólon humano é fermentada seletivamente pela microbiota benéfica e, dessa forma, permite alterações específicas que resultam em equilíbrio da microbiota intestinal (ROBERFROID, 2007). Já os concentrados e isolados proteico de soro de leite são subprodutos da fabricação de queijos e são descritos como ingredientes com aplicações nutricionais. São normalmente utilizados como suplemento alimentar, especialmente por atletas com objetivo de crescimento muscular (KERASIOTI et al., 2014).

O objetivo desse estudo foi caracterizar a composição química e investigar o potencial antioxidante de sorvete simbiótico de açaí suplementado caracterizar a composição química e investigar o potencial antioxidante de sorvete de açaí suplementado de inulina (I; X_1), concentrado proteico (WC; X_2) e isolado proteico (WI; X_3) de soro de leite e elaborado com a adição da cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG e o prebiótico fruto-oligossacarídeo (FOS).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento experimental

Os ingredientes inulina (X_1), concentrado proteico de soro ($WC = X_2$) e isolado proteico de soro ($WI = X_3$) foram adicionados às formulações de sorvete simbiótico de açaí em diferentes proporções, mas sempre totalizando 4% do total das formulações. Foi utilizado o delineamento experimental para misturas simples (*centroid simplex*), incluindo um ponto axial, que corresponde a um ponto interno (escolhido aleatoriamente) ao planejamento proposto. A **Figura 1** apresenta o desenho experimental do planejamento adotado. O ponto axial adicionado ao planejamento foi realizado para posterior estudo estatístico mais detalhado (BOX e DRAPER, 1987; BARROS NETO, 2007). A **tabela 1** mostra as diferentes formulações estudadas, dentro do planejamento experimental proposto.

Foi avaliada, ainda, uma formulação controle, não adicionada dos ingredientes inulina, WC e WI ($X_1, X_2, X_3 = 0, 0, 0$).

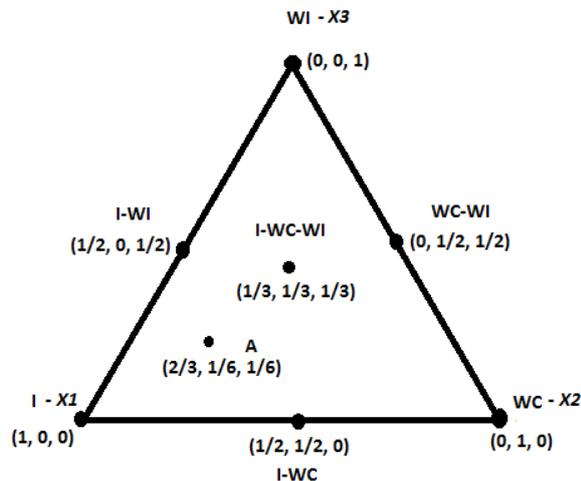


Figura 1 - Representação espacial das formulações de sorvete de açaí no planejamento adotado. Os vértices correspondem aos componentes (I, WC, WI) puros, os lados às misturas binárias dos componentes e os pontos do interior do triângulo, a mistura dos três componentes.

Tabela 1 - Delineamento experimental *centroid simplex* empregado na elaboração dos sorvetes de açaí estudados.

Formulações	Proporção de cada ingrediente da mistura	Quantidade de cada ingrediente (g) em 100 g de sorvete ¹		
	(X_1, X_2, X_3)	Inulina ² I (X_1)	WC ³ (X_2)	WI ⁴ (X_3)
I	(1, 0, 0)	4,00	0,00	0,00
WC	(0, 1, 0)	0,00	4,00	0,00
WI	(0, 0, 1)	0,00	0,00	4,00
I-WC	(1/2, 1/2, 0)	2,00	2,00	0,00
I-WI	(1/2, 0, 1/2)	2,00	0,00	2,00
WC-WI	(0, 1/2, 1/2)	0,00	2,00	2,00
I-WC-WI	(1/3, 1/3, 1/3)	1,33	1,33	1,33
A ⁵	(2/3, 1/6, 1/6)	2,60	0,70	0,70
C ⁶	---	0,00	0,00	0,00

¹Para cada 100 g de produto, 4 g da mistura total (inulina + WC +WI) foi adicionada aos demais ingredientes utilizados nas formulações de sorvete de açaí; ²Orafti®GR (Beneo-Orafti); ³Lacprodan 80® (Arlafoods); ⁴Lacprodan DI9224® (Arlafoods);

⁵Formulação aleatória; ⁶Formulação controle.

2.2 Obtenção do micro-organismo e preparo da cultura estoque

Para o preparo da cultura pura, o micro-organismo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG foi isolado a partir de cápsulas comerciais (Culturelle, Amerifit, EUA) e mantido em caldo MRS (Oxoid, Hampshire, England) com glicerol (50% v/v) em temperatura de -80°C. A análise da sequência obtida a partir do gene 16S do RNA ribossômico da cultura estoque preparada demonstrou 99% de similaridade (nº de descrição do GenBank FM179322.1) com *Lactobacillus rhamnosus* GG, quando submetida à comparação no programa BLASTn, o qual utiliza-se do banco de dados NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). A ativação e preparo do pré-inóculo foi realizada com 1 mL da cultura estoque previamente ativada em caldo MRS por 20h a 37°C. O pré-inóculo (4% v/v) foi transferido para um volume maior de caldo MRS e incubado a 37°C por 16 h, até que se atingisse a fase exponencial, após esse período o micro-organismo apresentou população de cerca de 10^9 ufc/mL. Após a incubação, as células foram colhidas por centrifugação (5251,4 g x 10 min) em centrífuga Sorvall (modelo RC-5C, Ontario, Canadá), lavadas em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%), repetindo-se o processo de centrifugação e lavagem duas vezes.

A cultura do micro-organismo *Lactobacillus rhamnosus* GG foi ressuspensa em leite em pó desnatado (Nestlé, Araçatuba, Brasil) reconstituído estéril 10%. Posteriormente, essa cultura ativada foi adicionada à mistura para a elaboração do sorvete.

2.3 Fabricação do sorvete de açaí

De acordo com o planejamento experimental adotado e descrito na **Tabela 1**, as formulações de sorvete de açaí foram produzidas em lotes de 4 kg. Os ingredientes listados na **Tabela 2** foram misturados até completa uniformização da massa em misturador Geiger UMMSK-12 (Geiger, Pinhais, Brasil), após a sua pesagem e mistura manual prévia (primeiramente, ingredientes líquidos, depois sólidos e, por último, ingredientes lipídicos). A mistura obtida foi pasteurizada a 85°C por 25 segundos, no próprio misturador. A seguir, a temperatura da massa foi reduzida a 40°C, para a adição do leite contendo a cultura probiótica. Após essa etapa, a mistura foi transferida para cabine refrigerada a 4 °C (Metalfrio, São Paulo, Brasil) para maturação da calda por 20 horas. Posteriormente, foi transferida para sorveteira Skymesen BSK-16 (Metalúrgica Skymesen, Brusque, Brasil), onde ocorreram os processos de batimento e congelamento simultâneos, por 15 minutos. Decorrida essa etapa, o produto foi acondicionado em potes plásticos de polipropileno próprios para alimentos (68 mm de diâmetro, 32 mm de altura, 55 ml de volume total, Tries Aditivos Plásticos, São Paulo, Brasil), em porções de 20 g. Os produtos obtidos foram armazenados em congelador vertical (Metalfrio, São Paulo, Brasil) a -18 °C por até 112 dias.

Tabela 2 - Ingredientes fixos e variáveis e respectivas proporções, utilizados na produção das formulações de sorvete de açaí estudadas, de acordo com o planejamento experimental adotado e descrito na Tabela 1.

Ingredientes (%)	Formulações							A*	C**
	I	WC	WI	I-WC	I-WI	WC-WI	I-WC-WI		
Ingredientes fixos									
Polpa congelada de açaí ¹	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Leite em pó desnatado ²	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0
Sacarose ³	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Gordura Vegetal ⁴	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Glicose em pó ⁵	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
FOS ⁶	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Emulsificante/Estabilizante ⁷	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Cultivo de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG em leite	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Saborizante e aromatizante artificial de açaí ⁸	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Goma carragena ⁹	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Goma guar ¹⁰	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
Ingredientes variáveis									
Inulina (I)	4,0	-	-	2,0	2,0	-	1,33	2,6	-
WC	-	4,0	-	2,0	-	2,0	1,33	0,7	-
WI	-	-	4,0	-	2,0	2,0	1,33	0,7	-
Água	45,00	45,00	45,00	45,00	45,00	45,00	45,00	45,00	49,00
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

¹Polpa de açaí médio (Icefruit – Icefruit Comércio de alimentos, Tatuí, Brasil); ²Molico (Nestlé, Araçatuba, Brasil); ³Açúcar refinado (União, Limeira, Brasil); ⁴Gordura de palma 370SE (Agropalma, Belém, Pará); ⁵(Nutre, São Paulo, Brasil); ⁶Beneo® P95 (Orafit, Oreya, Bélgica); ⁷Emustab-Emulsificante e estabilizante neutro(Duas Rodas, Jaraguá do Sul, Brasil); ⁸Selecta tropical (Duas Rodas, Jaraguá do Sul, Brasil); ⁹Carrageenan(Danisco, Redhill, Reino Unido); ¹⁰Grindsted®Guar(Danisco, Redhill, Reino Unido); *A = formulação aleatória; **C = formulação controle

2.4 Determinação da composição centesimal do produto desenvolvido

Os resultados de composição centesimal das formulações de sorvete foram obtidos a partir dos produtos finais mantidos em congelador vertical a $-18\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O teor de umidade foi determinado a partir de amostras de 5g por secagem a 70 °C , em estufa a vácuo (modelo 440/D, Nova Ética, Vargem Grande Paulista, Brasil). A fração cinza foi determinada gravimetricamente pela incineração de 1g de amostra a 550 °C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005). As proteínas foram determinadas através da análise de conteúdo de nitrogênio total pelo método de micro-Kjeldahl, utilizando o fator de conversão 6,37, adaptado de AOAC (2003). O conteúdo de lipídeos totais foi obtido através do método BLIGH-DYER (1959). O teor de carboidratos foi obtido por diferença para se obter 100% da composição total.

Para o cálculo do valor energético total (VET) foram determinados os teores de macronutrientes, os quais foram convertidos em quilocalorias por meio dos fatores de Atwater e da energia oriunda da inulina $[(4\text{ kcal} \times \text{g proteínas}) + (4\text{ kcal} \times \text{g de carboidratos}) + (9\text{ kcal} \times \text{g total lipídios}) + (1,5\text{ kcal} \times \text{g inulina})$ para determinar o valor energético total (VET) médio de cada formulação do sorvete (ROBERFROID, 1999, 2005; ANVISA, 2003b; AUERBACH et al., 2007).

2.5 Composição de ácidos graxos

Após a obtenção da fração lipídica total (pelo método BLIGH-DYER, 1959), os ácidos graxos foram transformados em ésteres metílicos, segundo a metodologia de HARTMAN e LAGO (1973). A análise foi realizada em cromatógrafo a gás Varian GC, modelo 430 GC, equipado com injetor automático, detector de ionização de chama e o programa *Varian's Galixie Chromatography Software* (Varian, Midelburgo, Holanda). Foi utilizada coluna capilar de sílica SP-2560 (Sulpeco, EUA), com 100 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno e contendo 0,2 µm de polietilenoglicol dentro da coluna. As condições foram: injeção *Split*, razão de 50:1; temperatura da coluna: 140 °C por 5 min, programada até 240 °C em uma razão de 4 °C/min; arraste: hélio a 29 mL/min; temperatura do injetor: 250 °C; temperatura do detector: 250 °C. A composição qualitativa foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos com os respectivos padrões de ácidos graxos. Foram coletadas amostras de dois lotes de produção de cada sorvete. As amostras foram analisadas em triplicata e os valores apresentados como média ± desvio padrão desses valores.

2.6 Atividade Antioxidante (método – ORAC)

Diversos métodos têm sido descritos para determinar a atividade antioxidante *in vitro*. Estes métodos podem ser baseados na captura do radical peroxila (ORAC, TRAP), poder de redução do metal (FRAP, CUPRAC), captura do radical hidroxila (método de desoxirribose), captura do radical orgânico (ABTS, DPPH), quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (TBARS, oxidação do LDL, co-oxidação do β -caroteno). Dentre os métodos descritos, o ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) é um dos mais utilizados atualmente (PRIOR et al., 2005) e foi o método adotado no presente trabalho. Nesse método, o iniciador AAPH [2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato] abstrai o hidrogênio a partir da fluoresceína de sódio (molécula que é fluorescente). A redução da fluorescência é medida por um filtro de excitação a 485 nm e um filtro de emissão a 525 nm. Na presença de um antioxidante, o AAPH não reage com a fluoresceína, o que significa que a diminuição na fluorescência é inibida desde que o antioxidante esteja ativo (CAPITANI et al., 2009).

Extração das amostras de sorvetes

Para a extração das amostras adotou-se a metodologia descrita por PRIOR et al. (2003), com modificações. Foram pesadas 400 mg das amostras dos sorvetes em tubos de ensaio de fundo redondo (5 ml) de prolipropileno com tampa. Ao material pesado, adicionou-se 4 mL da solução extratora acetona/água/ácido acético (70: 29,5: 0,5, v/v/v), os tubos foram agitados por 30 s, seguido pela sonificação a 37 °C por 5 minutos. Os tubos foram invertidos uma vez no meio da sonificação e, posteriormente, permaneceram em temperatura ambiente por 10 minutos, com agitações ocasionais. Os tubos foram centrifugados a 3500 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi removido e transferido para balões volumétricos e diluído com água Milli-Q para um volume total de 10 mL.

Atividade Antioxidante Total

O extrato obtido (1 mmol/L) foi diluído em 75 mmol/L de solução tampão fosfato (pH 7,0). Seis diluições foram preparadas e 25 μ L dessas soluções foram transferidas para microplacas, em triplicata. Em seguida, foram adicionados 150 μ L de fluoresceína 40 nM,

diluída em tampão fosfato 75 mmol/L (pH 7,0). Adicionalmente, a microplaca continha o branco (200 μ L de solvente), o controle (25 μ L de solvente + 150 μ L de fluoresceína 40 nM) e diluições seriadas de Trolox (150 μ L de fluoresceína 40 nM + 25 μ L de diluições de Trolox apropriadas). Para manter a temperatura na placa, 200 μ L de água foram adicionados ao redor dos poços que seriam lidos. Após a incubação (37 °C, 30 min), 25 μ L AAPH (153 mmol/ em tampão fosfato 75 mmol/L, pH 7,0) foram adicionados em todos os poços, exceto o branco, e as placas foram agitadas por 10 s na máxima intensidade.

O leitor de placas (leitor de microplacas Elisa multi-deteção; Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, USA) foi programado para gravar a fluorescência a cada minuto após a adição do AAPH, por 120 minutos, e a área sob a curva de decaimento foi integrada, utilizando o programa Gen5. As áreas correspondentes ao branco (200 μ L de solvente) e ao controle (25 μ L de solvente + 150 μ L de fluoresceína 40 nM) foram subtraídas das áreas obtidas para cada concentração do composto. Utilizando a curva de calibração Trolox ($ORAC = 349908x + 409356$; $R^2 = 0,9992$), expressa como área líquida vs. concentração μ mol/L, a atividade antioxidante das amostras foi expressa como μ mol TE /g.

2.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Para a análise estatística, foi verificada a normalidade dos resultados, através do teste Hartley, com $\alpha = 0,05$. Foi constatada a distribuição normal dos resultados. Portanto, foi empregada a Análise de Variância (ANOVA), com utilização do teste de Tukey (teste de comparação de médias).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição centesimal e valor energético dos sorvetes

A composição centesimal obtida para as formulações de sorvete de açaí é apresentada na **Tabela 3**. As variações observadas nos teores de umidade (%), sólidos totais (%) e proteínas (%) estão relacionadas com a presença ou ausência dos ingredientes inulina, WC e WI.

Para sorvetes com teor de gordura de 0 a 8%, a qualidade de uma boa palatabilidade geralmente está associada a produtos em que o nível de sólidos totais está na faixa de 30% a 38% (THARPS, 2009). Nas formulações do presente estudo, o teor de sólidos totais variou de 33% para a formulação C (controle) a 37% para a formulação I-WI (2% de inulina+2% de WI), sendo que o menor valor encontrado já era esperado, uma vez que a formulação controle (isenta dos fatores estudados no planejamento) continha 4% a mais de água. Os menores conteúdos de proteínas, 4,51% e 4,19%, foram observados nas formulações I (4% inulina) e C, respectivamente, uma vez que estas não continham WC e WI. Conforme esperado, nas demais formulações, a presença de WC e WI aumentou o teor proteico dos produtos, o qual variou de 6,05% a 7,23%.

O teor de gordura variou pouco entre as formulações, tendo se apresentado na faixa de 4,92% para a formulação WC (4% de WC) a 5,49 para a I-WC (2% de inulina+2% de WC). Em todas as formulações foram adicionados 4% de gordura de palma e os cerca de 20% de polpa de açaí adicionada às formulações contribuiu com o conteúdo de gordura total dos sorvetes. De acordo com o rótulo do fabricante da polpa de açaí (Ice Fruit), 100g de polpa fornece uma quantidade 5 g de gorduras totais, considerando que as bateladas dos sorvetes produzidos com volume final de 4 kg, eram adicionadas de 800 g de polpa de açaí (ou seja, 40g de gorduras totais), espera-se que a polpa tenha contribuído, em média, com 1% do valor total de gordura encontrado.

A **Tabela 4** apresenta a composição centesimal e o valor energético total equivalente à porção de sorvete (60 g) estabelecida pela legislação brasileira (ANVISA, 2003). A grande variação na composição de sorvetes torna impraticável fornecer dados nutricionais e valor energético que sejam extrapolados para outros produtos. Em geral, os valores energéticos encontrados para as formulações de sorvete de açaí desenvolvidas foram equivalentes a

sorvetes tradicionais disponíveis no mercado, como exemplo, podemos citar o sorvete de frutas tropicais da Kibon, o qual a porção de 60g do produto fornece 118 Kcal. GOFF e HARTEL (2013) relataram que uma porção de 67 g de sorvetes de baunilha (4,5% de gordura) encontrados em supermercados norte-americanos apresentam, em média, 100 kcal.

Tabela 3 - Composição centesimal (%), teor de sólidos em g/100g e valor energético (VET) (média \pm desvio-padrão) das formulações de sorvete de açaí estudados (vide Tabela 1 para a descrição das formulações).

Composição	Formulações								C
	I	WC	WI	I-WC	I-WI	WC-WI	I-WC-WI	A	
Umidade	65,19 \pm 0,67	65,70 \pm 1,00	63,60 \pm 0,36	63,99 \pm 0,91	62,31 \pm 1,13	64,23 \pm 0,21	64,20 \pm 1,24	64,79 \pm 0,68	66,50 \pm 0,10
Proteínas	4,51 \pm 0,08	6,74 \pm 0,36	6,89 \pm 0,08	6,15 \pm 0,39	7,04 \pm 0,38	7,23 \pm 0,07	6,77 \pm 0,15	6,05 \pm 1,05	4,19 \pm 0,15
Lipídios	5,25 \pm 0,48	4,92 \pm 0,37	5,38 \pm 0,17	5,49 \pm 0,28	5,43 \pm 0,19	5,15 \pm 0,36	4,98 \pm 0,15	5,18 \pm 0,09	5,09 \pm 0,20
Minerais	1,41 \pm 0,32	1,16 \pm 0,06	1,03 \pm 0,05	1,25 \pm 0,04	1,79 \pm 0,55	1,03 \pm 0,28	1,34 \pm 0,06	1,45 \pm 0,05	1,10 \pm 0,21
Carboidratos totais	23,65 \pm 0,96*	21,48 \pm 0,96	23,10 \pm 0,38	23,11 \pm 1,02 [■]	23,43 \pm 1,57 [■]	22,35 \pm 0,68	22,72 \pm 1,51 [□]	22,53 \pm 0,36 [▲]	23,13 \pm 0,45
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Sólidos	34,82	34,3	36,40	36,00	37,69	35,76	35,81	35,21	33,51
Valor energético	142,36 \pm 6,01	149,65 \pm 2,18	160,88 \pm 1,90	158,98 \pm 1,90	163,28 \pm 6,31	157,21 \pm 1,18	155,25 \pm 4,44	153,47 \pm 2,38	147,55 \pm 1,43
Total (Kcal)									

(*)6,59g, (■)4,73g, (□)4,11, (▲) 5,29g correspondente aos frutanos: inulina e FOS [estimativas baseadas na informação do fornecedor (Orafti) para os frutanos (Beneo GR e Beneo P-95) utilizados no presente estudo]. Todas as formulações foram adicionadas de 2,88 g de FOS. [(4 x g proteínas) + (4 x g carboidratos) + (9 x g lipídios totais) + (1,5 x g frutanos totais)]

Tabela 4 - Composição em nutrientes e valor energético total (VET) obtido para as porções* de 60g para cada formulação de sorvete de açaí estudada (vide Tabela 1 para a descrição das formulações).

Composição	Formulações							A	C
	I	WC	WI	I-WC	I-WI	WC-WI	I-WC-WI		
Carboidratos	14,19±0,30	12,89±0,57	13,85±0,23	13,87±0,61	14,06±0,94	13,41±0,41	13,63±0,91	13,52±0,22	13,88±0,27
Proteínas	2,70±0,05	4,04±0,22	4,13±0,05	3,69±0,23	4,22±0,23	4,34±0,04	4,06±0,09	3,63±0,63	2,51±0,09
Lipídios	3,15±0,29	2,95±0,22	3,22±0,10	3,30±0,17	3,26±0,11	3,09±0,22	2,99±0,09	3,11±0,05	3,05±0,12
Minerais	0,84±0,19	0,70±0,03	0,61±0,03	0,75±0,02	1,07±0,33	0,61±0,17	0,80±0,04	0,87±0,03	0,66±0,12
Valor energético total (Kcal/60g)	85,42±3,61	89,79±1,31	96,53±1,14	95,39±3,02	97,97±3,78	94,33±0,71	93,15±2,66	92,08±1,43	88,53±0,86

*Porção diária estabelecida para sorvete, que corresponde a 60g ou 130mL do produto (Anvisa, 2003)

3.2 Composição de ácidos graxos

A **Tabela 5** apresenta os diferentes ácidos graxos encontrados nas formulações de sorvete de açaí e suas respectivas proporções, em porcentagem de base integral.

Os principais ácidos graxos encontrados nas formulações de sorvete de açaí foram: oleico (18:1), com uma concentração média na ordem de 46,47%, seguido do ácido palmítico (16:0), com uma concentração média de 42,12%. Já para os ácidos graxos poli-insaturados, o linoleico (18:2) sobressaiu entre as amostras analisadas, apresentando concentração média de 5,48%. Os ácidos graxos, palmítico e linolênico foram encontrados em pequenas quantidades e, em alguns casos, não foi possível a sua quantificação, por estarem em quantidades inferiores ao limite de detecção do método empregado.

SCHAUSS et al. (2006) apresentaram o perfil detalhado de ácidos graxos encontrados em açaí liofilizado. A análise da composição dos ácidos graxos revelou que o ácido graxo predominante foi o oleico (56,2%), seguido do palmítico (24,1%) e linoleico (12,5%). Do total de ácidos graxos, 73,9% eram ácidos graxos insaturados. Do mesmo modo, YUYAMA et al. (2010) encontraram concentração média de ácido graxo oleico na ordem de 68,2%, seguido de ácido palmítico (17,5%). Esses autores demonstraram que o suco de açaí analisado continha 7,5% de ácido linoleico e 1,7% de ácido linolênico, reforçando que o perfil lipídico do açaí é composto de ácidos graxos monoinsaturados (principalmente oleico) e contém quantidades consideráveis dos ácidos graxos essenciais poli-insaturados linoleico e linolênico. Para os resultados de ácido oleico, aqueles encontrados no presente trabalho corroboram com os trabalhos citados, uma vez que o ácido oleico foi o mais representativo dos ácidos graxos. Por outro lado, o ácido palmítico foi encontrado em pequena quantidade.

Adicionalmente, a gordura de palma, incorporada aos sorvetes, contribuiu para a composição de ácidos graxos observada, uma vez que essa gordura contém quantidades equivalentes de ácidos graxos insaturados e saturados. Assim, cerca de 50% do total de ácidos graxos na gordura de palma são saturados, sendo composta principalmente pelos ácidos palmítico (16:0) e esteárico (18:0). Os ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados representam 39% e 10,5%, respectivamente (AINI e MISKANDA, 2007).

O perfil de ácidos graxos de iogurtes probióticos de açaí revelou que esse produto continha quantidades expressivas de ácido palmítico e ácido oleico. Quantidades

significativas dos ácidos esteárico, palmitoleico, linoleico e linolênico também foram observadas (ESPÍRITO-SANTO et al., 2010), corroborando com o presente estudo.

A presença de ácidos graxos poli-insaturados, linoleico (18:2 – ω -6) e α -linolênico (18:3 - ω -3), agrega valor funcional e nutricional às formulações de sorvete de açaí. Essa constatação merece ser destacada, uma vez que estes ácidos são considerados essenciais, por não serem sintetizados pelo organismo humano e, nesse caso, necessitam ser ingeridos através da dieta (UNDURTI e DAS, 2011; JANSSEN e KILIAAN, 2014). De fato, já é bem estabelecido na literatura, o papel fundamental dos ácidos graxos poli-insaturados (linoleico e linolênico) na manutenção de condições normais das membranas celulares, funções cerebrais, transmissão de impulsos nervosos e processos de crescimento, reprodução, visão e desenvolvimento do cérebro dos seres humanos (IRIBARREN et al., 2004; VILELA e BAZOTTE, 2013).

Tabela 5 - Composição qualitativa de ácidos graxos presentes em 100g das formulações de sorvete de açaí (média \pm desvio-padrão). Vide Tabela 1 para a descrição das formulações.

Formulações	C16:0 (Palmítico)	C18:0 (Esteárico)	C16:1 (Palmitoléico)	C18:1n9c (Oleico)	C18:2n6c (Linoleico)	C18:3n3 (Linolênico)
I	37,87 \pm 1,19	5,11 \pm 0,15	0,07 \pm 0,02	49,80 \pm 0,27	7,15 \pm 1,02	nd
WC	46,84 \pm 3,76	4,64 \pm 0,92	0,12 \pm 0,02	44,59 \pm 1,13	3,62 \pm 0,56	0,19 \pm 0,05
WI	43,95 \pm 1,56	6,23 \pm 0,22	0,14 \pm 0,05	44,68 \pm 1,33	4,84 \pm 0,64	0,17 \pm 0,09
I-WC	41,79 \pm 5,86	6,57 \pm 0,75	0,19 \pm 0,07	47,23 \pm 6,05	4,11 \pm 0,29	0,39 \pm 0,05
I-WI	39,10 \pm 0,04	5,83 \pm 0,01	0,28 \pm 0,08	48,20 \pm 0,01	6,59 \pm 0,01	nd
WC-WI	46,87 \pm 0,03	7,20 \pm 0,05	0,04 \pm 0,06	41,72 \pm 0,24	4,03 \pm 0,07	0,14 \pm 0,05
I-WC-WI	39,07 \pm 0,19	6,30 \pm 0,20	0,02 \pm 0,02	47,52 \pm 0,22	6,95 \pm 0,29	0,12 \pm 0,02
A	43,85 \pm 1,74	6,92 \pm 0,15	43,85 \pm 1,74	44,93 \pm 1,56	5,86 \pm 0,26	0,11 \pm 0,09
C	39,70 \pm 1,72	6,09 \pm 0,73	0,14 \pm 0,09	49,58 \pm 1,15	6,18 \pm 0,51	0,04 \pm 0,02
Média	42,12	6,10	0,11	46,47	5,48	0,13

3.3 Atividade antioxidante total

A atividade antioxidante das formulações de sorvete de açaí é apresentada na **Figura 2**.

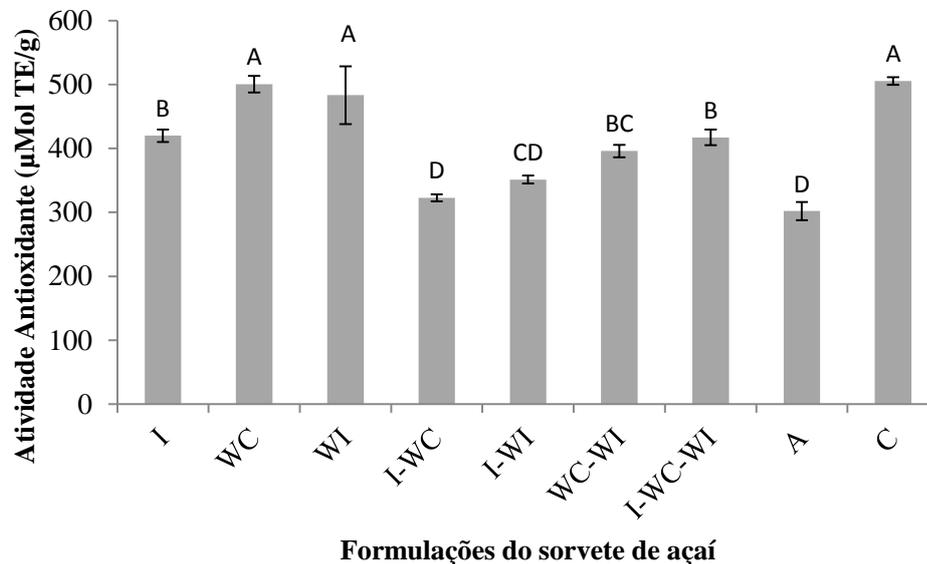


Figura 2 - Atividade antioxidante total ($\mu\text{Mol TE/g}$) das formulações de sorvete de açaí. A,B,C,D letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes formulações (vide Tabela 1 para a descrição das formulações).

A atividade antioxidante dos sorvetes de açaí foi de 302,03 a 505,41 $\mu\text{Mol TE/g}$. A maior atividade antioxidante foi observada para a formulação C, seguida da WC (4% de WC) e da WI (4% de WI). De forma geral, a interação entre os ingredientes nas formulações I-WI, WC-WI, I-WC e A resultou em diminuição da atividade antioxidante. No entanto, a presença de atividade antioxidante significativamente superior ($p < 0,05$) às demais formulações, (exceto para a formulação controle), em WC e WI, pode ser particularmente interessante após o consumo. Tal sugestão tem como base o fato de que concentrados proteicos de soro são fontes de aminoácidos essenciais, os quais são utilizados no organismo para a síntese de glutathione, que é considerado o principal agente antioxidante dos sistemas vivos. Ainda, alguns componentes das proteínas de soro de leite concentradas, como a α -lactoglobulina, possuem propriedade de quelante de metais, o que conduz à redução do estresse oxidativo (HARAGUCHI et al., 2006; KERASIOTI et al., 2014).

As variações encontradas na atividade antioxidante entre as formulações podem ser atribuídas a alguns fatores, como: a composição e concentração das polpas de açaí, apesar de

terem sido adquiridas polpas de um mesmo lote e do mesmo produtor; o fracionamento em pequenas porções, o que pode resultar em diferenças na concentração; o processamento térmico (pasteurização) e o período de armazenamento. De fato, a degradação das antocianinas durante o processamento térmico está correlacionada à diminuição da atividade antioxidante. A esse respeito, PACHECO-PALENCIA et al. (2009) relataram taxa de degradação de antocianinas diretamente relacionada ao tempo de exposição térmica e esse resultado, por sua vez, foi acompanhado em uma diminuição da capacidade antioxidante total em até 10%. O período de armazenamento também pode ser prejudicial aos compostos que contribuem para atividade antioxidante, uma vez que oscilações na temperatura e no teor de oxigênio podem acelerar processos bioquímicos que desestabilizem esses compostos (PACHECO-PALENCIA et al., 2007; TONON et al., 2010).

Desde que a alta capacidade antioxidante do açaí passou a ser relatada, inúmeras pesquisas têm focado em avaliações que associam a atividade antioxidante da polpa, suco ou extrato de açaí (KANG et al., 2010). HOGAN et al. (2010) encontraram maior atividade antioxidante em extrato de antocianinas do açaí (1800 $\mu\text{Mol TE/g}$), em comparação aquele encontrado por SCHAUSS et al. (2006) para açaí em pó (997 $\mu\text{Mol TE/g}$). Os autores relataram, ainda, que o valor antioxidante encontrado no açaí foi maior que o de frutas como mirtilo, morango e framboesa. Geralmente, a atividade antioxidante do açaí é atribuída, em grande parte, à presença de antocianinas. No entanto, essa concepção tem sido mudada desde que LICHTENTHALER et al. (2005) observaram apenas 10% de contribuição das antocianinas na capacidade antioxidante *in vitro* total do açaí. Os autores sugeriram que a fruta possui outros constituintes antioxidantes ainda não conhecidos.

Os flavonoides são os principais compostos fenólicos encontrados na polpa do açaí. No entanto, a capacidade antioxidante desses compostos varia, de acordo com a sua estrutura química e as metodologias de análise utilizadas. Em geral, as agliconas de flavonoides demonstram maior capacidade antioxidante, bem como maior capacidade de penetrar em células vivas em relação a flavonoides C-glicosídeos (KANG et al., 2010). O alto conteúdo de compostos fenólicos associados a fração fibra do açaí pode estar associado com a capacidade antioxidante do açaí. Apesar de não biodisponíveis no intestino delgado, alguns polifenóis alcançam o cólon, onde servem de substrato para as bactérias colônicas. A fermentação desses compostos libera metabólitos antioxidantes, que podem melhorar a saúde do intestino e produzir outros metabólitos que sejam absorvíveis (RUFINO et al., 2011). Essa propriedade, associada à alta sobrevivência do probiótico *L. ramosus* GG, o qual manteve população

média acima de 8,8 ufc/g nas formulações (dados não mostrados), pode potencializar o potencial benefício fisiológico dos sorvetes de açaí desenvolvidos no presente estudo.

Os resultados de biodisponibilidade dos flavonoides do açaí ainda são escassos. A capacidade antioxidante *in vivo* é foco de discussão, uma vez que a forma na qual esses compostos são absorvidos ou metabolizados no organismo ainda não está bem estabelecida (SCHAUSS et al., 2006; HEINRICH et al., 2011). AGAWA et al. (2011) avaliaram os teores de compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante em diferentes porções do açaí (mesocarpo/epicarpo/endocarpo), bem como os perfis de absorção de antocianinas do açaí (cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo) no plasma de ratos após administração oral. Os autores sugeriram que as antocianinas avaliadas foram absorvidas intactas na corrente sanguínea. Entretanto, o cianidina-3-rutinosídeo demonstrou maior biodisponibilidade, em comparação a cianidina-3-glicosídeo.

O potencial antioxidante *in vivo* do açaí foi estudado por MERTENS-TALCOTT et al. (2008). Os autores observaram que o consumo de suco e polpa de açaí resultou em um aumento significativo da capacidade antioxidante no plasma sanguíneo de voluntários humanos saudáveis. Alguns estudos divergem sobre a capacidade antioxidante no plasma sanguíneo induzido por frutas. Entretanto, deve-se levar em consideração que essas diferenças podem, em parte, ser devido a diferenças na metodologia dos ensaios envolvendo antioxidantes, quantidades administradas, bem como a seleção da população do estudo.

4 CONCLUSÃO

Através do presente estudo, foi possível constatar que as formulações de sorvete de açaí estudadas possuem bom potencial como alimento funcional. De fato, além de serem desenvolvidas com a presença do prebiótico fruto-oligossacarídeo e do probiótico *L. rhamnosus* GG, apresentaram alta atividade antioxidante e elevado perfil de ácidos graxos insaturados, destacando-se a presença dos ácidos graxos essenciais linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3). Sendo assim, a associação de probióticos, prebióticos, açaí e proteínas concentradas de soro de leite em uma sobremesa láctea congelada de açaí pode oferecer múltiplos benefícios à saúde. Entretanto, ressalta-se que um maior entendimento da ação fisiológica avaliada *in vivo* faz-se necessário em estudos futuros.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAWA, S.; SAKAKIBARA, H.; IWATA, R.; SHIMOI, K.; HERGESHEIMER, A.; KUMAZAWA, S. Anthocyanins in mesocarp/epicarp and endocarp of fresh açai (*Euterpe Oleracea* Mart.) and their antioxidant activities and bioavailability. **Food Science and Technology Research**, v.17, n.4, p.327-334, 2011.

AINI, I.N.; MISKANDAR, M.S. Utilization of palm oil and palm products in shortenings and margarines. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.109, n.4, p.422-432, 2007. [Review].

AKALIN, A.S.; ERISIR, D. Effects of inulin and oligofructose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic ice-cream. **Journal of Food Science**, v.73, n.4, p.M184–M188, 2008

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 17.ed. Gaithersburg: AOAC International, 2003. v.1, p.12.1-12.3, v.2, p.33.1-33.88.

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.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n.8, p.911-917, 1959.

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

CAPITANI, C.D.; CARVALHO, A.C.L.; RIVELLI, D.P.; BARROS, S.B.M.; CASTRO, I.A. Evaluation of natural and synthetic compounds according to their antioxidant activity using a multivariate approach. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.111, n.11, p.1090-1099, 2009.

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

DELZENNE, M.N.; NEYRINCK, A.M.; CANI, P.D. Gut microbiota and metabolic disorders: how prebiotic can work? **British Journal of Nutrition**, v.109, suppl.2, p.S81-S85, 2013.

ESPÍRITO SANTO, A.P.; SILVA, R.C.; SOARES, F.A.S.M.; ANJOS, D.; GIOIELLI, L.A.; OLIVEIRA, M.N. Açai pulp addition improves fatty acid profile and probiotic viability in yoghurt. **International Dairy Journal**, v.10, n.6, p.415-422, 2010.

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

HARAGUCHI, F.K.; ABREU, W.C.; PAULA, H. Whey protein: composition, nutritional properties, applications in sports and benefits for human health. **Revista de Nutrição**, v.19, n.4, p.479-488, 2006.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl from lipids. **Laboratory Practice**, v.22, n.6, p.475-473, 1973.

HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.)—A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. **Phytochemistry Letters**, v.4, n.1, p.10-21, 2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4.ed. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde: Instituto Adolfo Lutz, 2005. 1020p.

IRIBARREN, C.; MARKOVITZ, J.H.; JACOBS Jr., D.R.; SCHREINER, P.J.; DAVIGLUS, M.; HIBBELN, J.R. Dietary intake of n-3, n-6 fatty acids and fish: relationship with hostility in young adults—the CARDIA study. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.58, n.1, p.24-31, 2004.

JANSSEN, C.I.F.; KILIAAN, A.J. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. **Progress in Lipid Research**, v.53, p.1-17, 2014.

KANG, J.; LI, Z.; WU, T.; JESEN, G.S.; SCHAUSS, A.G.; WU, X. Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). **Food Chemistry**, v.122, n.3, p.610-617, 2010.

KANG, J.; THAKALI, K.M.; XIE, C.; KONDO, M.; TONG, Y.; OU, B.; JENSEN, G.; MEDINA, M.B.; SCHAUSS, A.G.; WU, X. Bioactivities of açai (*Euterpepreparatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. **Food Chemistry**, v.133, n.3, p.671-677, 2012.

KANG, J.; XIE, C.; LI, Z.; NAGARAJAN, S.; SCHAUSS, A.G.; WU, T.; WU, X. Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Chemistry**, v.128, n.1, p.152-157, 2011.

KERASIOTI, E.; STAGOS, D.; PRIFTIS, A.; AIVAZIDIS, S.; TSATSAKIS, A.M.; HAYES, A.W.; KOURETAS, D. Antioxidant effects of whey protein on muscle C2C12 cells. **Food Chemistry**, v.155, p.271-278, 2014.

LICHTENTHALER, R.; RODRIGUES, R.B.; MAIA, J.G.S.; PAPAGIANNPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; MARX, F. Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Açai) fruits. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.56, n.1, p.53-64, 2005.

MAKSIMOVIC, J.J.D.; MILIVOJEVIC, J.M.; POLEDICA, M.M.; NIKOLIC, M.D.; MAKSIMOVIC, V.M. Profiling antioxidant activity of two primocane fruiting red raspberry cultivars (*Autumm bliss* and *Polka*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v.31, n.2, p.173-179, 2013.

MERTENS-TALCOTT, S.U.; RIOS, J.; JILMA-STOHLAWETZ, P.J.; PACHECO-PALENCIA, L.A.; MEIBOHM, B.; TALCOTT, S.T.; DERENDORF, H.

Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich acai juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.17, p.7796-7802, 2008.

NAIR, K.K.; KHARB, S.; THOMPSON, D.K. Inulin dietary fiber with functional and health attributes: a review. **Food Reviews International**, v.26, n.2, p.189-203, 2010.

PACHECO-PALENCIA, L.A.; DUNCAN, C.E.; TALCOTT, S.T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. **Food Chemistry**, v.115, n.4, p.1199-1205, 2009.

PACHECO-PALENCIA, L.A.; HAWKEN, P.; TALCOTT, S.T. Juice matrix composition and ascorbic acid fortification effects on the phytochemical, antioxidant and pigment stability of acai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Food Chemistry**, v.105, n.1, p.28-35, 2007.

POMPEU, D.R.; SILVA, E.M.; ROGEZ, H. Optimization of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v.100, n.23, p.6076-6082, 2009.

PRIOR, R.L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.11, p.3273-3279, 2003.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.4290-4303, 2005.

ROBERFROID, M.B. Inulin-type fructans: functional food ingredients. **Journal of Nutrition**, v.137, n.11, suppl., p.2493S-2502S, 2007.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. p.1679-6535 (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, v.127).

RUFINO, M.S.M.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; OLIVEIRA, M.S.P.; SAURA-CALIXTO, F. Açai (*Euterpe oleracea*) 'BRS Pará': a tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. **Food Research International**, v.44, n.7, p.2100-2106, 2011.

SCHAUSS, A.G.; WU, X.; PRIOR, R.L.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D.; KABABICK, J.P. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart.(acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.22, p.8598-8603, 2006.

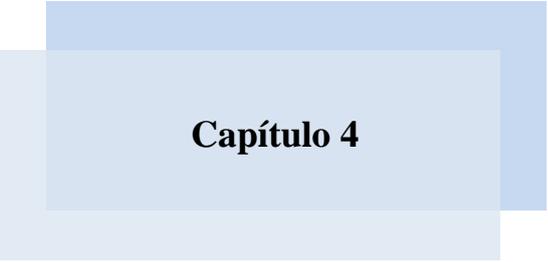
SOUKOULIS, C.; FISK, I.A, BOHN, T. Ice cream as a vehicle for incorporating health-promoting ingredients: conceptualization and overview of quality and storage stability. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.13, n.4, p.627-655, 2014.

TONON, R.V.; BRABET, C.; HUBINGER, M.D. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried acai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. **Food Research International**, v.43, n.3, p.907-914, 2010.

UNDURTI, N.; DAS, M.D. Influence of polyunsaturated fatty acids and their metabolites on stem cell biology. **Nutrition**, v.27, n.1, p.21-25, 2011.

VILELA, V.R.; BAZOTTE, R.B. Balanço dietético de ácidos graxos poli-insaturados ômega 6 e ômega 3. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v.8, n.3, p.109-116, 2013.

YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; SILVA FILHO, D.F.; YUYAMA, K.; VAREJÃO, M.J.; FÁVARO, D.I.T.; VASCONCELLOS, M.B.A.; PIMENTEL, S.A.; CARUSO, M.S.F. Caracterização físico-química do suco de açaí de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. **Acta Amazonica**, v.41, n.4, p.545-552, 2011.



Capítulo 4

Inulina e proteínas de soro de leite melhoram os aspectos tecnológicos de sorvete simbiótico de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)**RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência dos fatores de inulina (I; X_1), concentrado proteico (WC; X_2) e isolado proteico de soro de leite (WI; X_3) sobre as características tecnológicas e sensoriais de sorvete de açaí suplementado com a cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG e o ingrediente prebiótico fruto-oligossacarídeo (FOS) durante o armazenamento dos sorvetes a $-18\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ por até 84 dias. Para esse fim, foi empregado um delineamento experimental *centroid simplex* de três fatores e um ponto central, utilizando diferentes proporções dos fatores X_1 , X_2 e X_3 , que compreenderam 4% do total dos ingredientes das formulações, totalizando 9 formulações de sorvete. As formulações WC (4% WC) e WI (4% WI) apresentaram os maiores valores de dureza, revelando que os fatores WC e WI exerceram forte influência na dureza dos produtos. As menores taxas de derretimento foram observadas nas formulações WI (4% de WI) e WC-WI (2% de WC; 2% de WI). Exceto para a formulação I-WC-WI, a presença de inulina nas demais formulações não alterou de forma significativa a velocidade de derretimento quando comparada a amostra controle. As formulações I-WI (2% de inulina; 2% de WI) e I-WC-WI (1,33% de inulina; 1,33% WC; 1,33 WI), apresentaram os maiores valores de *overrun* (37,95% e 39,18%, respectivamente). Os escores de aceitabilidade sensorial variaram de 5,83 a 7,63. Apenas as formulações WI (4% WI) e WC-WI (2% WC; 2% WI) aumentaram ($p < 0,05$) seus escores médios de aceitabilidade durante os 84 dias de armazenamento estudados e nas demais formulações não foram observadas diferenças significativas na aceitabilidade ao longo do armazenamento. A combinação dos fatores inulina, WC e WI nas formulações de sorvete de açaí contribuiu para os aspectos tecnológicos sem, no entanto, sem afetar a aceitabilidade sensorial pelo consumidor. Dessa forma, a combinação dos três ingredientes é recomendada, com inulina na proporção de 1,5 a 2% juntamente com WC e/ou WI na proporção de no máximo 2,5% no produto.

Palavras chave: Sorvete, açaí, simbiótico, análise sensorial, propriedades tecnológicas.

Inulin and whey protein improves technological aspects of synbiotic açai (*Euterpe oleracea* Mart.) ice cream**ABSTRACT**

The aim of this study was to investigate the influence of inulin (I; X_1), whey protein concentrate (WC; X_2), and whey protein isolate (WI; X_3) on the technological and sensory profiles of açai ice cream supplemented with the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG and the prebiotic fructo-oligosaccharide (FOS), during storage at $-18^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ up to 84 days. For this purpose, an experimental *centroid simplex* design was conducted with three factors and a central point, using different proportions of the factors X_1 , X_2 , and X_3 , which comprised 4% of the total formulation ingredients, resulting in 9 ice cream formulations. Formulations WC (4% of WC) and WI (4% of WI) showed the highest hardness values ($p < 0.05$), revealing that WC and WI exerted a strong influence on the product firmness. The lowest melting rate values were observed in formulation WI (4% of WI) and WC-WI (2% of WC, 2% of WI). However, the presence of inulin and WC showed strong influence on the melting rate of the ice creams, resulting in higher melting down of these products. I-WI and I-WC-WI formulations presented the highest *overrun* (37.95 and 39.18%, respectively). The sensory acceptability scores ranged from 5.83 to 7.63. WI and WC-WI formulations increased their mean acceptability scores significantly ($p < 0.05$) during 84 days of storage, whereas no significant differences were observed in acceptability throughout storage for the other formulations. Inulin, WC, and WI together contributed for the technological properties and did not affect the sensory acceptability by consumers. Thus, the combination of the three ingredients is recommended, with inulin proportions from 1.5 to 2% with WC and/or WI added of at most 2.5% in the product.

Keywords: Ice cream, açai, synbiotic, functional food, antioxidant activity.

1 INTRODUÇÃO

A busca por um estilo de vida mais saudável tem reforçado o desenvolvimento de alimentos funcionais (SIRÓ et al., 2008). O propósito do consumo de alimentos funcionais não se limita à saciedade e à ingestão de nutrientes, mas sim atua como um coadjuvante na manutenção da saúde e na redução do risco de doenças (SAAD et al., 2006; BUTT e SULTAN, 2013). A incorporação de culturas probióticas em alimentos tem o objetivo de fornecer ao consumidor, alimentos que melhoram e/ou restauram o equilíbrio da microbiota intestinal (BESTED et al., 2013). O sorvete é uma das sobremesas lácteas mais consumidas mundialmente e possui o potencial para a incorporação de culturas probióticas uma vez que, por ser armazenado congelado, favorece a preservação da viabilidade celular das culturas. Adicionalmente, os sorvetes são consumidos por uma ampla faixa etária (CRUZ et al., 2009).

O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma fruta nativa da América do Sul que tem se destacado no mercado de exportação, em virtude das tendências mundiais do consumo de alimentos saudáveis (PACHECO-PALENCIA et al., 2009; POMPEU et al., 2009). Muitas vezes considerada uma “super fruta”, o açaí se destaca devido ao seu potencial antioxidante e composição, que inclui quantidades expressivas de ácidos graxos insaturados, fibras e minerais (YUYAMA et al., 2011; RUFINO et al., 2011; KANG et al., 2012). A associação de frutas tropicais com sorvete probiótico pode melhorar tanto o seu sabor como sua propriedade funcional. Desse modo, o açaí pode ser considerado uma fruta adequada para o desenvolvimento de um novo produto funcional.

A inulina é um polissacarídeo não digerível constituído de unidades de frutose, a partir de ligações β (2-1). Ocorrem naturalmente em vegetais e frutas, como raiz de chicória, cebola, alho e banana. Além da função de fibra dietética, a inulina também exerce função prebiótica, uma vez que é fermentada seletivamente pelas bactérias do cólon, permitindo alterações específicas na composição da microbiota intestinal (LOBATO et al., 2009; MEYER et al., 2011; CRUZ et al., 2011). O grau de polimerização da cadeia de inulina pode variar de 2-60 unidades de monossacarídeos. A inulina nativa é normalmente caracterizada por um grau de polimerização médio de cerca de 12 unidades (GONZÁLEZ-THOMÁS et al., 2009; BAYARRI et al., 2010; MEYER et al., 2011;). O produto da hidrólise parcial da inulina nativa é chamado de oligofrutose, que possui o grau de polimerização variando de 2-8 unidades de frutose. Além dos benefícios a saúde, a inulina e a oligofrutose podem ser utilizadas como ingredientes na formulação de novos produtos, devido às funções tecnológicas que exercem (CARDARELLI et al., 2008; LOBATO et al., 2009). A

oligofrutose tem, em média, de 30-35% do dulçor da sacarose. Já a inulina possui capacidade de geleificação quando presente em uma solução, formando uma estrutura cremosa, propriedade esta que possibilita o seu uso como substituto de gordura (FRANK, 2002).

Inulinas com diferentes graus de polimerização são utilizadas como substitutos de gordura e açúcar em vários produtos lácteos (BAYARRI et al., 2010; TORRES et al., 2010; MAHDIAN et al., 2013). BAYARRI et al. (2010) constataram que a adição de inulina de cadeia curta e inulina nativa em sobremesas lácteas semi-sólidas deu origem a produtos de baixa caloria com propriedades similares de cremosidade, palatabilidade e consistência ao produto controle, fabricado com leite integral. Em outro estudo, a incorporação de inulina como substituto de gordura em sorvete, resultou no aumento de consistência e diminuiu o índice de escoamento dos produtos (MAHDIAN et al., 2013).

Dentre os ingredientes bastante utilizados na elaboração de sorvetes, destacam-se os concentrados e isolados proteicos de soro de leite são classificados quanto ao seu conteúdo proteico. Assim, os “concentrados” possuem de 35% a 80% de proteínas, enquanto que os “isolados” apresentam teor proteico de 85% a 90% (SMITHERS, 2008). Além dos aspectos nutricionais e funcionais, as proteínas de soro de leite apresentam importantes propriedades tecnológicas, uma vez que atuam como agente gelificante, estabilizantes e modificadores de textura em alimentos. Estudos sugerem que as proteínas concentradas do soro lácteo, quando adicionadas em misturas de sorvetes, são capazes de aumentar a viscosidade e diminuir a taxa de derretimento. Podem, ainda, melhorar aspectos de cremosidade, textura e sabor dos produtos (ALVAREZ et al., 2005; LIM et al., 2008; PANDIYAN et al., 2012). ALVAREZ et al. (2005) relataram que a utilização de concentrado proteico melhorou as propriedades de viscosidade e derretimento de sorvete, em comparação ao produto controle. De acordo com ALFAIFI et al. (2010) o aumento nos níveis de concentrado proteico (WPC-80) resultou em aumento no percentual de incorporação de ar (*overrun*) de sorvetes tipo gelato italiano.

O grande desafio no desenvolvimento de alimentos funcionais é a substituição dos ingredientes tradicionais por ingredientes alternativos, sem que haja alteração na qualidade do produto. As características de um sorvete probiótico de açaí, associado ao prebiótico inulina e proteínas concentradas de soro de leite não foi relatada na literatura. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a influência dos fatores inulina ($I; X_1$), concentrado proteico (WC; X_2) e isolado proteico de soro de leite (WI; X_3) sobre as características tecnológicas e sensoriais de sorvete de açaí suplementado com a cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG e o ingrediente prebiótico fruto-oligossacarídeo (FOS) durante o armazenamento dos sorvetes a $-18 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$ por até 84 dias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento experimental

Foram realizados ensaios, no sentido de avaliar os fatores inulina (X_1), concentrado proteico de soro ($WC = X_2$) e isolado proteico de soro ($WI = X_3$), adicionados durante a fabricação do sorvete, em diferentes proporções, mas sempre totalizando 4% do total das formulações do produto. Foi utilizado o delineamento experimental para misturas simples (*centroid simplex*) incluindo um ponto axial, que corresponde a um ponto interno (escolhido aleatoriamente) ao planejamento proposto. A **Figura 1** apresenta o desenho experimental do planejamento adotado. O ponto axial adicionado ao planejamento foi realizado para posterior estudo estatístico mais detalhado (BOX e DRAPER, 1987; BARROS Neto, 2007). A Tabela 1 mostra as diferentes formulações realizadas, dentro do planejamento experimental proposto.

Foi avaliada, ainda, uma formulação controle, não adicionada dos ingredientes inulina, WC e WI ($X_1, X_2, X_3 = 0, 0, 0$).

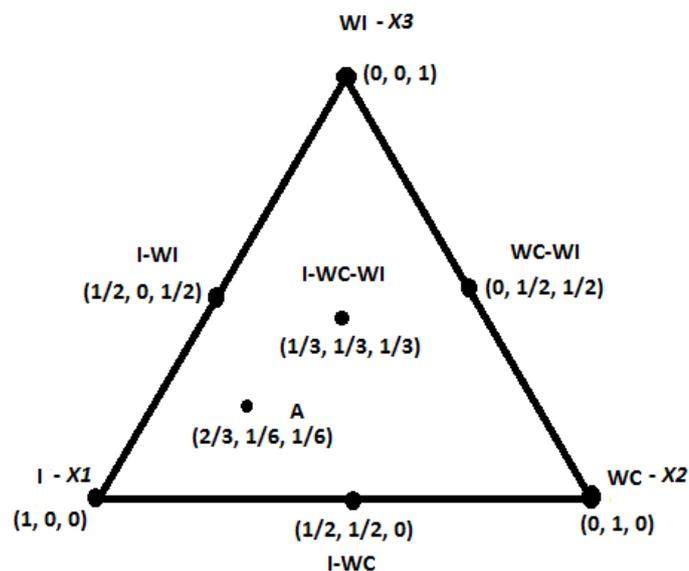


Figura 1 - Representação espacial das formulações de sorvete de açaí no planejamento adotado. Os vértices correspondem aos componentes (I, WC, WI) puros, os lados às misturas binárias dos componentes e os pontos do interior do triângulo, a mistura dos três componentes.

Tabela 1- Delineamento experimental *centroid simplex* empregado na elaboração das formulações de sorvete de açaí estudadas.

Formulações	Proporção de cada ingrediente da mistura	Quantidade de cada ingrediente (g) em 100 g de sorvete ¹			
		(X_1, X_2, X_3)	Inulina ²	WC ³	WI ⁴
			I (X_1)	(X_2)	(X_3)
I	(1, 0, 0)	4,00	0,00	0,00	0,00
WC	(0, 1, 0)	0,00	4,00	0,00	0,00
WI	(0, 0, 1)	0,00	0,00	4,00	0,00
I-WC	(1/2, 1/2, 0)	2,00	2,00	0,00	0,00
I-WI	(1/2, 0, 1/2)	2,00	0,00	2,00	0,00
WC-WI	(0, 1/2, 1/2)	0,00	2,00	2,00	0,00
I-WC-WI	(1/3, 1/3, 1/3)	1,33	1,33	1,33	0,00
A ⁵	(2/3, 1/6, 1/6)	2,60	0,70	0,70	0,00
C ⁶	---	0,00	0,00	0,00	0,00

¹Para cada 100 g de produto, 4 g da mistura total (inulina + WC +WI) foi adicionada aos demais ingredientes utilizados nas formulações de sorvete de açaí; ²Orafti®GR (Beneo-Orafti); ³Lacprodan 80® (Arlafoods); ⁴Lacprodan DI9224® (Arlafoods); ⁵Formulação aleatória; ⁶Formulação controle.

2.2 Obtenção do micro-organismo e preparo da cultura estoque

Para o preparo da cultura pura, o micro-organismo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG foi isolado a partir de cápsulas comerciais (Culturelle, Amerifit, EUA) e mantido em caldo MRS com glicerol (50% v/v) em temperatura de -80°C. A análise da sequência obtida a partir do gene 16S do RNA ribossômico da cultura estoque preparada demonstrou 99% de similaridade (nº de descrição do GenBank FM179322.1) com *Lactobacillus rhamnosus* GG quando submetida à comparação no programa BLASTn, o qual

utiliza-se do banco de dados NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). A ativação e preparo do pré-inóculo foi realizada com 1 mL da cultura estoque previamente ativada em caldo MRS por 20h a 37°C. O pré-inóculo (4% v/v) foi transferido para um volume maior de caldo MRS e incubado a 37°C por 16h, até que se atingisse a fase exponencial. Após esse período, o micro-organismo apresentou população de cerca de 10⁹ ufc/mL. Após a incubação, as células foram colhidas por centrifugação (5251,4 g x 10 min) em centrífuga Sorvall (modelo RC-5C), lavadas em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%), repetindo-se o processo de centrifugação e lavagem duas vezes.

A cultura do micro-organismo *Lactobacillus rhamnosus* GG foi ressuspensa em leite em pó desnatado reconstituído estéril 10%. Posteriormente, essa cultura ativada foi adicionada à mistura para a elaboração do sorvete.

2.3 Fabricação do sorvete de açaí

De acordo com o planejamento experimental adotado e descrito na **Tabela 1**, as formulações de sorvete de açaí foram produzidas em lotes de 4 Kg. Os ingredientes listados na **Tabela 2** foram misturados até completa uniformização da massa em misturador Geiger UMMSK-12 (Geiger, Pinhais, Brasil;), após a sua pesagem e mistura manual prévia (primeiramente, ingredientes líquidos, depois sólidos e, por último, ingredientes lipídicos). A mistura obtida foi pasteurizada a 85°C por 25 segundos, no próprio misturador. A seguir, a temperatura da massa foi reduzida a 40°C, para a adição do leite contendo a cultura probiótica. Após essa etapa, a mistura foi transferida para cabine refrigerada a 4 °C (Metalfrio, São Paulo, Brasil) para maturação da calda por 20 horas. Posteriormente, foi transferida para sorveteira Skymesen BSK-16 (Metalúrgica Skymesen, Brusque, Brasil), onde ocorreram os processos de batimento e congelamento simultâneos, por 15 minutos. Decorrida essa etapa, o produto foi acondicionado em potes plásticos de polipropileno próprios para alimentos (68 mm de diâmetro, 32 mm de altura, 55 mL de volume total, Tries Aditivos Plásticos, São Paulo, Brasil), em porções de 20 g. Os produtos obtidos foram armazenados em congelador vertical (Metalfrio, São Paulo, Brasil) a -18 °C.

Tabela 2 - Ingredientes fixos e variáveis e respectivas proporções, utilizados na produção das formulações de sorvete de açaí estudadas, de acordo com o planejamento experimental adotado e descrito na Tabela 1.

Ingredientes (%)	Formulações							A*	C**
	I	WC	WI	I-WC	I-WI	WC-WI	I-WC-WI		
Ingredientes fixos									
Polpa congelada de açaí ¹	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Leite em pó desnatado ²	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0
Sacarose ³	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Gordura Vegetal ⁴	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Glicose em pó ⁵	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
FOS ⁶	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Emulsificante/Estabilizante ⁷	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Cultivo de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG em leite	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Saborizante e aromatizante artificial de açaí ⁸	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Goma carragena ⁹	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Goma guar ¹⁰	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
Ingredientes variáveis									
Inulina (I)	4,0	-	-	2,0	2,0	-	1,33	2,6	-
WC	-	4,0	-	2,0	-	2,0	1,33	0,7	-
WI	-	-	4,0	-	2,0	2,0	1,33	0,7	-
Água	45,0	45,0	45,0	45,0	45,0	45,0	45,0	45,0	49,0
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

¹Polpa de açaí médio (Icefruit – Icefruit Comércio de alimentos, Tatuí, Brasil); ²Molico (Nestlé, Araçatuba, Brasil); ³Açúcar refinado (União, Limeira, Brasil); ⁴Gordura de palma 370SE (Agropalma, Belém, Pará); ⁵(Nutre, São Paulo, Brasil); ⁶Beneo® P95 (Orafit, Oreye, Bélgica); ⁷Emustab-Emulsificante e estabilizante neutro(Duas Rodas, Jaraguá do Sul, Brasil); ⁸Selecta tropical (Duas Rodas, Jaraguá do Sul, Brasil); ⁹Carrageenan(Danisco, Redhill, Reino Unido); ¹⁰Grindsted®Guar(Danisco, Redhill, Reino Unido); *A = formulação aleatória; **C = formulação controle

2.4 Determinação da dureza instrumental

As análises para a determinação da dureza das formulações de sorvete em estudo foram realizadas através de teste de corte, em analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems, Haslemere, Reino Unido), após 14 dias do preparo e armazenamento a $-18\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. Os procedimentos para a realização do teste de corte, utilizando o dispositivo de alumínio (*probe* Knife Edge- HDP/BS) 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), seguindo o procedimento adotado por HARAMI (2008). Os dados foram coletados através do programa Texture Expert for Windows – versão 1.20 (Stable Micro Systems). A análise foi realizada em apenas um determinado período de armazenamento (dia 14) e não ao longo do período de armazenamento. Esse procedimento adotado vai ao encontro do pressuposto de que a textura dos sorvetes não sofre variações significativas, quando estes são armazenados a temperaturas de $-18\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ ou inferiores (TRGO, 2003-2004). Para a realização da análise, foram utilizados os seguintes parâmetros: velocidade 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.

2.5 Fração de derretimento

A fração de derretimento das formulações sorvetes foi determinada adaptando-se o método descrito por MUSE e HARTEL (2004) e CORREIA et al. (2008), com a utilização de amostras com 60 g de sorvete de cada lote produzido.

Após 14 dias do preparo, as amostras armazenadas a $-18\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ foram retiradas do congelador e imediatamente dispostas sobre uma malha metálica com aproximadamente 0,5 cm de abertura, acomodadas sobre um funil e uma proveta volumétrica graduada, mantidas em temperatura ambiente ($25 \pm 1\text{ °C}$). O tempo de coleta dos primeiros 10 mL do produto drenado foi registrado e, a partir de então, medições do volume coletado foram realizadas a cada 3 minutos. O coeficiente de derretimento foi calculado considerando-se os volumes drenados e o período de coleta, os quais foram plotados em gráficos bidimensionais,

obtendo-se, assim, a fração de derretimento em mililitros por minutos (mL/min) a partir do coeficiente de inclinação da equação da reta obtida (CAVENDER e KERR, 2011).

2.6 *Overrun* – Incorporação de ar

A proporção de ar incorporado à calda durante o batimento e congelamento simultâneos é denominada *overrun*. Essa medição foi realizada durante a elaboração do sorvete, com a pesagem inicial da calda (250 mL) e depois do produto pronto (250 mL) para a avaliação do rendimento do sorvete. No presente estudo, o *overrun* foi obtido a partir de uma amostra de cada lote produzido, de acordo TRGO (2003-2004) e MUSE e HARTEL (2004), através do seguinte cálculo:

$$\text{Overrun (\%)} = \frac{\rho_{\text{calda}} - \rho_{\text{sorvete}}}{\rho_{\text{sorvete}}} \times 100 \quad \text{onde } \rho = \text{peso em 250 mL}$$

2.7 Determinação das contagens populacionais dos micro-organismos indicadores

Para a confirmação da segurança microbiológica dos sorvetes, foram realizadas análises dos micro-organismos indicadores de contaminação, conforme a legislação vigente para gelados comestíveis (ANVISA, 2001). Dessa maneira, foram investigados coliformes a 45°C, *Staphylococcus aureus* coagulase-positiva e *Salmonella* spp.

Alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas PetrifilmTMEC (3M Microbiology, St. Paul, EUA), para a determinação de coliformes e *Escherichia coli* e para placas PetrifilmTMYM (3M Microbiology), para a contagens de bolores e leveduras. As placas PetrifilmTMEC foram incubadas a 37°C por 24 horas e as placas PetrifilmTMYM foram incubadas a 25°C por 5 dias, de acordo com as recomendações do fabricante.

Adicionalmente, a partir de amostras mantidas congeladas, foram realizadas a investigação de *Staphylococcus aureus* coagulase-positivas e de *Salmonella* spp. das diferentes formulações do sorvete funcional, de acordo com os requisitos da legislação brasileira para sorvetes (ANVISA, 2001). Essas análises microbiológicas foram realizadas no

Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF/USP, utilizando-se a metodologia descrita por DOWNES e ITO (2001).

Para a contagem de *Staphylococcus coagulase*-positiva, alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas na superfície de placas contendo ágar Baird-Parker (Oxoid) adicionado de telúrio de potássio 1% (10 mL/940 mL de meio) e gema de ovo (50 mL/940 mL de meio). As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas (DOWNES e ITO, 2001).

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., porções de 25 g de produto, retiradas em condições de assepsia, foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada tamponada 2% (pH $7,0 \pm 0,2$ a 25°C) e incubadas a 35-37°C durante 24 horas, para a etapa de pré-enriquecimento. Alíquotas de 0,1 mL e de 1 mL das diluições pré-enriquecidas foram transferidas para tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) (Oxoid) e 10 mL de caldo tetrionato (TT), respectivamente, e incubadas a 42°C (RV) e a 35°C (TT), por 24 horas, para a etapa de enriquecimento. Alçadas de cada cultura de enriquecimento foram semeadas em placas contendo ágar sulfito de bismuto (SBA) (Oxoid), ágar Hektoen-Enteric (HE) (Oxoid) e ágar Rambach (RAM) (Merck) e incubadas a 35-37°C, por 24 horas. Quando necessários, as colônias típicas de *Salmonella* spp. foram submetidas a testes bioquímicos e sorológicos para identificação (DOWNES e ITO, 2001).

2.8 Avaliação sensorial

A avaliação sensorial das formulações de sorvetes foi realizada após 3 períodos de armazenamento congelado ($-18 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$) intermediários (7, 28 e 84 dias). Cada sessão de análise sensorial contou com a presença de 30 consumidores adultos (provadores não treinados) que analisaram até duas amostras por sessão. A avaliação sensorial foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, através de teste de aceitabilidade, utilizando escala hedônica estruturada de 9 pontos, com variação de gostei muitíssimo (9 pontos) a desgostei muitíssimo (1 ponto) (LAWSLESS e HEYMANN, 1999). O modelo da ficha de avaliação sensorial usada nas análises encontra-se em anexo.

As amostras (Ca. 20 g), codificadas com 3 dígitos aleatórios, foram servidas aos consumidores após serem mantidas em condições de refrigeração por um período de aproximadamente 15 minutos. Os provadores foram instruídos a relatar os atributos sensoriais

que mais gostaram e que menos gostaram naquelas amostras, atributos estes relacionados ao sabor, textura, aparência e aroma. Quando tais citações não constavam na ficha de análise, considerou-se que o provador foi “indiferente” ao atributo em questão.

A avaliação sensorial do presente trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Parecer 07/2011 de 7/02/2011; anexo 1).

2.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Para a análise estatística, foi verificada a normalidade dos resultados, através do teste Hartley, com $\alpha = 0,05$. Foi constatada a distribuição normal dos resultados. Portanto, foi empregada a Análise de Variância (ANOVA), com utilização do teste de Tukey (teste de comparação de médias).

Os resultados relativos à análise sensorial nos três intervalos de tempo (7, 28 e 84 dias) não apresentaram variância homogênea conforme teste de Hartley. Portanto, diferenças entre as formulações foram avaliadas em cada intervalo de tempo através de teste de Kruskal-Wallis ANOVA, assim como diferenças entre os intervalos foram avaliadas para cada tratamento através de teste de Friedman ANOVA.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Dureza instrumental e velocidade de derretimento

Os resultados de dureza instrumental (N) e velocidade de derretimento (ml/min) dos sorvetes de açaí estão apresentados na **Tabela 3**. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes formulações de sorvete de açaí para os parâmetros de dureza e velocidade de derretimento no período de 14 dias de armazenamento congelado.

Tabela 3 - Valores de dureza (N) e velocidade de derretimentos (mL/min) (média \pm desvio padrão) obtidos para as formulações de sorvete de açaí aos 14 dias de armazenamento sob congelamento ($-18 \pm 3^\circ\text{C}$). Vide Tabela 1 para a descrição das formulações.

Formulações	Dureza (N)	Velocidade de derretimento (mL/min)
I	96,16 \pm 29,92 ^{ef}	1,44 \pm 0,02 ^{cd}
WC	211,04 \pm 23,61 ^a	1,65 \pm 0,09 ^a
WI	173,04 \pm 28,19 ^{ab}	0,97 \pm 0,02 ^g
I-WC	110,53 \pm 22,49 ^{cdef}	1,44 \pm 0,03 ^{cd}
I-WI	122,01 \pm 16,79 ^{cde}	1,61 \pm 0,02 ^{ab}
WC-WI	153,83 \pm 23,81 ^{bc}	1,15 \pm 0,03 ^d
I-WC-WI	144,02 \pm 30,86 ^{bcd}	1,32 \pm 0,07 ^d
A	105,67 \pm 27,38 ^{def}	1,50 \pm 0,02 ^{bc}
C	77,66 \pm 22,34 ^f	1,50 \pm 0,04 ^{bc}

^{a,b,c,d} letras minúsculas sobrescritas distintas entre as linhas da mesma coluna indicam diferença significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes formulações.

As formulações WC (4% de WC) e WI (4% de WI) apresentaram os maiores valores médio de dureza ($p < 0,05$), seguido da WC-WI (2% de WC+2% de WI). Esse efeito, possivelmente, está relacionado com o processo de gelatinização, que ocorre com WC e WI, resultando em aumento da consistência do produto através da retenção de água pela matriz (BURITI et al., 2010; ANTUNES et al., 2013). Quando em soluções, esses concentrados e isolados proteicos de soro de leite formam géis estáveis com o aquecimento. As propriedades dos géis formados são influenciadas por fatores como a concentração de proteína, pH,

temperatura e duração do tratamento térmico (ANTUNES et al., 2003). De acordo com YAMUL et al. (2013), a concentração de proteína desempenha um papel fundamental na formação do gel, e diferentes texturas podem ser encontradas com diferentes concentrações proteicas. Com o aumento da concentração proteica ocorre modificação da textura dos géis, resultando em aumento de firmeza e intensificando a retenção de água pela matriz (ANTUNES et al., 2003).

A formulação I (4% de inulina) apresentou o menor valor de dureza, não diferindo significativamente ($p>0,05$) da amostra controle. De fato, o uso da inulina pela indústria de alimentos tem sido explorado, devido as suas propriedades tecnológicas e nutricionais. No presente estudo, as formulações de sorvete contendo inulina se apresentaram menos firmes quando comparada às formulações de sorvete contendo WC e WI. A alteração da textura de produtos alimentícios adicionados de inulina ocorre devido a competição da molécula de inulina pela água da matriz, o que resulta na formação de um gel que pode aumentar a viscosidade do produto pelo aprisionamento de água (BURITI et al., 2010).

Outras características de textura podem ser alteradas com o emprego de inulina como cremosidade e paladar (GUGGISBERG et al., 2009). Entretanto, a dureza estará relacionada com a concentração na qual a inulina é adicionada nos produtos (BAYARRI et al., 2010). GONZÁLEZ-TÓMAS et al. (2009) afirmaram que, em geral, a adição de inulina em concentrações inferiores a 5% em produtos lácteos líquidos e semi-sólidos não modifica as características desses produtos. Alterações na textura são alcançadas quando se utiliza inulina de cadeia longa, em concentração acima de 7%. Em nosso estudo, o emprego de 4% de inulina não modificou significativamente ($p>0,05$) a dureza em relação à amostra controle.

KARACA et al. (2009) também observaram que o emprego de inulina (4%) em sorvete com teor de gordura reduzido demonstrou viscosidade e coeficiente de consistência semelhante ao produto controle. Por outro lado, assim como observado no presente trabalho, no caso da adição das proteínas de soro de leite, o emprego de um substituto de gordura de base proteica elevou a dureza do produto. BAYARRI et al. (2010) relataram que a adição de 7,5% inulina de cadeia longa deu origem a um produto de baixo teor de gordura com a mesma intensidade de espessura da amostra controle, que continha 3,5% de gordura. Tanto o tamanho como o volume dos cristais de gelo contribuíram para a dureza dos sorvetes (MUSE e HARTEL, 2003). SAKURAI et al. (1996) constataram que sorvetes com cristais maiores eram mais duros do que sorvetes com cristais menores. Quando em contato com a água ou

leite, a inulina possui a capacidade de formar microcristais, em virtude de sua cadeia longa. Nas formulações de sorvete de açaí I (4% de inulina), I-WC (2% de inulina+2% de WC) e A (2,6% de inulina+0,7% de WC+0,7% WI), possivelmente, a formação de microcristais interagiu para formar uma textura cremosa e sem, no entanto, alterar a dureza dos produtos em relação à formulação controle (BAYARRI et al., 2010; MEYER et al., 2011).

Curiosamente, o valor de dureza de I-WC (2% de inulina+2% de WC) não apresentou diferença estatística ($p>0,05$) comparada à formulação controle. Entretanto, o mesmo comportamento não foi verificado para a I-WI (2% de inulina+2% de WI), que demonstrou valor de dureza significativamente maior ($p<0,05$) em relação à formulação controle. Nesta última, uma possível interação entre inulina e as proteínas do soro de leite promoveu maior estabilidade da matriz, levando-se em consideração que a concentração de lactoglobulina pode diferir entre os concentrados e isolados proteicos de soro de leite e esta proteína é a principal constituinte desses concentrados e possui papel fundamental na formação de redes proteicas (AKIN et al., 2008).

A formulação aleatória A (2,6% de inulina+0,7% de WC+0,7% de WI) não diferiu da formulação controle C. Possivelmente, a presença da inulina contribuiu para a formação de uma matriz menos firme. Já WC-WI (2% de WC+2% de WI) e I-WC-WI (1,33% de inulina+1,33% de WC+1,33% de WI) apresentaram valores de dureza significativamente maiores ($p<0,05$) que a formulação controle C. Semelhantemente, ALFAIFI et al. (2010) observaram que a incorporação de diferentes níveis de concentrado proteico aumentou a dureza de gelatos com 4,5% de gema de ovo. Os autores comentaram que um gel é formado como resultado de uma rede tridimensional de agregados de moléculas proteicas. Esta rede tridimensional formada aprisiona água por meio de forças de capilaridade, resultando em aumento da firmeza dos produtos.

A incorporação dos fatores estudados (I, WC e WI) aos sorvetes, resultou em alterações significativas ($p<0,05$) na velocidade de derretimento dos produtos. O processo de derretimento de sorvetes é afetado por fatores como: quantidade de ar incorporado, natureza dos cristais de gelo formados e rede de glóbulos de gordura formada durante o congelamento (MUSE e HARTEL, 2003). A **Tabela 3** apresenta as taxas de derretimento (medida como velocidade de derretimento) das formulações de sorvete de açaí.

Os maiores valores de taxa de derretimento foram obtidos nas formulações WC (4% de WC) e I-WI (2% de inulina; 2% de WI). Um dos fatores que influencia a taxa de fusão de

sorvetes é o tamanho dos cristais de gelo formados. Cristais grandes aumentam a taxa de derretimento, uma vez que levam mais tempo para derreter e, desse modo, a velocidade de derretimento é menor. PATEL et al. (2006) sugeriram que a propriedade das proteínas do soro de leite de aprisionar água resulta em menos água livre disponível para formar cristais de gelo, resultando na formação de cristais pequenos em sorvetes. Neste caso, a possível formação de cristais pequenos de gelo resultou em velocidade de derretimento maior nas formulações WC e I-WI. As formulações A (2,6% de inulina+0,7% de WC+0,7% de WI), C (isenta dos fatores estudados), I (4% de inulina) e I-WC (2% inulina+2% de WC) não diferiram entre si ($p>0,05$). A presença de inulina nas formulações A, I e I-WC pode ter contribuído para a formação de microcristais, os quais, por sua vez, contribuíram para maiores velocidades de derretimento quando comparado às formulações WI, WC-WI, I-WC-WI, com maiores níveis de concentrados e isolados proteicos. Diferentemente, AKALIN et al. (2008) observaram velocidades de derretimentos maiores em sorvetes de reduzido e baixo teor de gordura produzidos com inulina comparado a amostra controle. Entretanto, o controle do referido estudo continha 4% e 7% a mais de gordura do que os sorvetes com teor reduzido e baixo de gordura, respectivamente. A transferência de calor no produto é dependente das moléculas presentes na mistura. Geralmente a presença da gordura diminui a transferência de calor nos sorvetes. Consequentemente, sorvetes contendo mais gordura derretem a uma taxa mais lenta (GOFF e HARTEL, 2013). Em nosso estudo, a quantidade de gordura esteve fixa em todas as formulações o que nos leva a crer que as diferenças observadas nas velocidades de derretimento dos sorvetes ocorreram devido à presença e interação dos fatores estudados (inulina, WC e WI).

Os menores valores de velocidade de derretimento ($p<0,05$) foram observados nas formulações WI (4% de WI), WC-WI (2% de WC+2% de WI) e I-WC-WI (1,33% de inulina+1,33% de WC+1,33% de WI). Uma maior concentração proteica nos produtos tratados com WC e WI, provavelmente, levou à formação de um gel coeso e estável, retardando a taxa de fusão dessas formulações. WC e WI possuem a propriedade funcional de modificar a textura dos alimentos através do processo de gelatinização. Quando em soluções, esses concentrados e isolados proteicos de soro de leite formam géis estáveis através do aquecimento (ANTUNES et al., 2003). RUFFIN et al. (2014) observaram que um pré-aquecimento (80°/30s) de uma emulsão contendo isolado proteico esteve diretamente relacionado com a estabilização final do gel formado. Os autores sugeriram que o pré-aquecimento provoca desnaturação de WI, o que resulta em aumento de hidrofobicidade da

molécula e, conseqüentemente, maior viscosidade da emulsão. Misturas de sorvetes mais viscosas apresentam tendência de fusão mais lenta (GOFF e HARTEL, 2013). De fato, as formulações com maior resistência a fusão foram aquelas que apresentaram também maior dureza, e este comportamento esteve relacionado com maior concentração de WC e WI nas formulações de sorvete estudadas.

Outros componentes das formulações, como sacarose e frutose, interagindo com esse sistema podem ter contribuído para a formação de um gel estável. YAMUL et al. (2013) sugeriram que a presença de sacarose em um gel proteico aumenta a capacidade de retenção de água dessa estrutura, a qual se estabiliza ainda mais, dependendo do pH do meio. Resultados similares ao presente trabalho foram encontrados por AKALIN et al. (2008). Os autores observaram que sorvete com teor reduzido de gordura adicionado de isolado proteico apresentou menor taxa de fusão em relação à amostra controle e à amostra adicionada de inulina. Os autores atribuíram tal observação à estabilização da emulsão de sorvete na presença de WI pela formação de uma rede de proteínas.

O registro visual das amostras durante o teste de derretimento (**Figura 2**) fornece subsídios para acompanhar o colapso da estrutura e a interpretação das velocidades de derretimentos apresentadas na **Tabela 3**.

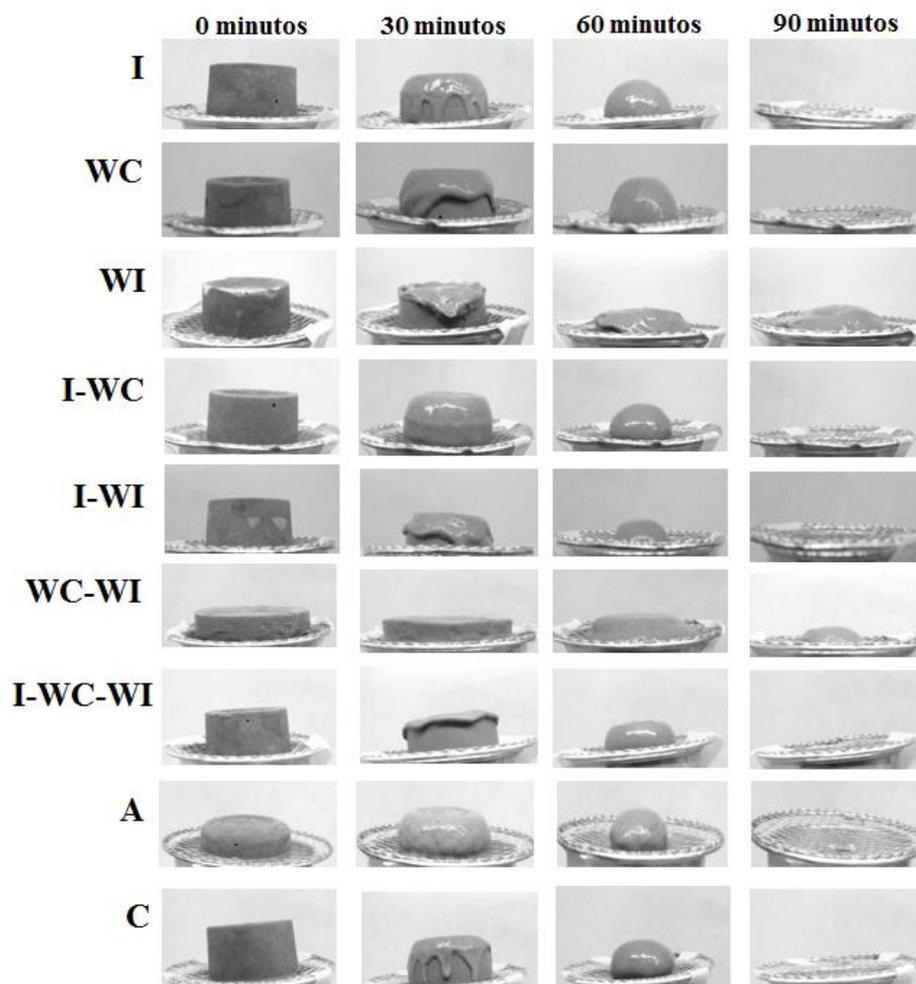


Figura 2 - Comportamento das formulações de sorvete de açai durante o teste de derretimento (vide Tabela 1 para as descrições das formulações).

Em geral, a incorporação de inulina nas formulações não elevou nem diminuiu o derretimento das formulações estudadas, ou seja, isto demonstra o comportamento de sorvetes que não derretem tão rápido e tampouco tão lentamente, conforme foi observado para as formulações contendo WC e WI. Adicionalmente, a presença de inulina favoreceu a textura dos sorvetes, uma vez que as formulações contendo essa fibra apresentaram menores valores de dureza. De acordo com GOFF (2013), a textura macia de sorvetes é um fator que influencia positivamente a escolha desse alimento pelos consumidores.

3.2 *Overrun* – Incorporação de ar

O *overrun* é o cálculo industrial do ar adicionado às sobremesas congeladas aeradas. É calculado como a porcentagem do aumento do volume da mistura que ocorre como resultado da adição de ar durante o processo de batimento e congelamento. O cálculo do *overrun* é essencial na produção de sorvetes, uma vez que está diretamente ligado com a qualidade e estabilidade do produto e o rendimento do processo (MUSE e HARTEL, 2013).

Os valores de incorporação de ar (*overrun*) obtidos durante a produção dos sorvetes de açaí são apresentados na **Figura 3**. Foram observadas três grupos de médias de *overrun* das diferentes formulações que diferiram entre si ($p < 0,05$).

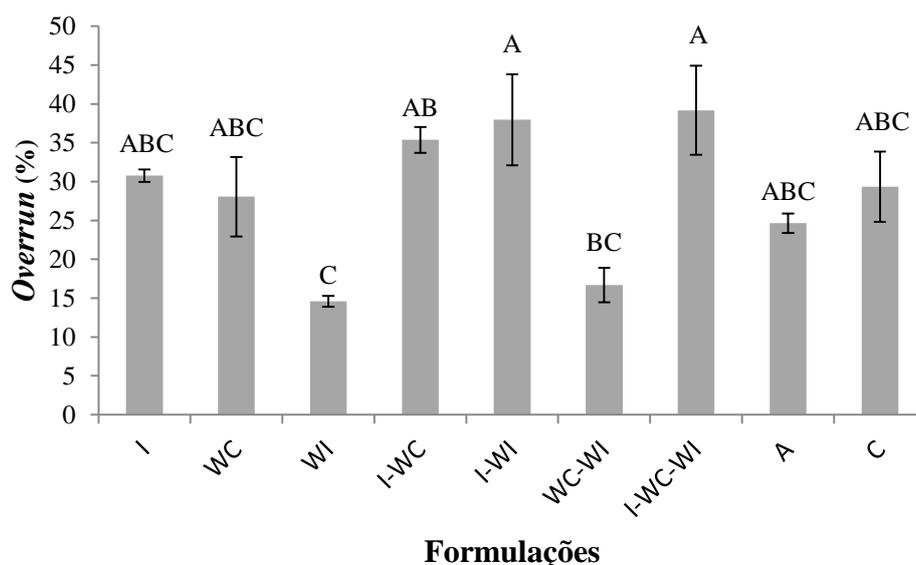


Figura 3 - Valores de *overrun* obtidos para as diferentes formulações de sorvetes açaí, após agitação e congelamento a -2° a -3°C em produtora para sorvete (vide Tabela 1 para a descrição das formulações).

Os valores de *overrun* dos sorvestes de açaí variaram de 14,58%, para formulação WI (4% de WI) a 39,18%, para a formulação I-WC-WI (1,33% de inulina+1,33% de WC+1,33% WI). Em geral os valores de incorporação de ar em sorvetes comerciais se apresentam na faixa de 25% a 150%. Pela legislação brasileira, o *overrun* é interpretado como densidade aparente e independente do tipo de sorvete, devendo apresentar o valor máximo de 475 g/L, o que corresponde a 110% de *overrun* (ANVISA, 2005). Um dos fatores que está fortemente ligado à incorporação de ar em sorvetes é a quantidade de gordura das formulações, uma vez que as gotículas de gordura coalescentes aprisionam maior quantidade de bolhas de ar no sorvete (SUN-WATERHOUSE et al., 2013). Em uma formulação padrão, o conteúdo de gordura varia de 8% a 20% e promove algumas funções, como a estabilização da espuma formada. Pode ser difícil obter *overrun* acima de 60% em produtos onde as gorduras estão presentes em pequenas quantidades (GOFF e HARTEL, 2013; SUN-WATERHOUSE et al., 2013). Nas formulações desenvolvidas do presente trabalho, o conteúdo de gordura fixo de 4% provavelmente interferiu para os baixos valores de incorporação de ar nos sorvetes. Em sorvetes italianos conhecidos como gelatos, por exemplo, o baixo conteúdo de gordura (geralmente de 4% a 8%) resulta em baixo valor de *overrun* (20-40%) (GOFF e HARTEL, 2013).

As formulações WI (4% de WI) e WC-WI (2% de WC+2% de WI), que apresentaram menores valores de velocidade de derretimento, demonstraram também menores valores de *overrun*. Já o inverso foi observado para a formulação I-WC-WI (1,33% de inulina; 1,33% de WC; 1,33% de WI) que apresentou o maior valor de *overrun* e o menor valor de derretimento após a WI e WC-WI. Alto valor de *overrun* e derretimento lento em sorvetes podem ser atribuídos, possivelmente à diferença na taxa de transferência de calor que ocorre pela maior presença de ar. O ar é um bom isolante térmico e, nesse caso, retardaria a taxa de transferência de calor para o sorvete com alto *overrun*. Por outro lado, a quantidade, tamanho e estabilização das bolhas de ar formadas também influenciam consideravelmente o *overrun*. Em geral, bolhas de ar pequenas, uniformes e em grande quantidade resultam em maior *overrun* (SOFJAN e HARTEL, 2004; GOFF e HARTEL, 2013). No caso das formulações WI e WC-WI, a maior quantidade de proteínas presente possivelmente levou ao maior aprisionamento de água pela matriz, dificultando a entrada de ar nos sorvetes e isto resultou em formulações com menor *overrun* e maior dureza instrumental, o que conseqüentemente dificultou a taxa de fusão destas amostras.

Os resultados encontrados no presente estudo corroboram com AKALIN et al. (2008), que relataram valores de *overrun* na faixa de 20,7% - 39,2%, em sorvetes com teor reduzido e baixo de gordura contendo proteína isolada de soro e inulina. O maior valor de *overrun* relatado pelos autores foi obtido no sorvete de baixo teor de gordura contendo inulina, enquanto que o mais baixo foi encontrado no sorvete contendo isolado proteico. Já em trabalho realizado por ALVAREZ et al. (2005) a presença de concentrados proteicos nas formulações de sorvete aumentou o *overrun* em relação à formulação controle. Os autores comentaram que a desnaturação proteica, que ocorre no processo de concentração das proteínas do soro de leite, bem como no próprio processamento térmico obrigatório que ocorre durante a produção de alguns alimentos, pode facilitar maior absorção de ar pela matriz. Alguns trabalhos relatam que proteínas desnaturadas melhoram a propriedade de formação de espuma, atribuindo esta característica ao aumento da hidrofobicidade das moléculas de proteínas (LIM et al., 2008; BERNARD et al., 2011). Entretanto, a temperatura de desnaturação dos concentrados e isolados proteicos deve ser levada em consideração. Relata-se que temperatura moderada (40-50°C) melhora a propriedade de formação de espuma, ao passo que tratamento térmico acima de 70°C resulta em diminuição desta propriedade, pela desnaturação irreversível e agregação das proteínas de soro de leite (LIM et al., 2008). A melhora de incorporação de ar e estabilidade de espuma foi observada em formulações de sorvete com baixo conteúdo de gordura, incorporados de concentrado proteico previamente tratado por alta pressão hidrostática e temperatura não superior a 40°C (LIM et al., 2008).

Em nosso estudo, as formulações contendo inulina demonstraram uma tendência a maiores valores de *overrun*. Do mesmo modo, MANDIAN et al. (2013) observaram que amostras de sorvete contendo inulina apresentaram *overrun* na mesma faixa da amostra controle. Já a adição de concentrado proteico demonstrou diminuir o valor de *overrun*. Diferentes valores de *overrun* podem ser obtidos dependendo das características das formulações, tipo de produto que se deseja obter e processo de produção. Em nosso estudo, foram obtidas formulações de sorvetes firmes e com incorporação de ar inferior a produtos tradicionais. No entanto, deve-se levar em consideração a presença de ingredientes funcionais e o conteúdo reduzido de gordura, o que torna os produtos mais saudáveis e de alto valor agregado.

3.3 Parâmetros microbiológicos sanitários

Não foi detectada a presença de coliformes a 45°C, *Staphylococcus aureus* coagulase-positiva e *Salmonella* spp., em nenhuma das amostras analisadas. Deste modo, as nove formulações de sorvete de açaí apresentaram-se de acordo com os padrões legais vigentes aprovados pelo Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos estabelecidos pela ANVISA (2001).

3.4 Aceitação sensorial dos sorvetes

Os escores de aceitabilidade das formulações de sorvete de açaí, após 7, 28 e 84 dias de armazenamento estão apresentados na tabela 4 (1 = desgostei muitíssimo; 5 = nem gostei nem desgostei; 9 = gostei muitíssimo). Participaram deste estudo 450 provadores, dos quais 63% do sexo feminino e 37% do sexo masculino.

Tabela 4 - Aceitabilidade sensorial obtida para as formulações de sorvete de açaí armazenadas por até 84 dias sob congelamento (-18±3°C). Vide Tabela 1 para a descrição das formulações.

Tempo (dias)	Formulações								A	C
	I	WC	WI	I-WC	I-WI	WC-WI	I-WC-WI			
7	6,47 ±1,57 ^{ABa}	6,50 ±1,63 ^{ABa}	5,83 ±1,05 ^{Bb}	5,97 ±1,67 ^{Ba}	6,97 ±1,16 ^{ABa}	6,73 ±1,31 ^{ABab}	6,13 ±1,38 ^{ABa}	7,30 ±1,42 ^{Aa}	6,63 ± 1,33 ^{ABa}	
28	6,00 ±1,57 ^{Ba}	6,00 ±1,63 ^{Ba}	6,27 ±1,10 ^{ABb}	6,70 ±1,58 ^{ABa}	6,20 ±1,35 ^{ABa}	6,23 ±1,28 ^{ABb}	6,70 ±1,12 ^{ABa}	6,73 ±1,31 ^{ABa}	7,13 ± 0,90 ^{Aa}	
84	6,23 ±1,38 ^{Ca}	6,47 ±1,76 ^{ABCa}	7,63 ±1,10 ^{Aa}	6,40 ±1,22 ^{BCa}	6,73 ±1,62 ^{ABCa}	7,37 ±1,07 ^{ABCa}	6,67 ±1,24 ^{ABCa}	6,47 ±1,43 ^{ABCa}	6,50 ± 1,46 ^{ABCa}	
Média	6,23 ±1,51	6,32 ±1,67	6,58 ±1,08	6,36 ±1,49	6,63 ±1,38	6,78 ±1,22	6,51 ±1,25	6,83 ±1,39	6,75 ± 1,23	

(Formulações)

^{A,B} Letras maiúsculas distintas sobrescritas em uma mesma linha indicam diferença significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes formulações estudadas no mesmo período de armazenamento. ^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas em uma mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes períodos estudados para uma mesma formulação.

Em geral, todas as formulações apresentaram boa aceitabilidade sensorial ao longo do armazenamento, com notas médias variando entre 5,83 a 7,63. As maiores médias de aceitabilidade sensorial ($p < 0,05$) foram observadas para as formulações WI, WC-WI, A e C (7,63; 7,37; 7,30; 7,13, respectivamente) nos diferentes períodos de estocagem. No 7º dia de armazenamento as formulações WI e I-WI apresentaram notas médias (5,83 e 5,97, respectivamente) inferiores ($p < 0,05$) às demais formulações. Entretanto este mesmo comportamento não foi observado aos 28 dias, onde as formulações I e WC demonstraram valores de aceitabilidade significativamente menor que as demais formulações (nota média 6,0 cada uma). Ao final de 84 dias de estudo a formulação I manteve a menor média (6,23) ($p < 0,05$). Contudo, a aceitabilidade sensorial da formulação WC (6,47) não diferiu das demais formulações de sorvetes de açaí.

Ao longo do período de estocagem, apenas as formulações WI e WC-WI aumentaram ($p < 0,05$) seus escores médios de aceitabilidade. Nas demais formulações não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) na aceitabilidade durante os períodos de armazenamento estudados. Aos consumidores, foi solicitado que apontassem características positivas e negativas das amostras avaliadas. Os atributos mais citados foram: sabor, textura e cor. Tais informações estão apresentadas na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Número de citações dos atributos sensoriais (sabor, textura e cor) mencionados pelos consumidores como mais apreciados e menos apreciados, nos três períodos de análises sensoriais realizadas com as formulações de sorvete de açaí

Classificação	Formulações	7 dias			28 dias			84 dias		
		Sabor	Textura	Cor	Sabor	Textura	Cor	Sabor	Textura	Cor
Mais apreciado	I	22	7	1	19	10	2	16	12	0
	WC	15	17	1	11	18	1	15	12	0
	WI	18	7	0	15	20	0	18	16	0
	I-WC	15	14	2	19	15	0	17	7	2
	I-WI	21	14	1	17	18	2	13	17	0
	WC-WI	17	16	0	16	18	0	14	17	1
	I-WC-WI	12	15	1	11	16	3	20	5	0
	A	18	17	1	11	17	0	17	11	1
	C	14	20	2	20	17	1	15	5	1
Total		152	127	9	139	149	9	145	102	5
Menos apreciado	I	7	15	13	8	10	6	11	11	9
	WC	7	8	11	14	8	5	9	8	9
	WI	11	12	5	10	10	12	5	10	9
	I-WC	11	10	6	11	9	12	3	13	6
	I-WI	7	12	10	8	5	10	8	6	7
	WC-WI	10	5	4	10	8	11	6	11	8
	I-WC-WI	12	12	8	18	6	7	2	5	6
	A	8	7	6	9	7	6	6	6	4
	C	9	3	14	7	8	12	4	10	12
Total		82	84	77	95	71	81	54	80	70

Dentre os critérios utilizados para atribuição de escores, o sabor foi mencionado como atributo mais apreciado entre os consumidores, enquanto a cor destacou-se como atributo menos apreciado. A expectativa dos consumidores em relação à cor não foi alcançada, devido à coloração marrom apresentada pelos sorvetes de açaí desenvolvidos do presente estudo, diferente da coloração roxa na qual o açaí é normalmente consumido. SABBE et al. (2009) também observaram influência negativa da cor marrom na aceitabilidade de sucos com 40% de polpa de açaí. A polpa de açaí está sujeita a algumas alterações químicas e enzimáticas relacionadas com o processo de oxidação. A modificação da cor é uma alteração decorrente da perda de estabilidade das antocianinas, que é o principal pigmento que dá a coloração característica do açaí. Neste caso, o produto perde sua coloração violácea e adquire uma coloração marrom, em virtude da ação de enzimas (ZOZIO et al., 2010; ALBARICI et al., 2012). Possivelmente, a ocorrência de alterações enzimáticas na polpa de açaí, bem como interações com outros ingredientes adicionados nas formulações dos sorvetes, resultou na desestabilização das antocianinas resultando em modificação da cor dos produtos desenvolvidos.



Figura 4 - Aparência geral dos sorvetes de açaí servidos aos consumidores na análise sensorial.

As frequências relativas das notas atribuídas às formulações de sorvete de açaí em cada período de armazenamento avaliado (7, 28, 84) estão apresentadas na **Figura 5**. Maiores frequências de notas foram observadas entre o ponto 4 (valor correspondente na escala a “desgostei ligeiramente”), ao ponto 9 (valor correspondente na escala a “gostei muitíssimo”). De modo geral, as notas apresentaram maior frequência na região de aceitação da escala hedônica de 9 pontos utilizada, o seja, acima de 5 (valor correspondente na escala a “nem gostei nem desgostei”).

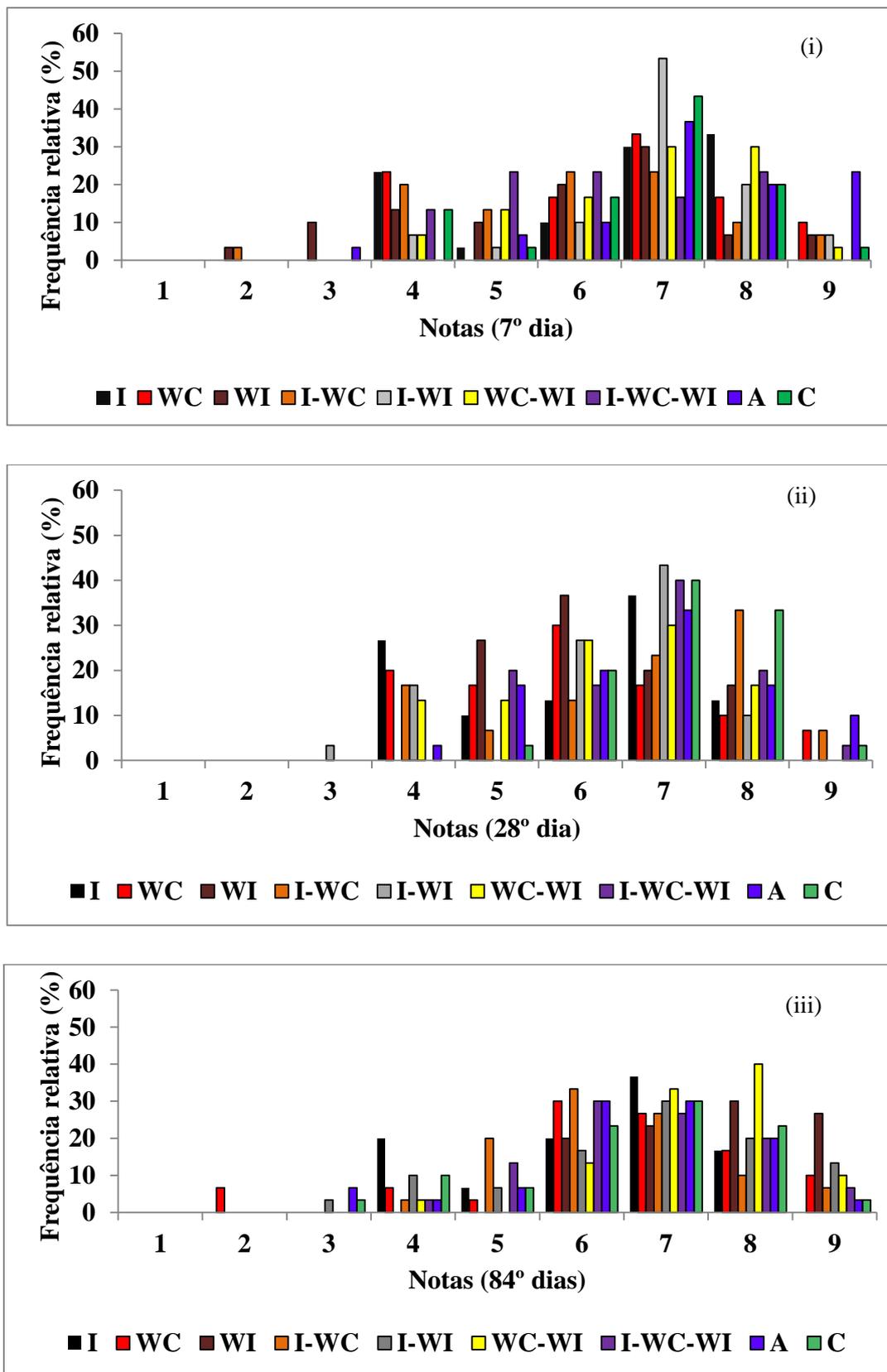


Figura 5 - Frequência relativa das notas atribuídas às formulações de sorvete de açaí em cada período de armazenamento avaliado, 7º, 28º, 84º dias (i, ii, iii, respectivamente).

MENEZES et al. (2011) conduziram um trabalho para avaliar a aceitação de consumidores norte-americanos em relação a diferentes produtos à base de açaí. Dentre os produtos estudados, o sorvete apresentou os maiores escores de aceitação geral (6,1), sabor (6,4) e sabor residual (5,9), indicando a preferência dos consumidores por esse produto, comparado aos demais estudados (sucos, *smoothies* e bebida energética). O açaí possui potencial para o uso no desenvolvimento de produtos inovadores, uma vez que o seu consumo está relacionado com bem estar e promoção de saúde. Adicionalmente, a incorporação de culturas probióticas às sobremesas congeladas tem sido tema de estudo, com objetivo de diversificar os alimentos probióticos disponíveis no mercado (CRUZ et al., 2009).

No presente trabalho, a incorporação do probiótico *L. ramosus* GG, o qual manteve população média acima de 8,8 ufc/g até o final do estudo (dados não mostrados), não influenciou as características sensoriais das formulações de sorvete de açaí desenvolvidas. Do mesmo modo, NOUSIA et al. (2011) relataram que a suplementação de sorvete com a cultura probiótica liofilizada de *L. acidophilus* apresentou mínimo efeito nas características sensoriais do produto. Por outro lado, a incorporação da mesma cultura de forma ativada melhorou significativamente as características sensoriais do produto final. FERRAZ et al. (2012) produziram um sorvete probiótico com boa aceitação sensorial, uma vez que obtiveram escores médios acima de 6,0 (gostei ligeiramente). A alegação de saúde de produtos probióticos pode favorecer a intenção de compra inicial do consumidor. Não obstante, o consumo contínuo destes produtos irá depender do cumprimento das expectativas sensoriais fundamentais (FERRAZ et al., 2012).

Ingredientes como inulina e concentrados proteicos têm sido empregados no desenvolvimento de sobremesas lácteas como substitutos de gordura e, igualmente, por possuir propriedades funcionais e nutricionais de relevância (ALVAREZ et al., 2005; AKALIN et al., 2008; LIM et al., 2008; BAYARRI et al., 2011;). No entanto, a incorporação desses componentes a uma formulação não deve afetar a qualidade global do produto. Critérios de qualidade, entre eles as características sensoriais, devem ser equiparados a produtos convencionais (CRUZ et al., 2009). AKIN et al. (2007) avaliaram o efeito da inulina sobre as características sensoriais de sorvete probiótico. A adição de inulina não afetou as características de textura, cor e sabor dos produtos. Em outro estudo, BAYARRI et al. (2011) avaliaram a influência de diferentes comprimentos de cadeia de inulina sobre as características sensoriais de sobremesa láctea à base de amido com baixo teor de gordura. A

adição de inulina de cadeia longa melhorou o parâmetro de palatabilidade, enquanto que a cremosidade não diferiu, quando comparado à amostra controle (sem inulina, produzida com leite desnatado). Em nosso estudo, aos 7 e 84 dias de análise sensorial, a formulação I, contendo 4% de inulina não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) quanto à aceitabilidade sensorial, quando comparado à amostra controle (isenta dos fatores estudados-inulina, WPC, WPI). Essa constatação nos leva a crer que a possibilidade de incorporação de ingredientes prebióticos em sobremesas congeladas, como o sorvete, sem que haja alteração na aceitação do produto pelo consumidor é viável.

Aos 28 dias de armazenamento, a formulação WC (4% de WC) apresentou escore de aceitabilidade menor ($p<0,05$), quando comparado ao controle. Entretanto, esse comportamento não foi observado nos demais períodos estudados. GIRI et al. (2013) estudaram diferentes níveis de concentrado proteico em sobremesa láctea congelada típica da Índia (Kulfi). Em relação ao sabor dos produtos, os autores observaram que das amostras analisadas (2% de WC, 3% de WC, 4% de WC), apenas a que continha 4% de WC apresentou pontuação inferior à amostra controle (isenta de WC). De acordo com os autores, o sabor detectável de soro pode ter influenciado nesses resultados. Já para aceitação geral dos produtos, a amostra controle apresentou pontuação menor que as demais amostras avaliadas, contendo 2%, 3% e 4% de WC. A melhoria nos aspectos de corpo e textura dos alimentos adicionados de concentrados proteicos pode estar relacionada com a boa aceitação desses produtos (ALVAREZ et al., 2005; GOFF, 2007; PANDIYAN et al., 2012).

A textura dos alimentos está intimamente ligada com a percepção do sabor pelo consumidor e, conseqüentemente, aceitação global dos produtos. Mudanças na textura podem influenciar a percepção de intensidade do sabor (WEEL et al., 2012). Apesar das formulações contendo maior quantidade de proteínas WC (4% de WC), WI (4% de WI) e WC-WI (2% de WC; 2% de WI) apresentarem maiores valores de dureza, esse fato não influenciou a aceitação sensorial destes produtos. Uma vez que, de forma geral, não houve diferença significativa ($p>0,05$) nos escores obtidos para essas formulações comparadas com as demais. Esse resultado corrobora com TEIXEIRA et al. (2012), os quais relataram que a adição de 3% de concentrado proteico às sobremesas lácteas *diet* favoreceu a aceitabilidade sensorial dos produtos. Os autores sugeriram que a adição de concentrados proteicos em formulações constituem excelentes opções no desenvolvimento de novos produtos e pode ser interessante para os consumidores, por conterem maior concentração de proteínas bioativas.

4 CONCLUSÃO

Através do presente estudo, foi possível constatar que a adição dos fatores inulina, concentrado proteico (WC) e isolado proteico (WI) de soro, influenciaram fortemente os parâmetros tecnológicos e dureza e fração de derretimento. Exceto para WC (4% de WC), as formulações adicionadas de WC e WI, apresentaram maiores valores de dureza e menores velocidades de derretimento comparado às formulações adicionadas de inulina. A formação de uma rede coesa de agregados de moléculas proteicas capaz de aprisionar água pode ter levado a este resultado.

As formulações contendo inulina demonstraram uma tendência a maiores valores de *overrun*. Os menores valores de *overrun* foram observados nas formulações WI (4% de WI) e WC-WI (2% de WC+2% de WI), as quais também apresentaram menores valores de dureza e de velocidade de derretimento. Em geral, as formulações apresentaram aceitação sensorial dentro da região de aceitação da escala hedônica de 9 pontos utilizada. Apenas as formulações WI e WC-WI aumentaram seus escores de aceitabilidade durante os períodos de armazenamento estudados, nas demais não foram observadas alterações significativas dos escores de aceitabilidade ao longo do estudo.

Considerando que a presença dos fatores estudados (inulina, WC e WI) nas formulações melhorou os aspectos tecnológicos de textura, derretimento e *overrun*, é recomendável a adição de inulina na proporção de 1,5 a 2%, associada com a proporção conjunta ou separada de WC e WI, de maneira que estes ingredientes não ultrapassem 2,5% no produto. Desse modo, além do potencial funcional das formulações de sorvete de açaí desenvolvidas com a presença do prebiótico fruto-oligossacarídeo e do probiótico *L. rhamnosus* GG, os fatores avaliados (inulina, WC e WI), agregam valor proteico e aumentam a quantidade de fibras, sem modificar a aceitação sensorial dos produtos desenvolvidos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. Resolução RDC n.266, de 22 de setembro de 2005. **A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico para gelados comestíveis e preparados para gelados comestíveis.** Disponível em: <http://www.cabreuva.sp.gov.br/pdf/VISA/Alimentos/RDC%20266%20-%20Produtos%20Gelados.pdf>. Acesso em: 15 de set. 2010

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. Visa Legis. 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://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=8133>. Acesso em: 15 set. 2012.

AGÊNCIA 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://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/search.php>. Acesso em: 31 out. 2010.

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, p.237-246, 2001.

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 the physical and sensory characteristics in probiotic ice cream. **Food Chemistry**, v.104, n.1, p.93-99, 2007.

ALFAIFI, M.S.; STATHOPOULOS, C.E. Effect of egg yolk substitution by sweet whey protein concentrate (WPC), on physical properties of Gelato ice cream. **International Food Research Journal**, v.17, p.787-793, 2010.

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

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

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.

BAYARRI, S.; GOZÁLEZ-TOMÁS, L.; HERNANDO, I.; LLUCH, M.A.; COSTELL, E. Texture perceived on inulin-enriched low-fat semisolid dairy desserts. Rheological and structural basis. **Journal of Texture Studies**, v.42, p.174-184, 2011.

BERNARD, C.; REGNAULT, S.; GENDREAU, S.; CHARBONNEAU, S.; RELKIN, P. Enhancement of emulsifying properties of whey proteins by controlling spray-drying parameters. **Food Hydrocolloids**, v.25, p.758-763, 2011.

BESTED, A.C.; LOGAN, A.C.; SELHUB, E.M. Intestinal microbiota, probiotics and mental health: from Metchnikoff to modern advances: Part II – contemporary contextual research. **Gut Pathogens**, v.5, p.2-14, 2013.

BOX, G.E.P.; DRAPER, N.R. 1987. Empirical model-building and response surfaces. New York: Wiley.

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

BUTT, M.S.; SULTAN, M.T. Selected Functional Foods for Potential in Disease Treatment and their Regulatory Issues. **International Journal of Food Properties**, v.16, p.397-415, 2013.

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

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

CORREIA, R.T.P.C.; MAGALHÃES, M.M.A.; PEDRINI, M.R.S.; CRUZ, A.V.F.; CLEMENTINO, I. Ice cream made from cow and goat milk: chemical composition and melting characteristics. **Revista de Ciências Agrônômicas**, v.39, p.251-256, 2008.

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

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

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

FERRAZ, J.L.; CRUZ, A.G.C.; CADENA, R.S.; FREITAS, M.Q.; PINTO, U.M.; CARVALHO, C.C.; FARIA, J.A.F.; BOLINI, H.M.A. Sensory Acceptance and Survival of Probiotic Bacteria in Ice Cream Produced with Different Overrun Levels. **Journal of Food Science**, v.71, p.s24-s28, 2012.

GIRI, A.; RAO, H.G.R.; RAMESH, V. Effect of incorporating whey protein concentrate into stevia-sweetened Kulfi on physicochemical and sensory properties. **International Journal of Dairy Technology**, v.66, n.2, p.286-290, 2013.

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

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

GONZÁLEZ-TOMÁS, L.; BAYARRI, S.; COSTELL, E. Inulin-enriched dairy desserts: physicochemical and sensory aspects. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.9, p.4188-4199, 2009.

GUGGISBERG, D.; CUTHBERT-STEVEN, J.; PICCINALI, P.; BUTIKOFER, U.; EBERHARD, P. Rheological, microstructural and sensory characterization of low-fat and whole milk set yoghurt as influenced by inulin addition. **International Dairy Journal**, v.19, n.2, p.107-115, 2009.

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

HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.)—A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. **Phytochemistry Letters**, v.4, n.1, p.10-21, 2011.

KANG, J.; THAKALI, K.M.; XIE, C.; KONDO, M.; TONG, Y.; OU, B.; JENSEN, G.; MEDINA, M.B.; SCHAUSS, A.G.; WU, X. Bioactivities of açai (*Euterpeprecatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. **Food Chemistry**, v.133, n.3, p.671-677, 2012.

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

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

LIM, S.Y.; SWANSON, B.G.; ROSS, C.F., CLARK, S. High hydrostatic pressure modification of whey protein concentrate for improved body and texture of low fat ice Cream. **Journal of Dairy Sciences**, v.91, p.1308-1316, 2008.

LOBATO, L.P.; GROSSMANN, M.V.E.; BENASSI, M.T. Inulin addition in starch-based dairy desserts: instrumental texture and sensory aspects. **Food Science and Technology International**, v.15, p.317-323, 2009.

MAHDIAN, E.; KARAZHIAN, R. Effects of fat replacers and stabilizers on rheological, physicochemical and sensory properties of reduced-fat ice cream. **Journal of Agricultural Science Technology**, v.15, p.1163-1174, 2013.

MENEZES, E.; DELIZA, R.; CHAN, H.L.; GUINARD, J.X. Preferences and attitudes towards açai-based products among North American consumers. **Food Research International**, v.44, p.1997-2008, 2011.

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

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

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

PACHECO-PALENCIA, L.A.; DUNCAN, C.E.; TALCOTT, S.T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. **Food Chemistry**, v.115, n.4, p.1199-1205, 2009.

PANDIYAN, C.; ANNAL VILLI, R.; KUMARESAN, G.; MURUGAN, B.; GOPALAKRISHNAMURTHY, T.R. Development of symbiotic ice cream incorporating *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces boulardii*. **International Food Research Journal**, v.19, n.3, p.1233-1239, 2012.

PATEL, M.R.; BAER, R.J.; ACHARYA, M.R. Increasing the protein content of ice cream. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.1400-1406, 2006.

POMPEU, D.R.; SILVA, E.M.; ROGEZ, H. Optimization of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. **Bioresource Technology**, v.100, p.6076-6082, 2009.

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

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

RUFINO, M.S.M.; JIMÉNEZ, J.P.; ARRANZ, S.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; OLIVEIRA, M.S.P.; SAURA-CALIXTO, F. Açai (*Euterpe oleracea*) 'BRS Pará': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. **Food Research International**, v.44, p.2100-2106, 2011.

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

SABBE, S.; VERBEKE, W.; DELIZA, R.; MATTA, V.M.; DAMME, P.V. Consumer liking of fruit juices with different Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Concentrations. **Journal of Food Science**, v.74, p.171-176, 2009.

SAKURAI, K.S.; KOKUBO, S.; HAKAMATA, K.; TOMITA, M.; YOSHIDA. Effect of production conditions on ice cream melting resistance and hardness. **Milchwissenschaft**, v.51, p.451-454, 1996.

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

SMITHERS, G.W. Whey and whey proteins-from 'gutter-to-gold'. **International Dairy Journal**, v.18, n.7, p.695-704, 2008. [Review].

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

SUN-WATERHOUSE, D.; EDMONDS, L.; WADHWA, S.S.; WIBISONO, R. Producing ice cream using a substantial amount of juice from kiwifruit with green, gold or red flesh. **Food Research International**, v.50, p.647-656, 2011.

TORRES, J.D.; TÁRREGA, A.; COSTELL, E. Storage stability of starch-based dairy desserts containing long-chain inulin: Rheology and particle size distribution. **International Dairy Journal**, v.20, p.46-52, 2010.

VIDIGAL, M.C.T.R.; MINIM, V.P.R.; BERGER, E.C.; RAMOS, A.M.; MINIM, L.A. Whey protein concentrate improves the sensory quality of free-fat dairy desserts. **Ciência Rural**, v.42, p.2272-2279, 2012.

THARP'S B. Diretrizes para formulação de sorvete lácteo. Revista de Sorvetes e Casquinhas. Edição Inverno 2009, p.22-26. Disponível: www.insumos.com.br/sorvetes_e_casquinhas/edicoes_materias.php?id_edicao=34. Acesso em 26 de maio de 2014.

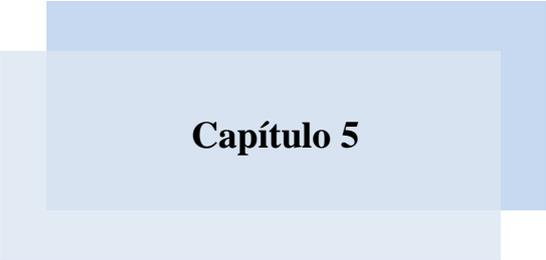
TRGO, G. Factors affecting texture of ice cream. In: MCKENNA, B.M. Texture in food. Boca Raton: CRC Press, 2003/2004 v.1, cap.15, p.373-388, (Woodhead Publishing in food science and technology).

VILELA, V.R.; BAZOTTE, R.B. Balanço dietético de ácidos graxos poli-insaturados ômega 6 e ômega 3. **Revista de Saúde e Biologia**, v.8, p.109-116, 2013.

WEEL, K.G.C.; BOERLRIJK, A.E.M.; ALTING, A.C.; VAN MIL, P.J.J.M.; BURGER, J.J.; GRUPPEN, H.; VORAGEN, A.G.J.; SMIT, G. Flavor release and perception of flavored whey protein gels: perception is determined by texture rather than by release. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.5149-5155, 2002.

YAMUL, D.K.; GALMARINI, M.V.; LUPANO, C.E.; ZAMORA, M.C. Whey protein concentrate gels with diferente sucrose contente: Instrumental texture measurements and sensory perception. **International Dairy Journal**, v.28, p.24-31, 2013.

YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; FILHO, D.F.S.; YUYAMA, K.; VAREJÃO, M.J.; FÁVARO, D.I.T.; VASCONCELLOS, M.B.A.; PIMENTEL, S.A.; CARUSO, M.S.F. Caracterização físico-química do suco de açaí de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. **Acta Amazonica**, v.41, p.545-552, 2011.



Capítulo 5

Obtenção de modelos de regressão, validação e otimização dos parâmetros de textura e derretimento de sorvete simbiótico de açaí, contendo inulina e proteínas do soro de leite

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a influência dos fatores inulina (I; X_1), concentrado proteico (WC; X_2) e isolado proteico (WI; X_3) de soro sobre os parâmetros tecnológicos de dureza e fração de derretimento de sorvete de açaí produzido com o probiótico *L. rhamnosus* GG e o prebiótico fruto-oligossacarídeo (FOS). Para esse fim, foi empregado um delineamento experimental *centroid simplex* de três fatores e um ponto axial. A partir desse planejamento foram avaliadas 8 formulações, que continham diferentes proporções de inulina, WC e WI, mas sempre totalizando 4% das formulações. Os fatores estudados promoveram mudanças significativas nos parâmetros de dureza e fração de derretimento dos sorvetes. Um modelo linear e um modelo quadrático foram obtidos para os parâmetros de dureza e fração de derretimento, respectivamente. De acordo com os modelos WC foi o fator que mais contribuiu tanto para o aumento de dureza e como para a velocidade de derretimento das formulações. A presença de inulina resultou em sorvetes menos duros com velocidades de derretimento mais elevadas quando comparada ao fator WI. A partir da otimização simultânea, considerando as respostas avaliadas (textura e fração de derretimento), é desejável que a formulação de sorvete simbiótico açaí seja produzida contendo 1,33% de inulina, 1,33% de WC e 1,33% de WI.

Palavras chave: Sorvete, açaí, simbiótico, otimização.

Regression models, validation and optimization of the texture and melting rate of synbiotic açai (*Euterpe oleracea* Mart.) ice cream, containing inulin and whey protein**ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate the effect of the factors inulin (I, X_1), whey protein concentrate (WC, X_2) and whey protein isolate (WI, X_3) on technological properties of texture and melting rate of the açai ice cream produced with the probiotic *L. rhamnosus* GG and fructo-oligosaccharide (FOS). For this purpose, an experimental design *simplex centroid* for experiments with mixtures with the addition of a central point and an axial point was conducted. From this experimental design, eight formulations were produced, using different proportions of inulin, WC and WI, but always totaling 4% of the formulations. The evaluated factors promote significant changes on hardness and melting rate of açai ice cream formulations. Linear and quadratic models were obtained for hardness and melting behavior, respectively. According to the obtained models, WC was the factor that most contributed to increase both hardness and melting rate. The presence of inulin resulted in less hard ice cream with higher melting rate, when compared to WI. From the simultaneous optimization, considering the evaluated responses (texture and melting rate), it is desirable synbiotic açai ice cream produced containing 1,33% of inulin, 1,33% of WC and 1,33% of WI.

Keywords: Ice cream, açai, synbiotic, optimization.

1 INTRODUÇÃO

As comprovações científicas cada vez mais estabelecem a relação direta que há entre uma boa alimentação, bem estar físico e prevenção de doenças (SIRÓ et al., 2008; GUANG-CHANG et al., 2012). Dessa forma cresce o interesse no desenvolvimento de alimentos que favoreçam a saúde de uma forma geral e melhorem a qualidade de vida da população.

Os probióticos são micro-organismos vivos que quando administrados de maneira adequada conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Os prebióticos são carboidratos não digeríveis que são fermentados seletivamente e permitem alterações específicas, tanto na composição e/ou atividade na microbiota gastrointestinal, conferindo benefícios à saúde do hospedeiro (GIBSON e ROBERFROID, 2008). Alimentos contendo probióticos e prebióticos são denominados de simbióticos (KOLIDA e GIBSON, 2011). Através do consumo regular desses alimentos, pode se atingir o equilíbrio da microbiota intestinal, resultando em melhora na saúde e bem estar geral (GIBSON et al., 2005; NAGPAL et al., 2012). A incorporação desses componentes a sobremesas congeladas, como sorvetes, pode beneficiar tanto seu aspecto funcional como tecnológico e sensorial (CRUZ et al., 2009; BURITI et al., 2010).

A inulina além de estimular a microbiota benéfica do intestino é também utilizada na fabricação de alimentos com base em suas propriedades tecnológicas. O emprego tecnológico irá depender do grau de polimerização da cadeia de inulina. A fração de cadeia curta, oligofrutose, é mais solúvel e mais doce, e pode contribuir, quando associados a edulcorantes, para melhorar o sabor de alimentos de baixa caloria (AKALIN e ERISIR, 2008; GUGGISBERG et al., 2011). Por sua vez, a inulina de cadeia longa é menor solúvel e quando incorporada aos alimentos pode principalmente favorecer os aspectos de textura e palatabilidade (MEYER, 2011).

O soro lácteo tornou-se um importante subproduto da indústria de laticínios, uma vez que dá origem a ingredientes que possuem aplicações no desenvolvimento de alimentos funcionais (SMITHERS, 2008). A partir dessa matéria-prima são obtidos os concentrados e isolados proteicos de soro de leite, que são utilizados devido ao seu alto valor nutricional, representado principalmente pelo conteúdo proteico (SMITHERS, 2008). Além do aspecto nutricional, concentrados e isolados proteico do soro podem exercer propriedades tecnológicas de formação de espuma e como agentes emulsificantes (RELKIN et al., 2006).

Dessa forma, a incorporação desses componentes no desenvolvimento de sobremesas, como sorvetes, pode melhorar aspectos de incorporação de ar, cremosidade e sabor (PANDIYAN et al., 2012; VIDIGAL et al., 2012; MAHDIAN e KARAZHIA, 2013).

As frutas tropicais na forma de sucos ou polpas são bastante utilizadas no desenvolvimento de alimentos funcionais, pois além de possuírem sabores exóticos, as características de composição, que incluem vitaminas e fibras, são atraentes ao consumidor (SUN-WATERHOUSE et al., 2011; MENEZES et al., 2011). Em alguns casos, a presença de antioxidantes naturais se torna um aliado na determinação do consumo de produtos alimentícios adicionados de frutas. O açaí (*Euterpe oleareace*) é uma fruta nativa da região amazônica brasileira que tem se destacado devido ao seu potencial antioxidante e anti-inflamatório (HEINRICH et al., 2011). O elevado valor nutricional pode se atribuído a presença de ácidos graxos insaturados, fibras e minerais como o cálcio e o potássio (YUYAMA et a., 2011). Dessa forma, o açaí pode ser considerado uma fruta adequada para o desenvolvimento de sorvetes com maior teor nutritivo e funcional.

O objetivo desse estudo foi investigar a influência dos fatores inulina (I; X_1), concentrado proteico (WC; X_2) e isolado proteico (WI; X_3) sobre as características tecnológicas de dureza e derretimento de sorvete de açaí suplementado com a cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG e o ingrediente prebiótico fruto-oligossacarídeo (FOS), e ainda otimizar a mistura contendo os três fatores (I, WC e WI), afim de obter um sorvete simbiótico de açaí com qualidades tecnológicas de textura e fração de derretimento adequadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento experimental

Foram realizados ensaios, no sentido de avaliar os fatores inulina (X_1), concentrado proteico de soro ($WC = X_2$) e isolado proteico de soro ($WI = X_3$), adicionados durante a fabricação do sorvete, em diferentes proporções, mas sempre totalizando 4% do total das formulações do produto. Foi utilizado o delineamento experimental para misturas simples (*centroid simplex*) incluindo um ponto axial, que corresponde a um ponto interno (escolhido aleatoriamente) ao planejamento proposto. A **Figura 1** apresenta o desenho experimental do planejamento adotado (BOX e DRAPER, 1987; BARROS Neto, 2007). Neste delineamento, o ponto axial não será utilizado na construção do modelo. Este ensaio será reservado para a validação final dos mesmos. A **Tabela 1** mostra as diferentes formulações realizadas, dentro do planejamento experimental proposto.

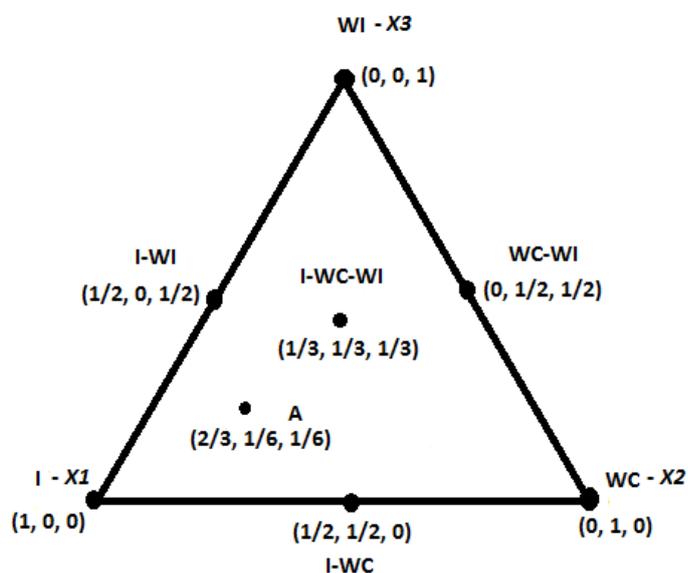


Figura 1 - Representação espacial das formulações de sorvete de açaí no planejamento adotado. Os vértices correspondem aos componentes (I, WC, WI) puros, os lados às misturas binárias dos componentes e os pontos do interior do triângulo, a mistura dos três componentes.

Tabela 1- Delineamento experimental *centroid simplex* empregado na elaboração dos sorvetes de açaí estudados.

Formulações	Proporção de cada ingrediente da mistura	Quantidade de cada ingrediente (g) em 100 g de sorvete ¹			
		(X_1, X_2, X_3)	Inulina ²	WC ³	WI ⁴
			I (X_1)	(X_2)	(X_3)
I	(1, 0, 0)	4,00	0,00	0,00	0,00
WC	(0, 1, 0)	0,00	4,00	0,00	0,00
WI	(0, 0, 1)	0,00	0,00	0,00	4,00
I-WC	(1/2, 1/2, 0)	2,00	2,00	0,00	0,00
I-WI	(1/2, 0, 1/2)	2,00	0,00	2,00	0,00
WC-WI	(0, 1/2, 1/2)	0,00	2,00	2,00	0,00
I-WC-WI	(1/3, 1/3, 1/3)	1,33	1,33	1,33	0,00
A ⁵	(2/3, 1/6, 1/6)	2,60	0,70	0,70	0,00

¹Para cada 100 g de produto, 4 g da mistura total (inulina + WC +WI) foi adicionada aos demais ingredientes utilizados nas formulações de sorvete de açaí; ²Orafti®GR (Beneo-Orafti); ³Lacprodan 80® (Arlafoods); ⁴Lacprodan DI9224® (Arlafoods);

⁵Formulação aleatória.

2.2 Obtenção do micro-organismo e preparo da cultura estoque

Para o preparo da cultura pura, o micro-organismo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG foi isolado a partir de cápsulas comerciais (Culturelle, Amerifit, EUA) e mantido em caldo MRS com glicerol (50% v/v) em temperatura de -80°C. A análise da sequência obtida a partir do gene 16S do RNA ribossômico da cultura estoque preparada demonstrou 99% de similaridade (n° de descrição do GenBank FM179322.1) com *Lactobacillus rhamnosus* GG quando submetida à comparação no programa BLASTn, o qual utiliza-se do banco de dados NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). A

ativação e preparo do pré-inóculo foi realizada com 1 mL da cultura estoque previamente ativada em caldo MRS por 20h a 37°C. O pré-inóculo (4% v/v) foi transferido para um volume maior de caldo MRS e incubado a 37°C por 16h, até que se atingisse a fase exponencial. Após esse período, o micro-organismo apresentou população de cerca de 10⁹ ufc/mL. Após a incubação, as células foram colhidas por centrifugação (5251,4 g x 10 min) em centrífuga Sorvall (modelo RC-5C), lavadas em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%), repetindo-se o processo de centrifugação e lavagem duas vezes.

A cultura do micro-organismo *Lactobacillus rhamnosus* GG foi ressuspensa em leite em pó desnatado reconstituído estéril 10%. Posteriormente, essa cultura ativada foi adicionada à mistura para a elaboração do sorvete.

2.3 Fabricação do sorvete de açaí

Cada formulação do sorvete de açaí foi produzida em lotes de 4 kg. Os ingredientes listados na **Tabela 2** foram misturados até completa uniformização da massa em misturador Geiger UMMSK-12 (Geiger, Pinhais, Brasil;), após a sua pesagem e mistura manual prévia (primeiramente, ingredientes líquidos, depois sólidos e, por último, ingredientes lipídicos). A mistura obtida foi pasteurizada a 85°C por 25 segundos, no próprio misturador. A seguir, a temperatura da massa foi reduzida a 40°C, para a adição do leite contendo a cultura probiótica. Após esta etapa, a mistura foi transferida para cabine refrigerada a 4 °C (Metalfrio, São Paulo, Brasil) para maturação da calda por 20 horas. Posteriormente, foi transferida para sorveteira Skymesen BSK-16 (Metalúrgica Skymesen, Brusque, Brasil), onde ocorreram os processos de batimento e congelamento simultâneos, por 15 minutos. Decorrida essa etapa, o produto foi acondicionado em potes plásticos de polipropileno próprios para alimentos (68 mm de diâmetro, 32 mm de altura, 55 mL de volume total, Tries Aditivos Plásticos, São Paulo, Brasil), em porções de 20 g. Os produtos obtidos foram armazenados em congelador vertical a -18 °C (Metalfrio, São Paulo, Brasil).

Tabela 2 - Ingredientes fixos e respectivas proporções, utilizados na produção das formulações de sorvete de açaí e teor de sólidos dos diferentes produtos obtidos.

Ingredientes (%)	Formulações							A*
	I	WC	WI	I-WC	I-WI	WC-WI	I-WC-WI	
Ingredientes fixos								
Polpa congelada de açaí ¹	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Leite em pó desnatado ²	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0
Sacarose ³	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Gordura Vegetal ⁴	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Glicose em pó ⁵	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
FOS ⁶	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Emulsificante/Estabilizante ⁷	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Cultivo de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG em leite	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Saborizante e aromatizante artificial de açaí ⁸	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Goma carragena ⁹	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Goma guar ¹⁰	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
Ingredientes variáveis								
Inulina (I)	4,0	-	-	2,0	2,0	-	1,33	2,6
WC	-	4,0	-	2,0	-	2,0	1,33	0,7
WI	-	-	4,0	-	2,0	2,0	1,33	0,7
Água	45,24	45,24	45,24	45,24	45,24	45,24	45,24	45,24
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

¹Polpa de açaí médio (Icefruit – Icefruit Comércio de alimentos, Tatuí, Brasil); ²Molico (Nestlé, Araçatuba, Brasil); ³Açúcar refinado (União, Limeira, Brasil); ⁴Gordura de palma 370SE (Agropalma, Belém, Pará); ⁵(Nutre, São Paulo, Brasil); ⁶Beneo® P95 (Orafit, Oreya, Bélgica); ⁷Emustab-Emulsificante e estabilizante neutro(Duas Rodas, Jaraguá do Sul, Brasil); ⁸Selecta tropical (Duas Rodas, Jaraguá do Sul, Brasil); ⁹Carrageenan(Danisco, Redhill, Reino Unido); ¹⁰Grindsted®Guar(Danisco, Redhill, Reino Unido); *A = formulação aleatória.

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

As análises para a determinação da dureza das formulações de sorvete em estudo foram realizadas através de teste de corte, em analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems, Haslemere, Reino Unido), após 14 dias do preparo e armazenamento a $-18\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. Os procedimentos para a realização do teste de corte, utilizando o dispositivo de alumínio (*probe* Knife Edge- HDP/BS) 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), seguindo o procedimento adotado por HARAMI (2008). Os dados foram coletados através do programa Texture Expert for Windows – versão 1.20 (Stable Micro Systems). A análise foi realizada em apenas um determinado período de armazenamento (dia 14) e não ao longo do período de armazenamento. Esse procedimento adotado 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). Para a realização da análise, foram utilizados os seguintes parâmetros: velocidade 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.

2.5 Fração de derretimento

A fração de derretimento das formulações sorvetes foi determinada, adaptando-se o método descrito por MUSE e HARTEL (2004) e CORREIA et al. (2008), com a utilização de amostras com 60 g de sorvete de cada lote produzido.

Após 14 dias do preparo, as amostras armazenadas a $-18\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ foram retiradas do congelador e imediatamente dispostas sobre uma malha metálica com aproximadamente 0,5 cm de abertura, acomodadas sobre um funil e uma proveta volumétrica graduada, mantidas em temperatura ambiente ($25 \pm 1\text{ °C}$). O tempo de coleta dos primeiros 10 mL do produto drenado foi registrado e, a partir de então, medições do volume coletado foram realizadas a cada 3 minutos.

O coeficiente de derretimento foi calculado, considerando-se os volumes drenados e o período de coleta, os quais foram plotados em gráficos bidimensionais, obtendo-se, assim, a

fração de derretimento em mililitros por minutos (mL/min) a partir do coeficiente de inclinação da equação da reta obtida (CAVENDER e KERR, 2013).

2.6 Análise estatística

Os resultados experimentais foram aplicados para obter o modelo de regressão em função das proporções de cada ingrediente (x_1 =inulina, x_2 =WC, x_3 =WI) presente nas formulações: $\hat{y}_i = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3$, onde \hat{y}_i = resposta estimada, b_i = coeficiente estimado pelo método dos mínimos quadrados, e X_i =variáveis dependentes, sendo $1 > X_i > 0$, $\sum_{i=1}^n x_i = 1$.

A qualidade do modelo foi avaliada através de ANOVA, compartimentalizando-se o resíduo entre erro puro e falta de ajuste, e também através do coeficiente de determinação ajustado (R^2 ajustado). A validação dos modelos foi obtida através da comparação entre os valores estimados pelas respectivas regressões e os valores determinados experimentalmente em um ponto aleatório. Foi adotado um valor α de 5% para a rejeição da hipótese de nulidade. A otimização foi obtida pela metodologia descrita por DERRINGER e SUICH (1980). A análise estatística foi realizada utilizando o software v.10 STATISTICA (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção dos modelos de regressão

As diferentes proporções dos fatores estudados, inulina (X_1), WC (X_2) e WI (X_3), causaram mudanças significativas ($P < 0,05$) no parâmetro de dureza das formulações de sorvete de açaí, um modelo linear foi gerado para esta variável resposta. Os coeficientes do modelo e a análise de variância do mesmo são apresentados nas **Tabelas 3 e 4**. Este modelo foi significativo ($P < 0,05$) e capaz de explicar 70,87% da variação observada (R^2 ajustado). O modelo cúbico especial mostrou qualidade de ajuste, conforme mostrado pela não significância associada à “falta de ajuste”. A partir do gráfico de contorno gerado pelo modelo

(**Figura 2**) podemos observar que as variáveis WC e WI foram as que mais influenciaram para o aumento de dureza dos sorvetes.

Tabela 3 - Coeficientes calculados por regressão múltipla e respectivos erros-padrão e intervalo de confiança (IC) de 95% obtidos para o modelo linear a partir do resultado de dureza das formulações de sorvete de açaí (X_1 = inulina, X_2 =WC e X_3 =WI).

	X_1	X_2	X_3
Coeficientes	82,24*	186,88*	161,07*
Erro-padrão	16,02*	16,02*	16,02*
p	0,003*	0,000008*	0,0001*
IC 95%	[-41,04; +123,44]	[-145,68; +228,08]	[-119,87; +202,27]

*Significante ao nível de 95% de probabilidade ($p < 0,05$)

Tabela 4 - Análise de variância obtida para o modelo linear a partir do resultado de dureza das formulações de sorvete de açaí aos 14 dias de armazenamento congelado ($-18 \pm 3^\circ\text{C}$).

Causa da variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F calculado	p
Regressão	7427,97*	2	3713,98*	9,51*	0,01*
Resíduo	1950,99	5	390,19		
Falta de ajuste	1923,31	4	480,83	17,37	0,17
Erro puro	27,67	1	27,67		
Total	9378,96	7	1339,85		
R^2	0,79				
R^2 ajustado	0,70				

*Significante ao nível de 95% de probabilidade ($p < 0,05$)

O modelo linear obtido para o comportamento de dureza das formulações de sorvete de açaí após 14 dias de armazenamento congelado está apresentado na **Figura 2** através do gráfico de contorno.

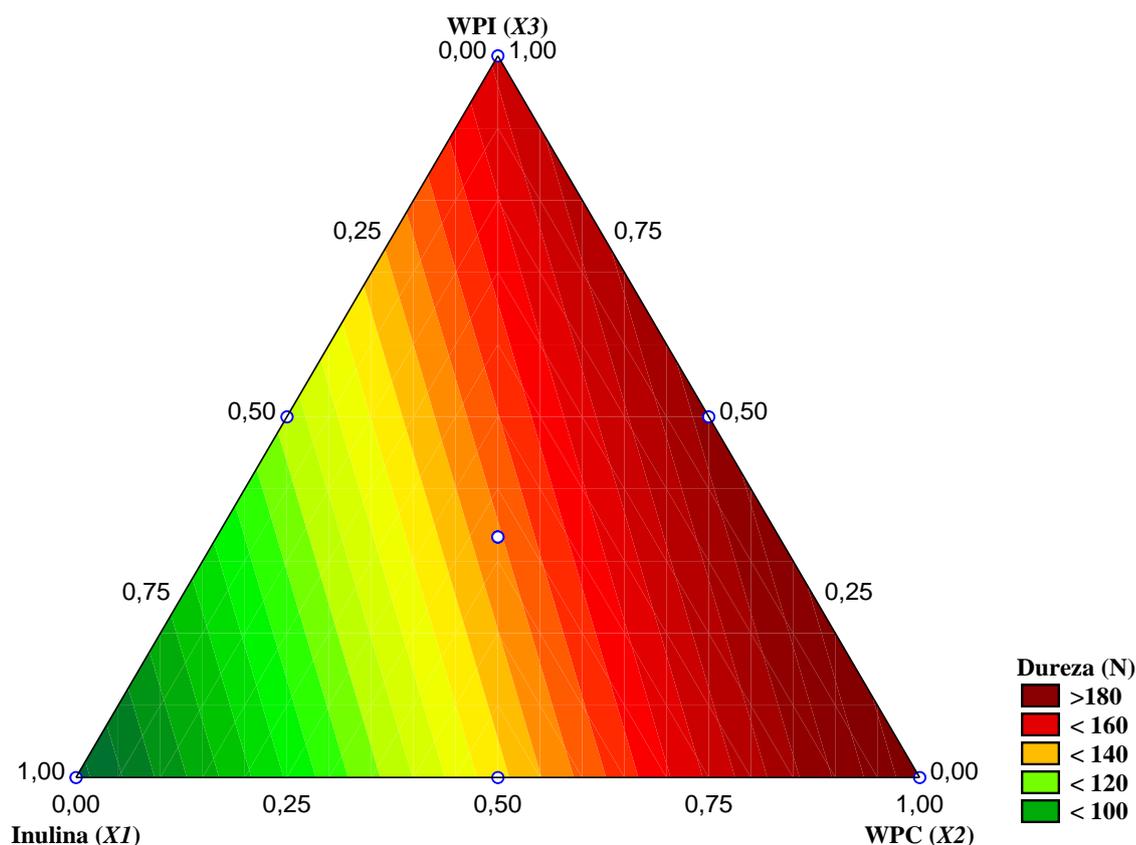


Figura 2 - Diagrama triangular do comportamento de dureza das formulações de sorvete de açaí após 14 dias de armazenamento congelado. (X_1 =inulina, X_2 = WC e X_3 =WI).

O modelo de regressão múltipla do tipo linear obtido para o resultado de dureza das formulações de sorvete de açaí após 14 dias de armazenamento é representado pela equação a seguir:

$$\hat{y} = 82,24 X_1^* + 186,88 X_2^* + 161,07 X_3^*$$

Onde, \hat{y} é o valor estimado da variável resposta dureza das formulações de sorvete após 14 dias de armazenamento congelado. X_1 =inulina, X_2 = WC e X_3 =WI.

O modelo indica que os três fatores exerceram influência significativa no comportamento de dureza dos sorvetes. Todos os fatores (Inulina X_1 ; WC X_2 ; WI X_3) analisados isoladamente elevaram a dureza dos sorvetes. Como podemos constatar através do gráfico de contorno, a adição de WC nas formulações elevou a dureza dos sorvetes de açaí, e a região que se encontra os menores valores de dureza são observadas com adição de inulina.

O comportamento de derretimento dos sorvetes de açaí foi afetado estatisticamente ($p < 0,05$) pelas diferentes proporções dos fatores estudados, inulina (X_1), WC (X_2) e WI (X_3), um modelo quadrático foi gerado para esta variável resposta. Os coeficientes do modelo e a análise de variância do mesmo são apresentados nas **Tabelas 5 e 6**. Este modelo foi significativo ($P < 0,05$) e capaz de explicar 74,54% da variação observada (R^2 ajustado). O modelo quadrático mostrou qualidade de ajuste, conforme mostrado pela não significância associada à “falta de ajuste”. A partir do gráfico de contorno gerado pelo modelo (**Figura 3**) podemos observar que a região onde se encontra a menor velocidade de derretimento é aquela apresentada no ponto do fator WI.

Tabela 5 - Coeficientes calculados por regressão múltipla e respectivos erros-padrão e intervalo de confiança (IC) de 95% obtidos para o modelo quadrático a partir do resultado de velocidade de derretimento das formulações de sorvete de açaí ($X_1 =$ inulina, $X_2 =$ WC e $X_3 =$ WI)

	X_1	X_2	X_3	X_1X_3
Coefficientes	1,40*	1,53*	0,91*	1,46*
Erro-padrão	0,10*	0,09*	0,10*	0,50*
p	0,001*	0,00007*	0,0009*	0,04*
IC 95%	[-1,11; +1,69]*	[-1,27; +1,79]*	[-1,19; +1,19]*	[-0,06; +2,86]*

*Significante ao nível de 95% de probabilidade ($p < 0,05$)

Tabela 6 - Análise de variância obtida para o modelo quadrático a partir do resultado de velocidade de derretimento das formulações de sorvete de açaí aos 14 dias de armazenamento congelado ($-18 \pm 3^\circ\text{C}$).

Causa da variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F calculado	p
Regressão	0,30*	3	0,10*	7,83*	0,03*
Resíduo	0,05	4	0,01		
Falta de ajuste	0,05	3	0,01	9,28	0,23
Erro puro	0,001	1	0,001		
Total	0,35	7	0,05		
R^2	0,85				
R^2 ajustado	0,74				

*Significante ao nível de 95% de probabilidade ($p < 0,05$)

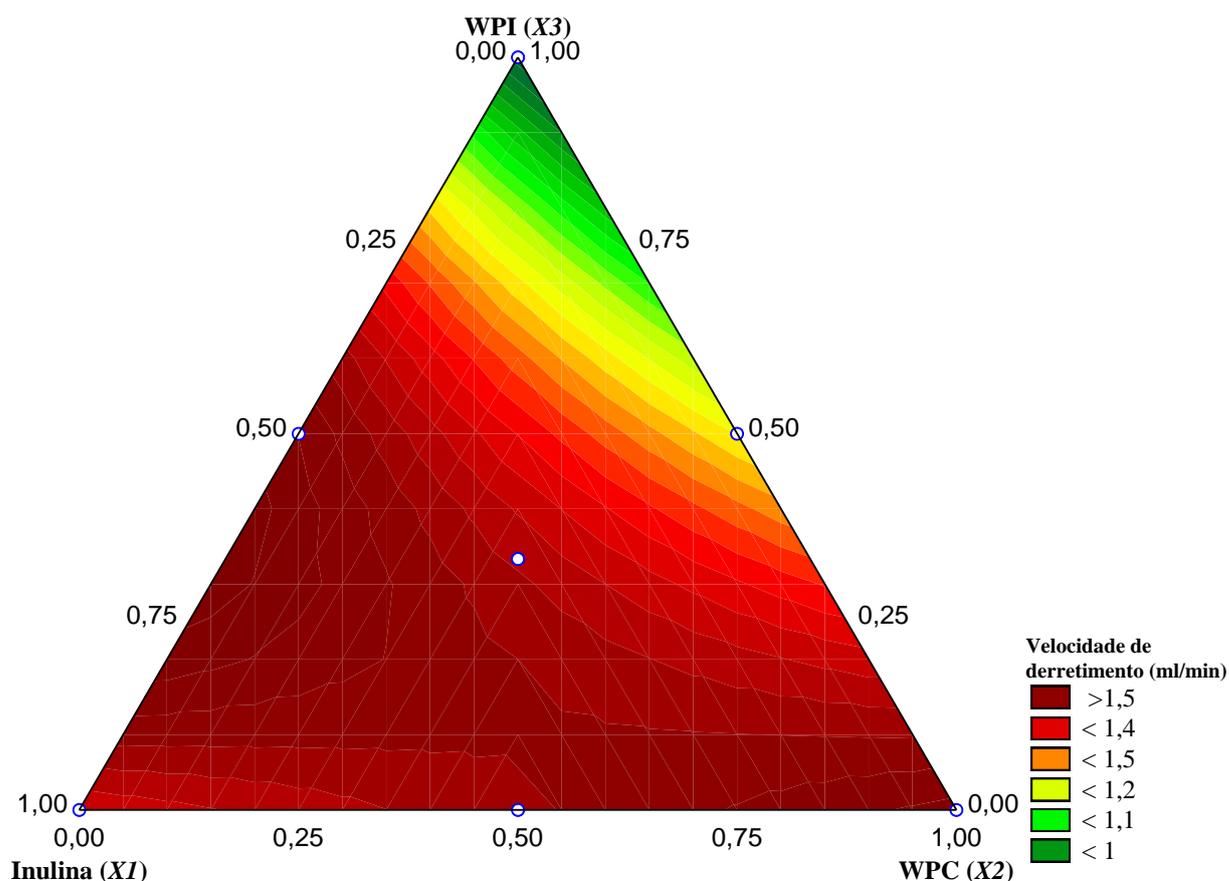


Figura 3 - Diagrama triangular do comportamento de velocidade de derretimento das formulações de sorvete de açaí após 14 dias de armazenamento congelado. (X_1 =inulina, X_2 =WC e X_3 =WI).

O modelo de regressão múltipla do tipo quadrático obtido para o resultado de velocidade de derretimento das formulações de sorvete de açaí após 14 dias de armazenamento é representado pela equação a seguir:

$$\hat{y} = 1,44X_1^* + 1,53 X_2^* + 0,91X_3^* + 1,46X_1X_3^*$$

O modelo indica que os três fatores exerceram influência significativa no comportamento de derretimento dos sorvetes. WC e inulina foram os fatores que exerceram maior influência, levando ao aumento do parâmetro avaliado. A maior velocidade de derretimento pode ser observada quando WC está em maior quantidade na formulação (vértice X_2 -WC do diagrama triangular). A adição do fator WI resultou nas menores

velocidades de derretimento (vértice WI -X3, do diagrama triangular). Apenas a interação binária inulina \times WPI (X_1X_3) foi significativa, no qual resultou em aumento deste parâmetro avaliado.

A presença de WC, em seu maior nível (4%) elevou a dureza das formulações de sorvete estudadas. Outros estudos também observaram alteração na textura de sorvetes adicionados de concentrados proteicos de soro de leite (ALVAREZ et al., 2005; AKALIN et al., 2008; ALFAIFI et al., 2010;). Em estudos com concentrados e isolados proteicos é observado que a incorporação desses ingredientes às formulações resulta em aumento da dureza de sorvetes. Os autores explicam que os concentrados e isolado proteicos de soro formam uma rede tridimensional proteica, esta estrutura retém água por meio de forças de capilaridade e resultam no aumento da firmeza dos produtos, além disso, as bolhas de ar formadas e os cristais de gelo formados poderiam exercer alterações na textura dos sorvetes (ALVAREZ et al., 2005; ALFAIFI et al., 2010).

Em nosso estudo o emprego do fator inulina (4%) elevou o parâmetro de dureza dos sorvetes, porém em menor escala quando comparado a WC e WI. Do mesmo modo AKALIN et al. (2008) observaram maior aumento de dureza em sorvetes adicionados de WI, quando comparado a sorvetes adicionados apenas de inulina. A inulina parece atuar de maneira diferente na modificação da textura de alimentos, a formação de microcristais e capacidade de geleificação da cadeia longa de inulina, resulta em uma textura cremosa que aumenta a viscosidade e conseqüentemente aumenta também a firmeza dos produtos (GONZÁLEZ-TOMÁS et al., 2009). Este comportamento pode ser interessante do ponto de vista sensorial, tendo em vista que para os consumidores é desejável produtos menos duros e com maior maciez.

Os efeitos da utilização de inulina e concentrados proteicos de soro de leite sobre a propriedade de derretimento de sorvetes foram estudados por outros autores (AKALIN et al., 2008; PANDIYAN et al., 2010; MAHDIAN e KARAZHIA, 2013). Igualmente ao que foi observado no presente estudo, AKALIN et al. (2008) mencionaram que sorvetes com baixo teor de gordura contendo WI apresentaram menor velocidade de derretimento quando comparado a amostra de sorvete contendo inulina. Os autores atribuíram tal observação, a capacidade das amostras contendo WI de manterem sua forma original, devido a estabilização da estrutura formada pela rede proteica, resultando em retardo na velocidade de derretimento.

PANDIYAN et al. (2010) relataram que o tempo de derretimento de sorvetes diminuíram com o aumento de concentrados proteicos às formulações. Do mesmo modo, GIRI et al. (2013) observaram redução significativa na taxa de fusão de amostras de sorvetes tratadas com WC. De acordo com os autores este comportamento pode ser atribuído a capacidade de retenção de água das proteínas do soro. O contrário foi observado em nosso estudo, no qual a incorporação de WC no sorvete de açaí em sua maior proporção (4%) resultou na maior velocidade de derretimento ($p < 0,05$). No entanto deve-se levar em consideração que as características de derretimento estão relacionadas com fatores específicos de composição e processamento do alimento. Como esses fatores são variáveis de um produto para outro, podemos concluir que não há como generalizar o comportamento de derretimento de sorvetes apenas devido a presença de um único ingrediente.

Adicionalmente aos aspectos tecnológicos, os fatores analisados (inulina, WC e WI) podem favorecer uma maior proteção física ao probiótico *L. rhamnosus* GG, que manteve populações médias acima de 9 log ufc/g nas formulações de sorvete de açaí, por um período de 112 dias de armazenamento congelado (dados não mostrados – artigo 2).

3.2 Validação dos modelos com o ponto axial

A validação dos modelos de regressão obtidos foi realizada através de um ensaio aleatoriamente escolhido (ponto axial - vide tabela 1), dentro da área experimental previamente definida, pois se sabe que os valores preditivos só serão válidos dentro da faixa experimental estudada.

As formulações de sorvete de açaí foram produzidas seguindo a mesma metodologia apresentada anteriormente e analisadas para as variáveis respostas dureza e fração de derretimento aos 14 dias de armazenamento.

Tabela 7 - Comparação entre os valores estimados pelos modelos e os valores medidos experimentalmente no ensaio de validação.

Variável-resposta	Formulação	Valor estimado*	Valor observado*	pvalue**
Dureza	Aleatória (A)	112,48	105,67	0,96
Fração de derretimento	Aleatória (A)	1,50	1,50	1,00

*Valores expressos por média; **valores de probabilidade pelo Teste *t* de Student.

A **Tabela 7** apresenta os resultados obtidos experimentalmente e os resultados estimados pelos modelos para os parâmetros de dureza e fração de derretimento. Estes valores quando comparados através do Teste *t* de student não demonstraram diferenças significativas entre eles, sugerindo que os modelos apresentaram bom ajuste aos dados experimentais.

3.3 Otimização empregando o programa estatístico *Statistica*

O programa estatístico *Statistica* usa a abordagem desenvolvida por DERRINGER e SUICH (1980), que propuseram o uso de funções de desejabilidade (*desirability*) para otimização simultânea de diferentes variáveis-resposta. Esta técnica de otimização simultânea consiste em encontrar valores dos fatores estudados que otimizem uma ou mais resposta, ou no mínimo as mantenham em faixas desejáveis. A abordagem baseia-se também em converter cada resposta analisada em uma função individual que varia em uma faixa de 0-1, de acordo com a proximidade do valor esperado da resposta. Zero (0) significa um valor inaceitável, enquanto (1) representa o valor mais desejável. Assim, as variáveis independentes são escolhidas de modo a maximizar a desejabilidade global (CARDARELLI, 2006; CALADO e MONTGOMERY, 2003).

Por fim, os valores individuais de desejabilidade são combinados em uma função de desejabilidade global, através da média geométrica e o problema torna-se então maximizar este número. A busca da otimização é realizada empregando-se as equações dos modelos construídos para cada uma das respostas, desta forma é importante que eles tenham sido obtidos através de um planejamento estatisticamente fundamentado e que tenham sido validados (BREITKREITZ et al., 2009).

A **Tabela 8** apresenta a atribuição dos valores na otimização realizada de acordo com os critérios desejados, empregando o programa estatístico *Statistica* para *Windows*, versão 10 (Statsoft, Tulsa, OK, EUA).

Tabela 8 - Valores atribuídos no procedimento de otimização matemática realizado, empregando o programa *Statistica* (Statsoft).

Valor atribuído na otimização	Variáveis-resposta estudadas	
	Dureza	Velocidade de derretimento
Baixo	0,4	0,4
Médio	0,5	0,5
Alto	0,6	0,6

*peso relativo para valores baixos, médios e altos na escolha da desejabilidade variando de 0 a 1.

De acordo com a **Tabela 8**, quando se deseja valorizar mais um determinado resultado, pontua-se com o número 1 no critério de otimização. Por outro lado, quando não se deseja determinado resultado, pontua-se com o número 0. No caso das respostas avaliadas, dureza e velocidade de derretimento, adotaram-se valores intermediários (0,4; 0,5; 0,6) uma vez que não se deseja valores extremos para esses parâmetros, por exemplo, sorvetes muito duros ou sorvetes que derretem muito rápido.

A otimização pode ser definida como a escolha da melhor alternativa a partir de um determinado conjunto de possibilidades. A fim de se obter uma otimização adequada é necessário avaliar cada resposta de maneira diferente, pois existem algumas possibilidades de otimização que se encaixam nas diferentes condições selecionadas (CASTRO et al., 2003; CARDARELLI, 2006). É importante destacar que o termo “melhor” pode ter significados diferentes para produtos diferentes. Por exemplo, em um caso, a melhor formulação pode ser aquela com o menor custo, enquanto para outro produto a qualidade sensorial pode definir a melhor formulação (ARTEGA et al., 1994). Em nosso estudo a finalidade foi encontrar valores intermediários de dureza e velocidade de derretimento.

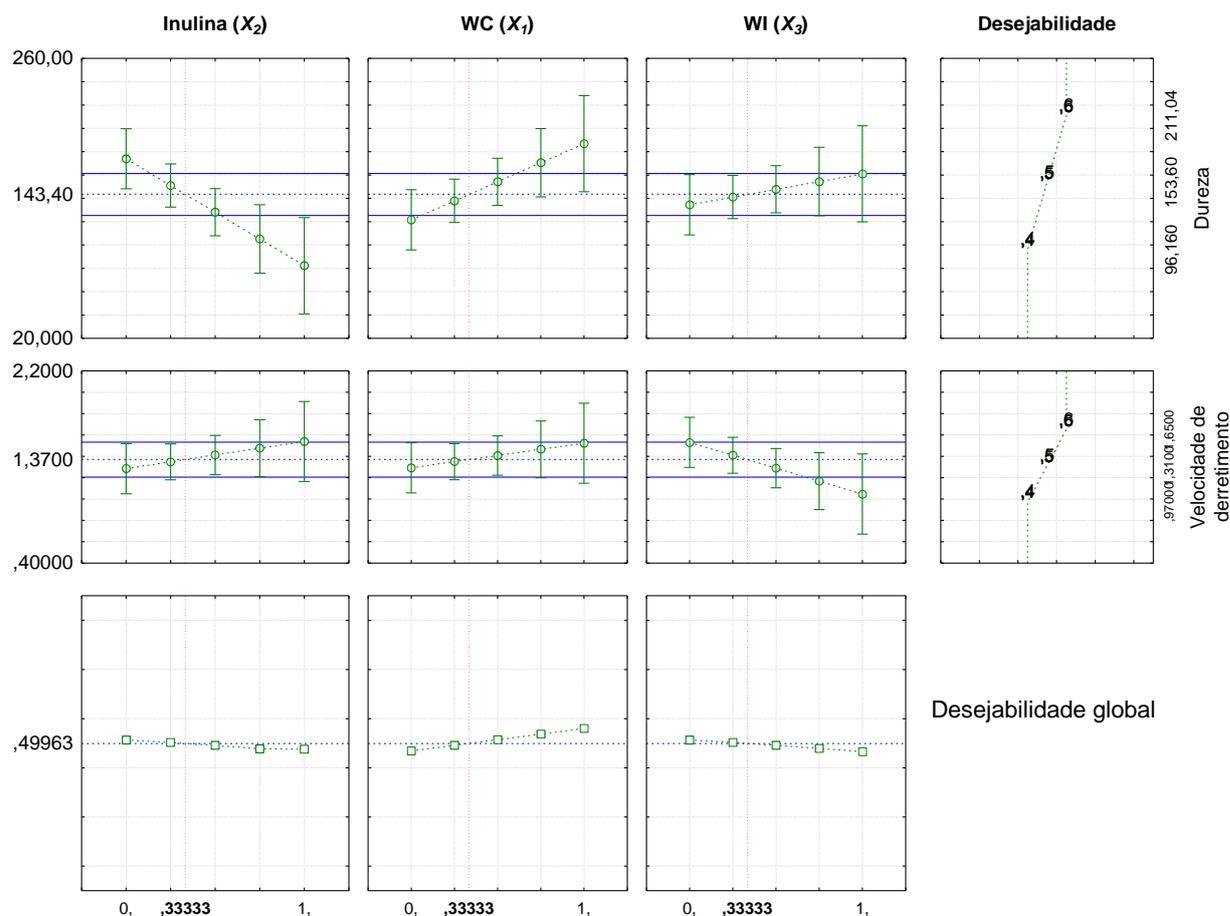


Figura 4 - Perfis para os valores preditivos e desejabilidade para as variáveis otimizadas e desejabilidade global

A **Figura 4** mostra o comportamento de cada variável, a faixa contendo os resultados otimizados está apresentado pelas linhas horizontais azuis. Os traços verdes representam a evolução dos resultados preditivos de desejabilidade conforme a proporção de cada ingrediente aumenta, da esquerda para a direita. A linha pontilhada vertical vermelha corresponde a proporção de cada variável na mistura ótima obtida. A desejabilidade global é observada na última linha de gráficos, através da linha pontilhada azul. De acordo com a otimização, valores intermediários de dureza e velocidade de derretimento (valores preditivo, 143,40N; 1,37ml/min, respectivamente) podem ser obtidos com a mistura ótima contendo 33% de inulina, 33% de WC e 33% de WI. Como os fatores estudados sempre totalizam 4% das formulações desenvolvidas, estes valores corresponderiam a 1,33% de inulina, 1,33% de WC e 1,33% de WI.

4 CONCLUSÃO

Os fatores analisados, Inulina, WC e WI exerceram efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) sobre os parâmetros tecnológicos de textura (expresso como dureza) e fração de derretimento dos sorvetes simbióticos de açaí. A partir do modelo linear obtido através dos resultados de dureza das formulações de sorvete de açaí, foi possível constatar que os três fatores analisados (Inulina, WC e WI) elevaram a dureza das formulações de sorvete de açaí, no entanto WC foi o fator que mais contribuiu para este comportamento. Para os resultados de fração de derretimento foi possível obter um modelo quadrático, o qual revelou que os três fatores estudados também elevaram a velocidade de derretimento dos sorvetes. WC foi fator que mais contribuiu para aumentar a velocidade de derretimento das formulações, no entanto as menores velocidades de derretimento foram observadas para o fator WI. Apenas a interação binária entre inulina x WI foi significativa, no qual resultou em aumento da velocidade de derretimento das formulações.

A partir da otimização realizada, para se obter um sorvete simbiótico de açaí com parâmetros de textura e fração de derretimentos adequados é desejável a mistura contendo 1,33% de inulina, 1,33% de WC e 1,33% de WI. Além disso, esta associação é interessante do ponto de vista nutricional, uma vez que aumenta o conteúdo proteico e de fibras das formulações de sorvete simbiótico de açaí.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.; ERISIR, D. Effects of inulin and oligofructose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic ice-cream. **Journal of Food Science**, v.73, n.4, p.M184–M188, 2008.
- ALFAIFI, M.S.; STATHOPOULOS, C.E. Effect of egg yolk substitution by sweet whey protein concentrate (WPC), on physical properties of Gelato ice cream. **International Food Research Journal**, v.17, p.787-793, 2010.
- ALVAREZ, V.B.; WOLTERS, C.L.; VODOVOTZ, Y.; JI, T. Physical properties of ice cream containing milk protein concentrates. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.3, p.862-871, 2005.
- ARTEGA, G.E.; LI-CHAN, E.; VAZQUEZ-ARTEAGA, M.C.; NAKAI, S. Systematic experimental design for product formula optimization. **Trends in Food Science & Technology**, v.5, n.8, p.243-254, 1994. [Review].
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 3.ed. Campinas: UNICAMP, 2007. 480p.
- BEGLEY, M.; GAHAN, C.G.M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Letters**, v.29, p.625-651, 2005.
- BOX, G.E.P.; DRAPER, N.R. **Empirical model-building and response surfaces**. New York: Wiley, 1987. 669p. (Wiley series in probability and mathematical statistics. Applied probability and statistics).
- BREITKREITZ, M.C.; JARDIM, I.C.S.F.; BRUNS, R.E. Combined column-mobile phase statistical design optimization of high-performance liquid chromatographic analysis of multicomponent systems. **Journal of Chromatography A**, v.1216, n.9, p.1439-1449, 2009.
- BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in symbiotic guava mousses and its survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.137, n.2/3, p.121-129, 2010.
- CALADO, V.; MONTGOMERY, D.C. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro: E-Papers, 2003. 260p.
- CARDARELLI, H.R. **Desenvolvimento de queijo petit-suisse simbiótico**. São Paulo, 2006. 133p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- CASTRO, I.A.; SILVA, R.S.F.; TIRAPEGUI, J.; BORSATO, D.; BONA, E. Simultaneous optimization of response variables in protein mixture formulation: constrained simplex method approach. **International Journal of Food Science and Technology**, v.38, n.2, p.103-110, 2003.

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

CORREIA, R.T.P.C.; MAGALHÃES, M.M.A.; PEDRINI, M.R.S.; CRUZ, A.V.F.; CLEMENTINO, I. Ice cream made from cow and goat milk: chemical composition and melting characteristics. **Revista de Ciências Agrônômicas**, v.39, p.251-256, 2008.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**: Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London: Ontário: FAO, 2002. 11p.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. In: _____, eds. **Handbook of prebiotics**. Boca Raton: CRC Press, 2008. 485p.

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.

GIRI, A.; RAO, H.G.R.; RAMESH, V. Effect of incorporating whey protein concentrate into stevia-sweetened Kulfis on physicochemical and sensory properties. **International Journal of Dairy Technology**, v.66, n.2, p.286-290, 2013.

GONZÁLEZ-TOMÁS, L.; BAYARRI, S.; COSTELL, E. Inulin-enriched dairy desserts: physicochemical and sensory aspects. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.9, p.4188-4199, 2009.

GUANG-CHANG, P.; JUNBO, X.; QINGSEN, C.; ZHIHE, H. How functional foods play critical roles in human health. **Food Science and Human Wellness**, v.1, n.1, p.26-60, 2012.

GUGGISBERG, D.; CUTHBERT-STEVEN, J.; PICCINALI, P.; BUTIKOFER, U.; EBERHARD, P. Rheological, microstructural and sensory characterization of low-fat and whole milk set yoghurt as influenced by inulin addition. **International Dairy Journal**, v.19, n.2, p.107-115, 2009.

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

HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) — A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. **Phytochemistry Letters**, v.4, p.10-21, 2011.

KOLIDA, S.; GIBSON, G.R. Synbiotics in health and disease. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.2, p.373-393, 2011.

- LISERRE, A.M.; RÉ, M.I.; FRANCO, B.D.G.M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Biotechnology**, v.21, n.1, p.1-16, 2007.
- MAHDIAN, E.; KARAZHIAN, R. Effects of fat replacers and stabilizers on rheological, physicochemical and sensory properties of reduced-fat ice cream. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v.15, n.6, p.1163-1174, 2013.
- MEYER, D.; BAYARRI, S.; TÁRREGA, A.; COSTELL, E. Inulin as texture modifier in dairy products. **Food Hydrocolloids**, v.25, n.8, p.1881-1890, 2011.
- MUSE, M.R.; HARTEL, R.W. Ice cream structural elements that affect melting rate and hardness. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.1, p.1-10, 2004.
- NAGPAL, R.; KUMAR, A.; KUMAR, M.; BEHARE, P.V.; JAIN, S.; YADAV, H. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. **FEMS Microbiology Letters**, v.334, n.1, p.1-15, 2012.
- PANDIYAN, C.; ANNAL VILLI, R.; KUMARESAN, G.; RAJARAJAN, G.; ELANGO, A. Effect of incorporation of whey protein concentrate on quality of ice cream. **Tamilnadu Journal Veterinary & Animal Sciences**, v.8, n.4, p.189-193, 2012.
- RELKIN, P.; SOURDET, S.; SMITH, A.K.; GOFF, H.D.; CUVELIER, G. Effects of whey protein aggregation on fat globule microstructure in whipped-frozen emulsions. **Food Hydrocolloids**, v.20, n.7, p.1050-1056, 2006.
- SMITHERS, G.W. Whey and whey proteins-From 'gutter-to-gold'. **International Dairy Journal**, v.18, p.695-704, 2008.
- SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food: product development, marketing consumer acceptance – a review. **Appetite**, v.51, n.3, p.456-467, 2008.
- 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).
- VIDIGAL, M.C.T.R.; MINIM, V.P.R.; BERGER, E.C.; RAMOS, A.M.; MINIM, L.A. Concentrado proteico do soro melhora a qualidade sensorial de sobremesa láctea diet. **Ciência Rural**, v.42, n.12, p.2272-2279, 2012.
- YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; SILVA FILHO, D.F.; YUYAMA, K.; VAREJÃO, M.J.; FÁVARO, D.I.T.; VASCONCELLOS, M.B.A.; PIMENTEL, S.A.; CARUSO, M.S.F. Caracterização físico-química do suco de açaí de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. **Acta Amazonica**, v.41, n.4, p.545-552, 2011.

CONCLUSÃO GERAL

No presente estudo, foi possível obter um sorvete de açaí adicionado do prebiótico fruto-oligossacarídeo (FOS), e da cepa probiótica *L. rhamnosus* GG, o qual manteve viabilidade na faixa de 8,78 a 8,99 log ufc/g nos produtos, ao final de 112 dias de armazenamento congelado. A adição dos ingredientes inulina (I) e concentrado (WC) e isolado proteico de soro (WI) contribuiu com o conteúdo de fibras e proteínas, respectivamente, das formulações estudadas, sem aumentar o valor calórico das mesmas. Além disso, a atividade antioxidante observada nas formulações dos sorvetes, juntamente com as quantidades apreciáveis de ácidos graxos insaturados, representa uma boa característica de alimento potencialmente funcional.

Baseado nos resultados deste estudo, I-WC-WI pode ser considerada a melhor formulação, pois se encaixa na maioria das características desejáveis: boa viabilidade de *L. rhamnosus* GG durante o período de 112 dias de armazenamento e maior sobrevivência deste micro-organismo, comparado à cultura fresca, quando submetido às condições gastrintestinais simuladas *in vitro*, além de apresentar aceitabilidade sensorial comparável à formulação controle. Esta formulação demonstrou os melhores parâmetros tecnológicos de fração de derretimento e dureza. Além disso, os três ingredientes (inulina, WC e WI) unidos em uma mesma formulação, reforça a possibilidade de se desenvolver um sorvete com ingredientes diferenciados, com a vantagem de possuir os benefícios à saúde previstos pelo açaí, pela cepa probiótica *L. rhamnosus* GG e pelo prebiótico fruto-oligossacarídeo.

ANEXOS

ANEXO I – Protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Comitê de Ética em Pesquisa - CEP
PARECER CONSUBSTANCIADO	
Parecer CEP/FCF/07/2011 Protocolo CEP/FCF/566 CAAE: 0030.018.0000-10	
I – Identificação:	
Projeto de Pesquisa:	Desenvolvimento de sorvete simbiótico de açaí e resistência dos probióticos <i>in vitro</i>.
Pesquisador Responsável:	Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad
Instituição:	Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF-USP/SP
Área Temática Especial:	-
Patrocinadores:	-
II - Sumário Geral do Protocolo:	
<p>Atualmente, a sociedade moderna está em busca de uma alimentação saudável e uma dieta balanceada com vistas à promoção da saúde. Uma das formas de se promover esta melhoria é através da inclusão de alimentos com propriedades funcionais benéficas para a saúde, tais como os produtos lácteos com ação funcional, sejam alimentos simbióticos, prebióticos e/ou probióticos. A adição de culturas probióticas e de ingrediente prebiótico, torna o alimento mais atrativo, potencialmente saudável, podendo ser apreciado pela maioria da população.</p> <p>Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo desenvolver um sorvete simbiótico com polpa de açaí, elaborado com a adição de culturas probióticas (<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>Rhamnosus</i> ATCC 7469 e <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12) e do prebiótico inulina. Será avaliado o efeito do congelamento sobre as características do produto, bem como estabelecida a melhor proporção entre os ingredientes inulina, concentrado proteico de soro e isolado proteico de soro, para o produto, durante o tempo de armazenamento. Será ainda avaliada a viabilidade dos probióticos adicionados ao sorvete, além da avaliação da aceitabilidade sensorial do novo produto.</p> <p>Os objetivos do presente estudo são:</p> <p>O projeto apresenta como objetivo geral, desenvolver um sorvete funcional com polpa de fruta tropical (açaí) com as culturas probióticas de <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>Rhamnosus</i> ATCC 7469 e <i>Bifidobacterium animalis</i> subespécie <i>lactis</i> Bb-12 e o prebiótico inulina.</p> <p>Para tanto, serão desenvolvidos objetivos específicos:</p> <ul style="list-style-type: none">✓ Avaliar o efeito do congelamento (-18±3°C) sobre a sobrevivência dos probióticos e as características tecnológicas de cada formulação, com objetivo de estabelecer a formulação mais adequada;✓ Verificar a viabilidade dos probióticos adicionados ao sorvete;✓ Verificar a resistência <i>in vitro</i> dos probióticos nos produtos frente às condições gástricas e entéricas simuladas e o efeito da adição dos ingredientes – WPC e isolado proteico do soro sobre essa resistência.✓ Avaliar a aceitabilidade sensorial e suas características físico-químicas durante armazenamento a -18°C.	
<small>Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP Fone: (11) - 3091-3622 - Fone / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: cepfcf@usp.br</small>	
Página 1	



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Descrição da Casuística:

Será realizada a análise sensorial das formulações constantes no projeto, tendo a previsão de no mínimo 30 e no máximo de 720 voluntários adultos saudáveis (provedores não treinados), podendo ser alunos de graduação e de pós-graduação, docentes e funcionários da Universidade de São Paulo ou outros voluntários que queiram participar do estudo.

Será aplicado um questionário sobre a aceitabilidade do produto elaborado, mencionando-se o nome do indivíduo que realizará o teste, data e especificação da amostra e o grau de aceitabilidade descrito em uma escala de 1 a 9, sendo os valores relacionados a "desgostei muitíssimo" e "gostei muitíssimo", respectivamente, além da descrição das características do produto que mais agradou e que menos agradou o voluntário. A avaliação sensorial será realizada após os 3 períodos de armazenamento (7, 28 e 56 dias), podendo um mesmo voluntário participar de uma ou mais etapas da pesquisa.

Os critérios de inclusão dos participantes são: serem voluntários saudáveis, ter entre 18 e 60 anos, de ambos os sexos.

Serão critérios de exclusão: Possuir histórico de manifestação de alergia, intolerância algum tipo de alimento, aditivo alimentar ou doença crônica (como diabetes, hipotireoidismo, hipertireoidismo, hipertensão cu outras), estar em tratamento médico, estar gripado, resfriado, ou indisposto; ter entrado em contato, há menos de 1 hora, com materiais, alimentos ou cosméticos de cheiro forte.

III – Situação do protocolo: **APROVADO** em reunião de 07/02/2011.

O CEP sugere apenas que para melhor aproveitamento dos dados coletados e caso o número de participantes permita, seja incluído na Ficha para teste de aceitação, a identificação do SEXO do voluntário.

Cabe ainda ao pesquisador:

- Comunicar ao CEP:
 - Eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
 - A interrupção do projeto;
- Apresentar relatório final em dezembro/2013.

São Paulo, 07 de fevereiro de 2011.

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

ANEXO II – Informações aos membros da banca



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: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

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

ANEXO III – Ficha do aluno

Ficha do Aluno	https://uspdigital.usp.br/janus/alunoGeral/ficha/fichaDoAlunoParaIm..
<p>Janus - Sistema Administrativo de Pós-Graduação</p>  <p>Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas Documento sem validade oficial FICHA DO ALUNO</p>	
<hr/>	
9133 - 7493320/1 - Mayra Garcia Maia Costa	
Email:	mayragarcia@usp.br
Data de Nascimento:	14/10/1983
Cédula de Identidade:	RG - 97002590932 - CE
Local de Nascimento:	México
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Engenheiro de Alimentos - Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará - Ceará - Brasil - 2008
Mestrado:	Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos (1) - Universidade Federal do Ceará - Ceará - Brasil - 2011
<hr/>	
Curso:	Doutorado
Programa:	Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área:	Tecnologia de Alimentos
Data de Matrícula:	25/02/2011
Início da Contagem de Prazo:	25/02/2011
Data Limite para o Depósito:	25/02/2015
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Susana Marta Isay Saad - 25/02/2011 até o presente. E.Mail: susaad@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 25/02/2011
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 25/03/2013
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	.
Histórico de Ocorrências:	Ingressou no Doutorado em 25/02/2011 Matrícula de Acompanhamento em 21/07/2014
<hr/>	
Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013)	
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/07/2014	
Impresso em: 15/09/14 09:24:10	

Janus - Sistema Administrativo de Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9133 - 7493320/1 - Mayra Garcia Maia Costa

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBA5702-4/1	Compostos Bioativos em Alimentos e sua Relação com a Saúde	15/03/2011	18/04/2011	30	2	100	A	N	Concluída
FBT5713-1/2	Biologia Molecular Aplicada à Biotecnologia Farmacêutica Industrial	18/04/2011	01/05/2011	60	4	90	A	N	Concluída
	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à disciplina FBT0201 - Tecnologia de Alimentos, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (2)	30/07/2011	30/11/2011	-	3	0	-	-	-
FBA5741-3/1	Química e Bioquímica de Alimentos I	18/09/2011	21/09/2011	60	4	100	B	N	Concluída
FBT5781-4/1	Culturas Probióticas: Aplicações Tecnológicas	10/10/2011	30/10/2011	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5800-4/1	Temas Avançados em Ciências e Tecnologia Farmacêutica I	17/10/2011	23/10/2011	30	2	90	A	N	Concluída
FBA5706-2/1	Planejamento Experimental para Otimização de Produtos e Processos em Alimentos	29/02/2012	12/08/2012	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5712-5/4	Fisiologia da Nutrição I	16/04/2012	27/05/2012	90	6	90	A	N	Concluída
FBT5773-8/5	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	08/10/2012	16/12/2012	30	2	90	A	N	Concluída
FBA5752-1/1	Probióticos em Alimentos e Suas Implicações na Saúde Humana	05/11/2013	16/12/2013	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	25	35
Estágios:			
Total:	0	25	35

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

- Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria nº 524, de 29.04.2008.
- Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR 3588, de 11.05.2005 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 10/01/2013.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/07/2014

Impresso em: 15/09/14 09:24:10