

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE SORVETES COM
CARACTERÍSTICAS SIMBIÓTICAS E AVALIAÇÃO
DA SOBREVIVÊNCIA DE *Lactobacillus paracasei* EM
CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Juan Marcel Frighetto

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**PRODUÇÃO DE SORVETES COM CARACTERÍSTICAS
SIMBIÓTICAS E AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE
Lactobacillus paracasei EM CONDIÇÕES
GASTROINTESTINAIS SIMULADAS**

Juan Marcel Frighetto

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Orientador(a): Profa. Dra. Neila Silvia Pereira dos Santos Richards

Santa Maria, RS, Brasil

2012

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Frihetto, Juan Marcel

Produção de sorvetes com características simbióticas e avaliação da sobrevivência de *Lactobacillus paracasei* em condições gastrointestinais simuladas / Juan Marcel Frihetto.-2012.

69 f.; 30cm

Orientadora: Neila Silvia Pereira dos Santos Richards
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, RS, 2012

1. Probiótico 2. Prebiótico 3. Inulina 4. Polidextrose
5. Trato Gastrointestinal I. Richards, Neila Silvia Pereira dos Santos II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**PRODUÇÃO DE SORVETES COM CARACTERÍSTICAS
SIMBIÓTICAS E AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE *Lactobacillus*
paracasei EM CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS**

elaborada por
Juan Marcel Frighetto

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA:

Neila Silvia Pereira dos Santos Richards, Dra.
(Presidente/Orientador)

Caciano Pelayo Zapata Noreña, Dr. (UFRGS)

Cristiano Ragagnin de Menezes, Dr. (UFMS)

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2012.

Dedico esta dissertação aos pais Mário e Lenir. Seus ensinamentos sobre determinação e coragem foram fundamentais nesta etapa e certamente garantirão inúmeras conquistas futuras.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria, por oportunizar o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, de caráter público e reconhecida qualidade.

Ao Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI), pela concessão de bolsa durante a realização do Mestrado.

Aos professores e funcionários do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da UFSM, por compartilharem seus conhecimentos e fornecerem auxílio quando necessitei, contribuindo para a construção desta dissertação.

À professora e orientadora Dra. Neila S. P. S. Richards pela dedicação e contribuição pessoal e acadêmica. Sua motivação frente às aulas ministradas e demais atividades acadêmicas é para mim, um exemplo de atitude de um grande Professor.

À professora Dra. Mirian Salvador, da Universidade de Caxias do Sul, e aos professores Dr. Adriano Brandelli, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e Dr. Luís Fernando da Costa Medina, da Universidade do Vale do Rio dos Sinos, por oportunizarem minhas primeiras experiências acadêmicas.

Às equipes do Laboratório de Análises e Pesquisas em Alimentos da Universidade de Caxias do Sul, Laboratório de Garantia da Qualidade da Penasul Alimentos e Laboratório MercoLab, em especial aos mestres Andréa Luciana Ferreira da Silva, Adriana Bardemaker Monteiro Leal e Obiratã Rodrigues, pelas oportunidades conferidas, contribuições técnicas e pelos conselhos que garantiram inúmeras conquistas.

Aos professores do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, especialmente à professora Dra. Cristina Simões da Costa, pela amizade e infinita contribuição acadêmica, bem como, aos colegas do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, especialmente à Angela Miorelli e Fabiana Eckhardt, pelo companheirismo desde aquela etapa.

À Carine Gláucia Comarella e Carla Cristina Bauermann Brasil, companhias especiais, permanentemente presentes nestes últimos dois anos, que contribuíram para um crescimento pessoal e profissional.

À Vanilson Pereira Silveira, Raquel Righi da Silva, Sabrina Vieira da Silva, Renata Brum Costa, Édina Zapparoli, Larissa de Lima Alves e Fernanda Ortolan por dedicarem seu carinho nestes últimos dois anos e oportunizarem momentos inesquecíveis.

À Gerusa Fátima da Silva, pela eterna amizade.

À Jean Marcus Frighetto, Giovana Piacentini e aos sobrinhos Gianluca e Ana Laura, pela compreensão e apoio nesta etapa.

Finalmente, aos pais Mário Frighetto e Lenir Luiza Hahn Frighetto pelo amor incondicional, pela educação conferida e pelo incentivo para a construção de uma carreira dedicada à arte de ser Professor.

Talvez não haja nenhuma prática mais difícil do que a da continuidade. Todavia, se desafiarmos para realizá-la um pouquinho mais a cada dia, sem perceber teremos construído um caminho para a felicidade nas profundezas de nossa vida.

(Daisaku Ikeda)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

PRODUÇÃO DE SORVETES COM CARACTERÍSTICAS SIMBIÓTICAS E AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE *Lactobacillus paracasei* EM CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS

AUTOR: JUAN MARCEL FRIGHETTO

ORIENTADOR(A): NEILA SILVIA PEREIRA DOS SANTOS RICHARDS

Local e data de defesa: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2012.

Pesquisas vêm demonstrando que o sorvete pode ser um veículo adequado para micro-organismos probióticos e para algumas substâncias prebióticas. Aliados a este aspecto, a ampla aceitação dos sorvetes, tanto por parte do público infantil, infanto-juvenil e adulto quanto do público da terceira idade, e o crescimento do seu consumo interno, estimulam a continuidade de estudos visando ao desenvolvimento de sorvetes funcionais. Estudos direcionados ao desenvolvimento de sorvetes probióticos, prebióticos e simbióticos buscam prioritariamente o estudo da viabilidade de micro-organismos probióticos e seus efeitos durante o período de armazenamento do produto. Entretanto, referências à sobrevivência destes micro-organismos sob as condições gastrointestinais quando incorporados nesta matriz láctea, essenciais para a comprovação da eficácia do produto, ocorrem em menor frequência. O objetivo deste estudo foi desenvolver sorvetes simbióticos e investigar a sobrevivência de *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 às condições gastrointestinais simuladas. Foram desenvolvidos quatro sorvetes, sendo um probiótico e três simbióticos (estes, incluindo *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 e inulina, oligofrutose ou polidextrose). Os sorvetes foram analisados quanto às suas características físicas (*overrun*), químicas e nutricionais (pH, ácido láctico, sólidos totais, cinzas, proteínas, gorduras, carboidratos e valor energético) e sensoriais (aceitabilidade, preferência, intenção de consumo e intensidade de gosto e sabor). A análise microbiológica compreendeu as contagens de micro-organismos probióticos viáveis em sorvete e sobreviventes às condições gastrointestinais simuladas, realizadas mensalmente durante o período de 90 dias. *L. paracasei* Lpc-37 apresentou resistência aos processos tecnológicos para obtenção de sorvete, estabilidade durante o período de armazenamento do produto e habilidade de resistência *in vitro* ao estresse gastrointestinal. Inulina e polidextrose desempenharam atividade protetora ao micro-organismo probiótico, elevando seus índices finais de sobrevivência *in vitro* às condições gastrointestinais simuladas. As fibras solúveis estudadas contribuíram para uma redução proporcional de gorduras nos sorvetes delas adicionados e conseqüente redução calórica. Efeitos aos atributos sensoriais, quando ocorreram, garantiram o destaque dos sorvetes adicionados de inulina, seguido daqueles adicionados de polidextrose. Portanto, a inclusão de *L. paracasei* Lpc-37 em sorvete apresentou viabilidade tecnológica e condições para cumprir seu papel funcional no colón, estimada em ensaio *in vitro*. Adicionalmente, inulina e polidextrose conferiram melhorias sob os aspectos funcionais, nutricionais e sensoriais de sorvete simbiótico. Os resultados obtidos ampliam as possibilidades de desenvolvimento de alimentos funcionais, uma vez que os sorvetes desenvolvidos contemplam com as expectativas dos consumidores por produtos simultaneamente atrativos e saudáveis.

Palavras-chave: Probiótico. Prebiótico. Inulina. Polidextrose. Trato Gastrointestinal. Sorvete.

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduate Program on Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria

MANUFACTURE OF SYMBIOTIC ICE CREAM AND SURVIVAL OF *Lactobacillus paracasei* UNDER SIMULATED GASTROINTESTINAL CONDITIONS

AUTHOR: JUAN MARCEL FRIGHETTO

ADVISER: NEILA SILVIA PEREIRA DOS SANTOS RICHARDS

Date and Place of Defense: Santa Maria, February, 27th, 2012.

Research has demonstrated that ice cream may be an appropriate vehicle for probiotic micro-organisms and some prebiotic substances. Also, the widespread acceptance of ice cream, both by infantile, juvenile and adult public as well as by the elderly, and the increase of its consumption encourage the continuation of applied studies for developing functional ice cream. However, current researches refer mostly to the viability of probiotic micro-organisms during the product's storage period, while references of the survival of these micro-organisms under gastrointestinal conditions, essential to confirm the product efficacy, occur less frequently. The aim of this study was to develop symbiotic ice creams and to investigate the survival of *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 under simulated gastrointestinal conditions. Four ice cream samples were developed, one probiotic and three symbiotic (these, including *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 and inulin, oligofructose or polydextrose). The ice cream samples were analyzed for physical (overrun), chemical and nutritional (pH, lactic acid, total solids, ash, protein, fat, carbohydrates and calorie level) and sensory characteristics (acceptability, preference, consumption frequency and taste and flavor intensity). Microbiological analysis comprised counts of viable probiotic micro-organisms in ice cream and its survival under simulated gastrointestinal conditions, carried out monthly during the period of 90 days. *L. paracasei* LPC-37 showed resistance to technological processes for in the obtention of ice cream, stability during the storage of product and resistance in vitro to the stress in the gastrointestinal tract. Inulin and polydextrose played a protective activity for probiotic micro-organism, elevating their final survival rates under simulated gastrointestinal conditions. The soluble fibers added into the ice cream contributed to a proportional fat reduction and consequently decreasing calorie levels. Effects on sensory attributes, when occurred, ensured the prominence of ice cream with inulin added, followed by those with polydextrose added. Therefore, the inclusion of *L. paracasei* Lpc-37 in ice cream shows technological viability and ability to do its functional role in the colon, estimated in vitro. Additionally, inulin and polydextrose improve functional, nutritional and sensory properties in symbiotic ice cream. Results extend the possibilities of development of functional foods, as the developed ice cream meets the consumer's expectations for attractive and healthy products

Keywords: Probiotic. Prebiotic. Inulin. Polydextrose. Gastrointestinal Tract. Ice Cream.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Probióticos.....	12
2.1.1 Gênero <i>Lactobacillus</i>	14
2.1.1.2 Espécie <i>Lactobacillus paracasei</i>	14
2.2 Fibras dietéticas e prebióticos	15
2.2.1 Inulina.....	17
2.2.2 Oligofrutose	18
2.2.3 Polidextrose	18
2.3 Sorvetes probióticos e prebióticos.....	19
3 ARTIGO CIENTÍFICO	22
Desenvolvimento de sorvetes simbióticos e sobrevivência de <i>Lactobacillus paracasei</i> às condições gastrointestinais simuladas.....	22
5 CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	48
APÊNDICES.....	55
ANEXOS	58

1 INTRODUÇÃO

O papel fundamental da dieta alimentar é fornecer nutrientes suficientes para atender exigências metabólicas, conferindo ao consumidor uma sensação de satisfação e bem-estar. Contudo, conhecimentos recentes suportam a teoria de que, além das necessidades nutricionais, a dieta alimentar pode modular atividades biológicas e desempenhar papéis prejudiciais ou benéficos à saúde (MENRAD, 2003).

Historicamente, o estado nutricional da população mundial é afetado pelas altas ingestões de sal, açúcar, gorduras saturadas e gorduras *trans* e pelas baixas ingestões de vitaminas, minerais e fibras dietéticas, sendo estes, os principais hábitos alimentares associados à ocorrência de doenças crônico-degenerativas. Buscando reduzir o risco de tais doenças, o desenvolvimento de alimentos contendo agentes biologicamente ativos tornou-se uma das prioridades de pesquisa voltadas ao mercado alimentício (ROBERFROID, 2002).

O termo alimento funcional foi definido inicialmente no Japão, durante a década de 1980, como “alimento para uso específico de saúde”. O conceito contemporâneo refere-se aos alimentos ou nutrientes cuja ingestão leva à importantes mudanças fisiológicas ao organismo, isoladas ou distintas daquelas associadas ao seu papel como nutriente (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2004). Neste segmento, destacam-se aqueles alimentos incluídos de micro-organismos probióticos, especialmente os produtos lácteos probióticos, que detêm imensa popularidade e representam a maior parcela do mercado mundial de alimentos funcionais (AGRAWAL, 2005; SIRÓ et al., 2008).

Pesquisas vêm demonstrando que o sorvete pode ser um veículo adequado para micro-organismos probióticos e para algumas substâncias prebióticas (CRUZ et al., 2009). Aliados a este aspecto, a ampla aceitação dos sorvetes, tanto por parte do público infantil, infanto-juvenil e adulto quanto do público da terceira idade, e o crescimento do seu consumo interno, estimulam a continuidade de estudos visando ao desenvolvimento de sorvetes funcionais (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE SORVETES, 2012; CRUZ et al., 2011).

Entre 2002 e 2009, o consumo de gelados comestíveis no Brasil cresceu 39,5%, passando de 713 milhões de litros para 995 milhões de litros por ano. Em 2010, o Brasil ocupou a décima posição no ranking mundial de consumo de gelados comestíveis, perdendo para países de clima gelado como Canadá, França e Suíça. Os sorvetes são os mais

consumidos no país, sendo responsáveis por 72% do mercado, com a produção de 718 milhões de litros por ano (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE SORVETES, 2012).

Estudos direcionados ao desenvolvimento de sorvetes probióticos e simbióticos buscam prioritariamente o estudo da viabilidade de micro-organismos probióticos e seus efeitos durante o período de armazenamento do produto. Entretanto, referências à sobrevivência destes micro-organismos sob as condições gastrointestinais quando incorporados nesta matriz láctea, essenciais para a comprovação da eficácia do produto, ocorrem em menor frequência.

Este estudo objetivou desenvolver sorvetes simbióticos e investigar a sobrevivência de *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 às condições gastrointestinais simuladas, apresentando como objetivos específicos:

- Avaliar a viabilidade *L. paracasei* Lpc-37 em sorvete probiótico e simbiótico durante armazenamento à -18 °C;
- Determinar os índices de pH e de ácido láctico em sorvete probiótico e simbiótico durante armazenamento à -18 °C;
- Avaliar a sobrevivência *in vitro* de *L. paracasei* Lpc-37 em sorvete probiótico e simbiótico às condições gastrointestinais simuladas;
- Determinar características físicas e nutricionais de sorvete probiótico e simbiótico;
- Analisar a aceitabilidade dos atributos sensoriais, estimar a intenção de consumo, definir a preferência e determinar a intensidade de gosto doce, gosto ácido e sabor característico de morango em sorvete probiótico e simbiótico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Probióticos

Probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001). Compreendem certas espécies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus*, capazes de interagir com a microbiota intestinal por meio de antagonismo contra grupos específicos de micro-organismos pela produção de agentes antimicrobianos, competição por sítios de adesão na superfície do epitélio intestinal, competição por nutrientes e modificação dos processos metabólicos intestinais (FERREIRA, 2009). O efeito dos probióticos sobre o estado de saúde do hospedeiro é dependente das mudanças que eles promovem na composição e na atividade metabólica da microbiota residente (BUDDINGTON, 2009).

Inúmeros benefícios à saúde têm sido atribuídos à ingestão de probióticos. Dentre estes, cabe destacar: equilíbrio da microbiota intestinal; controle de patógenos intestinais; controle de *Helicobacter pylori*; modulação da constipação intestinal; modulação de diarreias de diferentes origens; modulação da intolerância à lactose; modulação do sistema imune; modulação de episódios alérgicos; modulação do colesterol; atividade antitumorigênica e anticancerígena; atividade anti-hipertensiva; modulação de doenças inflamatórias intestinais; modulação de encefalopatia portal sistêmica; modulação de infecções urogenitais e; modulação da síndrome de fadiga crônica (FERREIRA, 2009).

A conscientização dos consumidores sobre os inúmeros benefícios à saúde conferidos pelos probióticos vem atraindo o interesse no desenvolvimento de produtos contendo estes micro-organismos.

Os micro-organismos probióticos atualmente regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para aplicação em alimentos com alegação de propriedade funcional, são mencionados na Tabela 1.

Os micro-organismos *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* foram retirados desta lista, tendo em vista que além de serem

espécies necessárias para produção de iogurte, não possuem efeito probiótico cientificamente comprovado (BRASIL, 2008).

Tabela 1 – Micro-organismos probióticos regulamentados pela ANVISA (BRASIL, 2008).

Probióticos

Lactobacillus acidophilus

Lactobacillus casei var. *shirota*

Lactobacillus casei var. *rhamnosus*

Lactobacillus casei var. *defensis*

Lactobacillus paracasei

Lactococcus lactis

Bifidobacterium bifidum

Bifidobacterium animalis (incluindo a subsp. *B. lactis*)

Bifidobacterium longum

Enterococcus faecium

A quantidade mínima viável de micro-organismos probióticos deve estar situada entre 8 e 9 log UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante (BRASIL, 2008). Quantidades mínimas entre 6 e 7 log UFC g⁻¹ do micro-organismo probiótico no produto pronto para consumo são recomendadas por normas em nível mundial (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1992; SHAH, 2010).

Micro-organismos probióticos, quando empregados em alimentos com alegação de propriedade funcional, devem apresentar resistência às operações de processamento e viabilidade durante o período de armazenamento do produto (AKIN et al., 2007).

A resistência aos níveis de acidez, bile e enzimas do trato gastrointestinal é fundamental para garantir a sobrevivência e atividade metabólica dos micro-organismos probióticos (ALAMPRESE et al., 2002). Neste sentido, os testes *in vitro* são frequentemente sugeridos para a avaliação do potencial probiótico de uma linhagem microbiana (MATHARA et al., 2008). Mesmo que estes ensaios não sejam totalmente adequados para prever a funcionalidade *in vivo*, o estudo da resistência *in vitro* às condições gastrointestinais simuladas de micro-organismos probióticos inoculados nos produtos estudados, parece ser útil na seleção de uma matriz adequada que contribua para a sobrevivência de probióticos durante sua passagem pelo trato gastrointestinal (SCHILLINGER et al., 2005).

2.1.1 Gênero *Lactobacillus*

Lactobacillus é um dos gêneros originais do grupo das bactérias lácticas e compreende cepas probióticas tradicionalmente incorporadas em alimentos para consumo humano que, em sua maioria, são oriundas do intestino humano (LERAYER et al., 2009).

Espécies deste gênero podem ser homofermentativas, produzindo mais de 85% de ácido láctico a partir da glicose, ou heterofermentativas, produzindo ácido láctico, CO₂, etanol e/ou ácido acético. Requerem aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos, derivativos de ácidos nucleicos, vitaminas, sais e carboidratos fermentáveis para o crescimento. A maioria cresce melhor em condições anaeróbias ou microaerófilas. A temperatura ótima de crescimento é de 27 a 40 °C e o crescimento a 15 ou 45 °C varia entre as espécies. São acidúricos, crescendo em pH 4,5 e não em 9,0 (BERGEY & HOLT, 1994; SILVA et al., 2007).

Metchnikoff (1908) referiu-se pela primeira vez ao consumo de leite fermentado e sua relação com a promoção de saúde. Estes estudos, envolvendo inicialmente *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, ressurgiram anos após com a suplementação de alimentos com *L. acidophilus*, considerando a maior afinidade desta espécie com o trato intestinal humano, quando comparada à *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, incapaz de sobreviver às condições gástricas e entéricas (RETTGER, 1935). Atualmente, a ANVISA reconhece apenas a funcionalidade das espécies *L. acidophilus*, *L. casei* e *L. paracasei* do gênero *Lactobacillus* (BRASIL, 2008), embora estudos contemporâneos sugiram que outras espécies pertencentes ao gênero, como *L. plantarum* (RACHMILEWITZ et al., 2004), *L. murinus* (PERELMUTER, 2007) e *L. johnsonii* (ALAMPRESE, 2002), igualmente apresentem potencial probiótico.

2.1.1.2 Espécie *Lactobacillus paracasei*

Cepas de *Lactobacillus paracasei* pertencem ao grupo *Lactobacillus casei*, o qual compreende também as espécies *L. zaeae*, *L. casei* e *L. rhamnosus* (BERGEY & HOLT, 1994). À exceção de *L. zaeae*, cepas deste grupo apresentam reconhecido potencial probiótico em animais e humanos (FRANZ et al., 2011).

O uso de cepas de *L. paracasei* em produtos lácteos e seus aspectos funcionais têm sido amplamente relatados. Vinderola et al. (2009) avaliaram a viabilidade e os efeitos de *L. paracasei* em queijo fresco probiótico, constando que o micro-organismo permaneceu viável durante 15 dias de armazenamento à 5 °C sem ocasionar efeitos negativos à aceitação sensorial do produto.

Entre os micro-organismos probióticos estudados por Kask et al. (2003), cepas de *L. paracasei* revelaram viabilidade tecnológica para incorporação em matrizes lácteas e apresentaram capacidade de sobrevivência em pH 3 e 0,3% de sais biliares, condições características do ambiente gastrointestinal. Bertazzoni Minelli et al. (2004) também demonstram a alta resistência de cepas de *L. paracasei* ao estresse gastrointestinal e adicionalmente, constataram a sua capacidade de aderência às células do epitélio intestinal.

Estudos *in vivo* apontaram para as possíveis atividades de imunomodulação e modulação de colesterol atribuídas à *L. paracasei*. Lin et al. (2004) e Chiu et al. (2006) relataram que *L. paracasei* reduziu os níveis de colesterol em ratos hipercolesterolêmicos. Medici et al. (2004) estudou a capacidade imunomoduladora de *L. paracasei* incorporado em queijo fresco, demonstrando que este micro-organismos foi capaz de aumentar o número de células produtoras de imunoglobulina A na lâmina própria dos intestinos delgado e grosso em camundongos.

Tais estudos indicam o potencial probiótico e a viabilidade tecnológica de cepas de *L. paracasei* quando incorporadas em produtos lácteos. Os inúmeros benefícios à saúde atribuídos à atividade de *L. paracasei*, os quais avançam além do popular equilíbrio da microbiota intestinal, aumentam o interesse pelo emprego deste micro-organismo como probiótico em alimentos. Contudo, o desempenho da cepa selecionada é variável de acordo com a matriz alimentícia específica.

2.2 Fibras dietéticas e prebióticos

Embora careça de uma definição concreta, a fibra dietética é considerada como o conjunto de polissacarídeos hidrossolúveis diferentes do amido, que se caracterizam pela resistência à hidrólise por meio de enzimas digestivas do trato gastrointestinal. Isso significa que as ligações de união das diferentes unidades monoméricas que constituem estes polímeros são resistentes à digestão (ÓRDOÑEZ PEREDA, 2005).

A fibra dietética é dividida em duas frações, de acordo com a solubilidade de seus componentes. A fibra dietética insolúvel compreende a celulose, a lignina e algumas frações de hemicelulose e é responsável pelo efeito benéfico de motilidade intestinal. A fração conhecida como fibra dietética solúvel engloba gomas, pectinas, mucilagens, polissacarídeos de reserva e hemiceluloses solúveis, que são metabolizados no intestino grosso e originam metano, hidrogênio, CO₂ e ácidos graxos de cadeia curta (DAMODARAN et al., 2010). Seus efeitos fisiológicos são inúmeros e, geralmente, estão associados à redução de doenças

cardiovasculares, diabetes, hipertensão, obesidade e distúrbios gastrointestinais (ANDERSON et al., 2009).

O crescente interesse de estudo da fibra dietética é decorrente da constatação da menor incidência de doenças crônicas em populações orientais, que sustentam dietas alimentares com alta ingestão de fibras dietéticas (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001).

Os prebióticos são substâncias não digeríveis, resistentes à hidrólise no estômago e no intestino delgado e, portanto, integram a categoria das fibras dietéticas, desempenhando funções importantes sob o aspecto nutricional, fisiológico e imunológico (NINESS, 1999; GIBSON & ROBERFROID, 2008). Entretanto, diferentemente das demais fibras dietéticas, os prebióticos são fermentados seletivamente pela microbiota intestinal benéfica e, assim, incluem basicamente a lactulose, a inulina e os oligossacarídeos (CUMMINGS & MACFARLANE, 2002) (Figura 1).

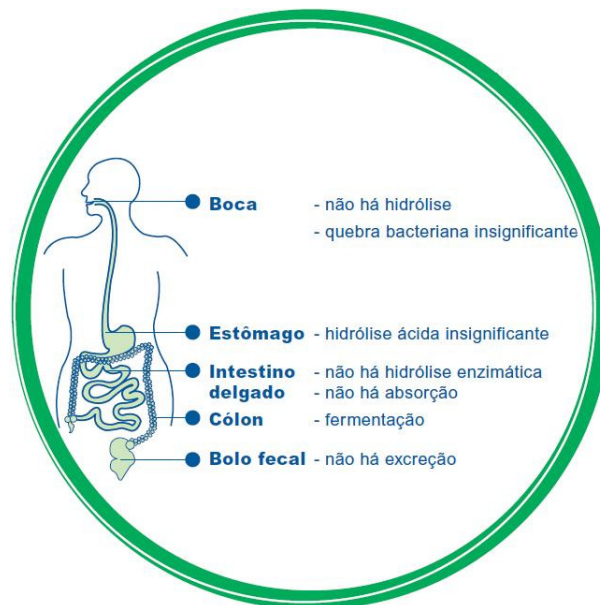


Figura 1 – Metabolismo digestório de inulina e oligofrutose em humanos (BENEO-ORAFI, 2010).

Deste modo, os prebióticos estimulam o crescimento e a atividade de micro-organismos benéficos pertencentes à microbiota intestinal (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001). Um produto alimentício contendo probióticos e prebióticos é definido como simbiótico (HOMAYOUNI et al., 2007). Os produtos simbióticos permitem uma sinergia entre probióticos e prebióticos, sendo que os micro-organismos probióticos obtêm carbono através da fermentação das substâncias prebióticas, mantendo sua viabilidade celular (GIBSON & RASTALL, 2006).

Alegações de funcionalidade em alimentos prebióticos podem ser utilizadas desde que a porção do produto pronto para consumo forneça no mínimo 3 g do ingrediente prebiótico se o alimento for sólido ou 1,5 g se o alimento for líquido (BRASIL, 2008).

2.2.1. Inulina

Inulina é um polímero constituído de subunidades de frutose ligadas entre si e a uma glicose terminal, com grau de polimerização de 2 a 60 unidades. Normalmente, é extraída da raiz de chicória (*Chichorium intybus*) ou da alcachofra de Jerusalém (*Heliantus tuberosus*), por difusão em água quente (GIBSON & ROBERFROID, 2008). Recentemente, a extração a partir de raiz de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tem sido proposta (LAGO et al., 2011). A inulina difere da oligofrutose apenas por seu grau de polimerização (Figura 2).

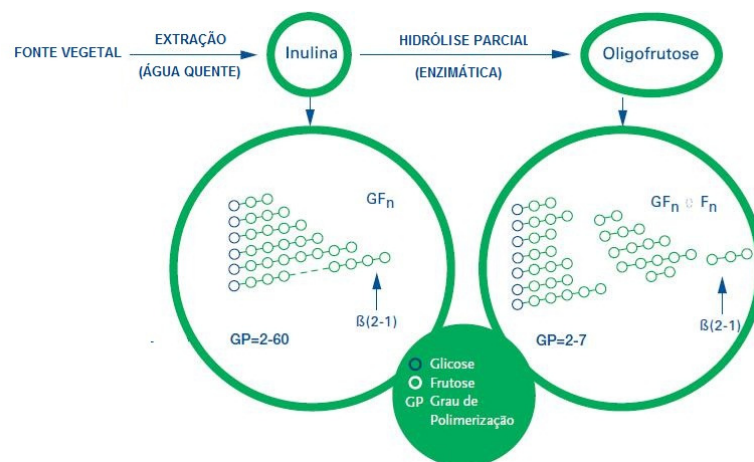


Figura 2 – Obtenção e estrutura de inulina e oligofrutose (BENEO-ORAFI, 2010, adaptada).

Inulina e oligofrutose são mundialmente classificadas como alimentos ou ingredientes alimentares e cientificamente reconhecidas como prebióticos para uso em dietas alimentares humanas (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002; GIBSON & ROBERFROID, 2008). Estas substâncias atuam como substratos preferencialmente e seletivamente metabolizados pela microbiota benéfica, especialmente por espécies de *Bifidobacterium* e, em menor escala, por espécies de *Lactobacillus*, estimulando seu crescimento e, inclusive, suprimindo o crescimento de *Escherichia coli* e de espécies de *Clostridium* no cólon (OLIVEIRA & PENNA, 2008; WANG & GIBSON, 1998). Há evidências de que a modulação da microbiota intestinal atribuída à ingestão de inulina e oligofrutose é capaz suprimir a manifestação de

doenças autoimunes e de câncer colorretal (KAUR & GUPTA, 2002; ROBERFROID, 2002; SAAD et al., 2011).

Por apresentar cadeias maiores, a inulina é menos solúvel que a oligofrutose e tem a habilidade de formar microcristais quando misturada em água ou leite. Estes microcristais são imperceptíveis, mas interagem para formar uma textura cremosa que promove uma sensação ao paladar semelhante à da gordura. Consequentemente, a inulina é comumente usada quando se pretende obter produtos com menor teor de gordura (OLIVEIRA & PENNA, 2008).

2.2.2 Oligofrutose

Oligofrutose é um derivado da inulina, com grau de polimerização de 2-10 unidades. É normalmente obtida por hidrólise controlada de inulina, contudo, é igualmente sintetizada a partir de açúcares simples, como a sacarose, por uma reação de transglicosilação (GIBSON & ROBERFROID, 2008; USHIJIMA, 2001).

Estudos clínicos relatam o aumento da população de espécies de *Bifidobacterium* da microbiota intestinal após a inclusão de oligofrutose na dieta alimentar (GOMES & MALCATA, 1999). Há evidências de que a ingestão de oligofrutose em determinadas quantidades pode aumentar a biodisponibilidade de cálcio e até reduzir significativamente a sintomatologia de doenças autoimunes que atacam o sistema digestório (LINDSAY et al., 2006; ROBERFROID, 2002).

A oligofrutose é comumente empregada para balancear a doçura e mascarar o sabor residual de adoçantes de alta intensidade em produtos de baixa caloria (OLIVEIRA & PENNA, 2008). Como os demais oligossacarídeos, também pode ser usada para alterar a temperatura de congelamento, reduzir as reações de Maillard e prevenir a secagem excessiva de alimentos (CRITTENDEN & PLAYNE, 1996).

2.2.3 Polidextrose

Polidextrose é um polímero constituído basicamente por glicose, de estrutura altamente ramificada e grau de polimerização de aproximadamente 12 unidades, obtido pela policondensação térmica a vácuo da glicose em presença de um catalizador ácido, utilizando sorbitol como plastificante (CRAIG et al., 2000).

Estudos clínicos comprovaram os benefícios atribuídos à ingestão da polidextrose, evidenciando seu papel como fibra dietética. Esta substância é parcialmente metabolizada no

cólon pela microbiota intestinal, originando ácidos graxos de cadeia curta, sobretudo acetato e butirato. É capaz de aumentar o volume fecal, favorecer o trânsito intestinal e reduzir o pH fecal. Modula a microbiota intestinal, aumentando em número os micro-organismos benéficos, em especial as cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e diminuindo aqueles prejudiciais, tais como as cepas de *Clostridium*. Além disso, a fermentação da polidextrose reduz a concentração de determinadas substâncias carcinogênicas no cólon e auxilia a homeostase de glicose no sangue devido ao seu baixo índice glicêmico (CRAIG et al., 2000; RANINEN et al., 2011, ZHONG et al., 2000). Embora desempenhe inúmeros benefícios à saúde humana, o potencial prebiótico de polidextrose parece não estar consolidado, e seu emprego em produtos lácteos sob este propósito é pouco relatado.

Semelhantemente à inulina, a polidextrose apresenta valor energético reduzido e é reconhecida por aprimorar aspectos tecnológicos e nutricionais dos alimentos que as contêm, especialmente aqueles com teor reduzido de gorduras (FRANCK, 2002; DEVEREUX et al., 2003).

2.3 Sorvetes probióticos e prebióticos

A definição para o sorvete é variável de acordo com a legislação de cada país (PAPADEMAS & BINTSIS, 2002). Segundo a ANVISA, os sorvetes pertencem ao grupo dos gelados comestíveis, que por definição, são os produtos congelados obtidos a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas, ou de uma mistura de água e açúcares. Podem ser adicionados de outros ingredientes desde que não descaracterizem o produto (BRASIL, 2005).

Tecnologicamente, os sorvetes são considerados sistemas alimentícios coloidais estruturalmente complexos, espumas compostas por bolhas de ar envoltas por uma emulsão parcialmente congelada. Água, gordura, emulsificantes, sólidos não gordurosos do leite, açúcares, estabilizantes, ar e gelo são os principais componentes desse produto. Os cristais de gelo e os glóbulos de gordura sólida estão dispersos em uma fase contínua líquida não congelada, que contém proteínas, carboidratos, sais e gomas, denominada fase soro (Figura 3) (WALSTRA et al., 1999; GOFF, 2008).

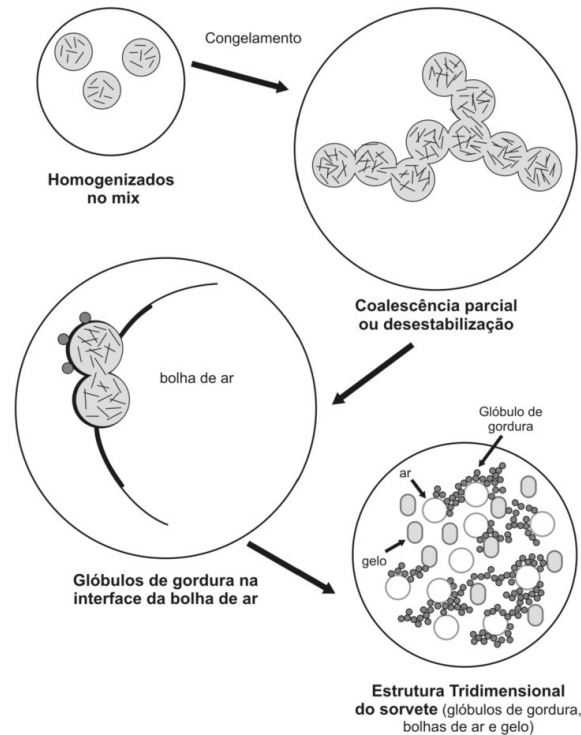


Figura 3 – Transformações do glóbulo de gordura durante processamento e estrutura tridimensional de sorvete (CRUZ et al., 2011).

Estudos demonstram que o sorvete pode ser um veículo adequado para micro-organismos probióticos, devido à sua composição, que inclui proteínas, gorduras e lactose, assim como outros compostos. Além disso, o pH do sorvete, próximo à neutralidade, prevê a possibilidade de satisfatória sobrevivência de micro-organismos probióticos durante seu armazenamento (CHRISTIANSEN et al., 1996; CRUZ et al. 2009).

Entretanto, é essencial garantir que o produto ofereça uma quantidade adequada de micro-organismos probióticos, resistentes ao congelamento e armazenamento. Foschino et al. (1992) e recentemente, Buriti et al. (2010) demonstraram que temperaturas mais baixas podem garantir uma maior taxa de sobrevivência microbiana. No entanto, é imprescindível considerar que as operações de congelamento e descongelamento podem reduzir a viabilidade de micro-organismos, através de danos às estruturas celulares, decorrentes da formação de cristais de gelo, e redução ou interrupção da atividade metabólica (ROBINSON, 1985). A inclusão de ar, essencial para a obtenção das características tecnológicas esperadas para o sorvete, também pode afetar a viabilidade de micro-organismos probióticos, visto que o excesso de oxigênio é tóxico para a maioria destes, que são microaerófilos ou anaeróbios facultativos (KAILASAPATHY & SULTANA, 2003).

Em relação às substâncias prebióticas, inulina e oligofrutose têm sido adicionadas em sorvete (SCHALLER-POVOLNY & SMITH, 1999; CAUSEY et al., 2000; EL-NAGAR et al., 2002). Devereux et al. (2003) defendem o emprego de inulina como substituto parcial da gordura em sorvetes, em função de seu desempenho como agente de textura. O interesse do consumidor por produtos com um teor reduzido de gordura incentiva o emprego dessas substâncias nestes produtos, que deste modo, podem contribuir para a diminuição da incidência de doenças crônico-degenerativas (AKALIN et al., 2007). Substâncias prebióticas podem ainda apresentar um leve gosto doce, permitindo a menor adição de edulcorante em sorvete e conseqüentemente, garantindo uma redução de seu conteúdo em calorias (KAUR & GUPTA, 2002).

Estudos recentes demonstram a inexistência de influências negativas aos atributos sensoriais de produtos adicionados de agentes probióticos e prebióticos. A análise sensorial fornece um conhecimento prévio sobre a aceitação destes produtos pelo possível mercado consumidor, bem como, pode determinar características específicas e descrever um perfil sensorial, atuando como base para o desenvolvimento de um produto inovador (GRANATO et al., 2010).

Considerando que a porção estabelecida para o sorvete pela RDC n°. 359 de 23 de dezembro de 2003 é de 60 g (BRASIL, 2003), a quantidade dos ingredientes prebióticos adicionados neste produto deve corresponder ao mínimo de 5% da formulação, para que o produto pronto para consumo apresente alegação de propriedade funcional (BRASIL, 2008).

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo em revisão final pelos autores para submissão ao periódico *International Dairy Journal*.

Estruturação conforme respectivo *Guide for Authors*, Anexo A.

Desenvolvimento de sorvetes simbióticos e sobrevivência de *Lactobacillus paracasei* às condições gastrointestinais simuladas

Juan Marcel Frighetto* & Neila Silvia Pereira dos Santos Richards.

Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais,
Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, 97105-900, Camobi, Santa
Maria, RS, Brasil. * Corresponding author. Tel.: +55 54 34622758. *E-mail address:*
juanfrighetto@hotmail.com

Resumo

A viabilidade de *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 em sorvete simbiótico com teor reduzido de gorduras e sua sobrevivência *in vitro* às condições gastrointestinais simuladas quando em presença de inulina, oligofrutose ou polidextrose, bem como, os efeitos desse micro-organismo e destas fibras solúveis em características físicas, nutricionais e sensoriais de sorvete foram estudados. *L. paracasei* apresentou contagens iniciais elevadas e estabilidade durante armazenamento dos sorvetes, mantendo contagens ao redor de 8 log UFC g⁻¹ após 90 dias. Demonstrou habilidade de resistência aos níveis de pH, sais biliares e enzimas gastrointestinais, principalmente quando em presença de polidextrose ou inulina. Fibras solúveis contribuíram para uma redução proporcional de gorduras nos sorvetes delas adicionados e conseqüente redução calórica. Conseqüências sensoriais, quando ocorreram, garantiram o destaque dos sorvetes adicionados de inulina, seguido daquele adicionado de polidextrose. A inclusão de *L. paracasei* e fibras solúveis em sorvete apresentou viabilidade tecnológica e melhorias sob os aspectos nutricionais e funcionais.

Palavras chave: Probiótico; Prebiótico; Inulina; Polidextrose; Trato gastrointestinal; Sorvete.

1 Introdução

Probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do consumidor. Os prebióticos são substâncias não digeríveis, que estimulam o crescimento e a atividade de micro-organismos benéficos pertencentes à microbiota intestinal (FAO/WHO, 2001). Um produto alimentício contendo probióticos e prebióticos é definido como simbiótico (Homayouni, Ehsani, Azizi, Razavi & Yarmand, 2007). Os produtos simbióticos permitem uma sinergia entre probióticos e prebióticos, sendo que os micro-organismos probióticos obtêm carbono através da fermentação das substâncias prebióticas, mantendo sua viabilidade celular (Gibson & Rastall, 2006).

Estudos vêm demonstrando que o sorvete pode ser um veículo adequado para micro-organismos probióticos, devido à sua composição, que inclui proteínas, gorduras e lactose, assim como outros compostos. Além disso, o pH do sorvete, próximo à neutralidade, prevê a possibilidade de satisfatória sobrevivência de micro-organismos probióticos durante seu armazenamento (Christiansen, Edelsten, Kristiansen & Nielsen, 1996; Cruz, Antunes, Sousa, Faria & Saad, 2009).

Foschino, Beretta & Ottogalli (1992) e recentemente, Buriti, Castro & Saad (2010) demonstraram que temperaturas mais baixas podem garantir uma maior taxa de sobrevivência microbiana. Entretanto, as operações de congelamento e descongelamento podem reduzir a viabilidade de micro-organismos, através de danos às estruturas celulares, decorrentes da formação de cristais de gelo, e redução ou interrupção da atividade metabólica (Papademas & Bintzes, 2002). A inclusão de ar, essencial para a obtenção das características tecnológicas esperadas para o sorvete, também pode afetar a viabilidade de micro-organismos probióticos, visto que o excesso de oxigênio é tóxico para a maioria destes, que são microaerófilos ou anaeróbios facultativos (Kailasapathy & Sultana, 2003).

A resistência aos níveis de acidez, bile e enzimas do trato gastrointestinal é fundamental para garantir a sobrevivência e atividade metabólica dos micro-organismos probióticos (Alamprese, Foschino, Rossi, Pompei, & Savani, 2002). Neste sentido, os testes *in vitro* são frequentemente sugeridos para a avaliação do potencial probiótico de uma linhagem microbiana (Lissere, Ré & Franco, 2007; Mathara et al., 2008,). Mesmo que estes ensaios não sejam totalmente adequados para prever a funcionalidade *in vivo*, o estudo da resistência *in vitro* às condições gastrointestinais simuladas de micro-organismos probióticos inoculados nos produtos estudados, parece ser útil na seleção de uma matriz adequada que contribua para

a sobrevivência de probióticos durante sua passagem pelo trato gastrointestinal (Schillinger, Guigas & Holzapfel, 2005).

Estudos prévios apontam para o potencial probiótico e para a viabilidade tecnológica de cepas de *Lactobacillus paracasei* em produtos lácteos. Os inúmeros benefícios à saúde atribuídos à atividade de *L. paracasei* ampliam o interesse pelo emprego deste micro-organismo em alimentos (Chiu, Lu, Tseng & Pan, 2006; Medici, Vinderola & Perdigón, 2004; Vinderola, Prosello, Molinari, Ghiberto & Reinheimer, 2009).

Inulina e oligofrutose são prebióticos reconhecidos internacionalmente e seu emprego em sorvetes tem sido proposto (Puupponen-Pimiã et al., 2002; Gibson & Roberfroid, 2008). A incorporação de polidextrose em produtos lácteos sob o papel de prebiótico é pouco relatada, embora os inúmeros benefícios associados à sua ingestão, entre os quais está a modulação da microbiota intestinal, tenham sido evidenciados (Craig, Holden & Khaled, 2000; Raninen, Lappi, Mykkänen & Poutanen, 2011).

Prebióticos resistem à hidrólise no estômago e no intestino delgado e, portanto, integram a categoria das fibras dietéticas, as quais desempenham funções importantes sob o aspecto nutricional, fisiológico e imunológico (Niness, 1999; Gibson & Roberfroid, 2008). Também apresentam valor energético reduzido e são reconhecidos por aprimorarem aspectos tecnológicos e nutricionais dos alimentos que as contêm, particularmente aqueles com teor reduzido de gorduras (Franck, 2002; Devereux, Jones, McCormack & Hunter, 2003).

O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade de *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 em sorvete simbiótico com teor reduzido de gorduras e sua sobrevivência *in vitro* às condições gastrointestinais simuladas quando em presença de inulina, oligofrutose e polidextrose, bem como, analisar os efeitos desse micro-organismo e destas fibras solúveis em características físicas, químicas, nutricionais e sensoriais de sorvete.

2 Material e métodos

2.1 Desenvolvimento dos sorvetes

Os sorvetes foram produzidos em escala laboratorial nas instalações do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, do Centro de Ciências Rurais, da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil.

Os ingredientes foram proporcionalmente pesados e dissolvidos em leite UHT com 3% de gordura. A formulação básica dos sorvetes incluiu 18 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de

glicose, 7,5 g L⁻¹ de creme de leite pasteurizado com 41% de gordura, 7,5 g L⁻¹ de leite em pó desnatado, 1 g L⁻¹ de emulsificante (monoglicérides de ácidos graxos, monoesterato de sorbitana, polioxietileno de monoesterato de sorbitana e conservante sorbato de potássio) (Emustab[®], Duas Rodas Industrial Ltda., Jaraguá do Sul, Brasil), 1 g L⁻¹ de estabilizante (açúcar, espessante goma guar e carboximetilcelulose) (Super Liga Neutra, Duas Rodas Industrial Ltda., Jaraguá do Sul, Brasil) e 2 g L⁻¹ de flavorizante morango (Duas Rodas Industrial Ltda., Jaraguá do Sul, Brasil).

Adicionalmente, a formulação incluiu 7,2 g L⁻¹ de inulina (89% em fibra dietética, Orafti[®]GR, Beneo[™], Tienen, Bélgica), para obtenção do sorvete simbiótico com inulina (PI); 7,2 g L⁻¹ de oligofrutose (92% em fibra dietética, Orafti[®]P95, Beneo[™], Tienen, Bélgica), para obtenção do sorvete simbiótico com oligofrutose (PO); e 7,2 g L⁻¹ de polidextrose (90% em fibra dietética, Litesse[®], Danisco S/A, Copenhague, Dinamarca), para obtenção do sorvete simbiótico com polidextrose (PP). A formulação básica permaneceu inalterada para obtenção do sorvete probiótico (P).

As misturas foram pasteurizadas a 85 °C por 5 minutos e resfriadas a 27 °C. Em seguida, as misturas foram adicionadas de 0,2 g L⁻¹ de cultura liofilizada DVS de *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 (Danisco S/A, Copenhague, Dinamarca) e incubadas em estufa a 27 °C por 4 horas, respeitando a temperatura ótima de crescimento do micro-organismo em questão (Castele et al., 2006).

Após incubação, as misturas foram resfriadas a cerca de 4 °C e mantidas à esta temperatura por 12 horas. Logo, estas foram homogeneizadas em Sorveteira Dupla Flavor Duo[™] Série ICE-40 (Cuisinart[®], Stamford, USA) por 25 minutos e mantidas em *freezer* à -18 °C até devida análise.

2.2 Viabilidade de *L. paracasei* Lpc-37 em sorvete

Para a contagem de *L. paracasei* Lpc-37 viáveis em sorvete, alíquotas de 25 g de cada sorvete foram adicionadas à 225 mL de solução salina 0,85% (p v⁻¹) e homogeneizadas por 60 segundos em *stomacher*. A partir da diluição inicial, foram efetuadas sete diluições decimais seriadas, possibilitando a contagem das colônias. De cada diluição, 1 mL foi inoculado em ágar LC e as placas foram incubadas em estufa à 27 °C, em anaerobiose, por 4 dias (Castele et al., 2006; Ravula & Shah, 1998). Os resultados obtidos foram expressos em log UFC g⁻¹.

2.3 pH e ácido láctico

O pH foi mensurado em pHmetro digital (Digimed DM-22, São Paulo, Brasil) e o percentual de ácido láctico, obtido por titulação potenciométrica (AOAC, 2007).

2.4 Sobrevivência de *L. paracasei* Lpc-37 às condições gastrointestinais simuladas

A sobrevivência de *L. paracasei* Lpc-37 em sorvete submetido às condições gástricas e entéricas simuladas foi avaliada de acordo com método descrito por Liserre et al. (2007) com modificações.

Alíquotas de 10 g de cada sorvete foram adicionadas de HCl 1 M até a obtenção de pH de 1,4-1,9 e de soluções de pepsina (*pepsin from porcine gastric mucosa* P7000, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e lipase (*lipase from porcine pancreas* 62300, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) até a obtenção uma concentração de 3 g L⁻¹ e de 0,9 mg L⁻¹, respectivamente. As amostras foram incubadas a 37 °C, sob agitação contínua, durante 2 horas (fase gástrica). Na etapa seguinte, o pH das amostras foi aumentado para 4,3-5,2 usando uma solução alcalina (150 mL de NaOH 1 M, 12,38 g de NaH₂PO₄.H₂O e água destilada até 1 L). Bile (*bile bovine* B3883-25G, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e pancreatina (*pancreatin from porcine pancreas* P3292, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) foram adicionadas até a obtenção de uma concentração de 10 g L⁻¹ e de 1 g L⁻¹, respectivamente. As amostras foram incubadas novamente a 37 °C por 2 horas, sob agitação contínua (fase entérica I). Na última etapa, o pH foi aumentado para 6,7-7,5 usando a mesma solução alcalina, as concentrações de bile e pancreatina foram ajustadas (10 g L⁻¹ e 1 g L⁻¹, respectivamente), e as amostras foram incubadas novamente a 37 °C por 2 horas sob agitação contínua (fase entérica II), atingindo 6 horas de análise. As contagens foram realizadas em alíquotas coletadas após 30 minutos, 2 horas, 4 horas e 6 horas. A partir das alíquotas coletadas, foram efetuadas três diluições decimais seriadas, possibilitando a contagem das colônias. De cada diluição, 1 mL foi inoculado em ágar LC e as placas foram incubadas em estufa à 27 °C, em anaerobiose, por 4 dias (Castele et al., 2006; Ravula & Shah, 1998). Os resultados obtidos foram expressos em log UFC g⁻¹.

2.5 Overrun e características nutricionais

O *overrun* foi calculado pela diferença entre o peso do sorvete e o peso da mistura dividida pelo volume da mistura, vezes 100 (Marshall, Goff & Hartel, 2003).

As análises para estimativa da composição nutricional em sorvete compreenderam a determinação de sólidos totais, cinzas, proteínas e gorduras. A determinação de sólidos totais foi realizada por evaporação de água a 105 °C e a determinação de cinzas, obtida por eliminação de matéria orgânica a 550 °C (AOAC, 2007). O percentual de proteínas foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2007) e o percentual de gorduras, obtido por extração a frio (Blig & Dyer, 1959).

Os resultados obtidos possibilitaram o cálculo da quantidade aproximada de carboidratos e do valor energético do produto, expresso em kcal 60 g⁻¹ (Mahan & Escott-Stump, 2004). Para o cálculo do valor energético, foram considerados os valores de 1,2 kcal g⁻¹ para inulina, 1,58 kcal g⁻¹ para oligofrutose e 1 kcal g⁻¹ para polidextrose, conforme informação descrita nas respectivas fichas técnicas.

2.5 Análises sensoriais

Os testes sensoriais foram conduzidos nas dependências do Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, em duas sessões, de acordo com métodos descritos por Lawless & Heymann (2010).

Em uma primeira sessão, os atributos aspecto, odor, sabor, cor e textura dos sorvetes foram avaliados segundo o teste de aceitação por escala hedônica estruturada verbal de sete pontos, contendo termos definidos situados entre “gostei muitíssimo” (7) e “desgostei muitíssimo” (1), e um ponto intermediário com o termo “não gostei, nem desgostei” (4). A possível frequência de consumo dos sorvetes foi estimada através de uma escala de atitude contendo termos definidos situados entre “comeria sempre” (7) e “nunca comeria” (1), e um ponto intermediário com o termo “comeria ocasionalmente” (4).

Em uma segunda sessão, as intensidades de gosto doce, gosto ácido e sabor característico de sorvete de morango foram analisadas através de uma escala não-estruturada de nove centímetros. Em seguida, os sorvetes foram avaliados segundo o teste de preferência por ordenação.

A equipe sensorial compreendeu 100 avaliadores não treinados igualmente divididos entre ambas as sessões. Destes, participaram da pesquisa 48 homens e 52 mulheres com escolaridade superior ao Ensino Médio, e em sua maioria, com idades entre 18 e 35 anos. Os avaliadores receberam cerca de 20 g de cada uma das amostras em copos plásticos codificados com números de três dígitos, alternados quanto à sua apresentação, e preencheram

as fichas de análise sensorial. O estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (CAAE 0145.0.243.000-11).

2.6 Análises estatísticas

O experimento foi independentemente reproduzido em três ocasiões e as análises foram realizadas em triplicata. As análises foram conduzidas durante os quinze dias seguintes à produção dos sorvetes, à exceção da contagem de *L. paracasei* Lpc-37 viáveis e determinação de pH e ácido láctico, realizadas imediatamente após a produção dos sorvetes e decorridos 30, 60 e 90 dias.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente em blocos inteiramente casualizados pela análise de variância e comparação das médias de pares de amostras pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%, utilizando o aplicativo Statistica 9.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA). Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Em exceção, os resultados do teste de preferência por ordenação foram analisados estatisticamente pela diferença entre as somas de pares de amostras, comparada ao valor estabelecido em tabela de Newell & Mac Farlene (Lawless & Heymann, 2010) e os resultados do teste de intenção de consumo, expressos em porcentagem, de acordo com a frequência das respostas (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

3 Resultados e discussão

3.1 Viabilidade de *L. paracasei* Lpc-37 em sorvete

As contagens obtidas de *L. paracasei* Lpc-37 viáveis em sorvete encontram-se na Tabela 1. O micro-organismo probiótico apresentou contagens iniciais entre 8,12 log UFC g⁻¹ em P e 8,17 log UFC g⁻¹ em PI e PO, sugerindo que inulina e oligofrutose estimularam seu crescimento inicial. Entretanto, *L. paracasei* Lpc-37 demonstrou estabilidade ao longo de 90 dias de armazenamento à -18 °C, mantendo contagens finais ao redor de 8 UFC g⁻¹ e estatisticamente iguais em sorvete probiótico e simbiótico.

Os resultados obtidos ultrapassam o limite mínimo de 6 a 7 log UFC g⁻¹, estabelecido mundialmente por distintos organismos, entre eles, a Federação Internacional de Laticínios, e garantem a conformidade destes produtos à parte dos requisitos para alegação de propriedade funcional (Shah, 2000; International Dairy Federation, 1992).

Kask et al. (2003) apontam para a viabilidade tecnológica da incorporação de cepas de *L. paracasei* em matrizes lácteas. Especialmente em sorvete, estudos revelaram que espécies de *Lactobacillus*, incluindo *L. rhamnosus* e *L. johnsonii*, mantêm índices de sobrevivência elevados ao longo do armazenamento deste produto (Alamprese, Foschino, Rossi, Pompei & Corti, 2005; Alamprese, Foschino, Rossi, Pompei & Savani, 2002).

Akalin & Erisir (2008) propõem o emprego de inulina e oligofrutose em produtos lácteos probióticos como alternativa para aumentar a viabilidade de micro-organismos probióticos nestas matrizes alimentícias, especialmente naquelas com teor reduzido de gorduras. Entretanto, inulina, oligofrutose e polidextrose mostraram-se dispensáveis à estabilidade de *L. paracasei* Lpc-37 ao longo do armazenamento dos sorvetes simbióticos, visto que após 90 dias, as contagens do micro-organismo nos sorvetes não diferiram significativamente entre si ($P < 0,05$).

3.2 pH e ácido láctico

Os índices de ácido láctico foram estatisticamente menores no primeiro dia, porém, não apresentaram diferença estatística entre as determinações subsequentes, conforme é possível verificar na Tabela 2. Os índices de ácido láctico foram estatisticamente maiores nos sorvetes P e PP a partir do 30º dia de armazenamento. Tal ocorrência confere com os valores de pH obtidos, que apresentaram médias gerais de $5,50 \pm 0,03^b$; $5,55 \pm 0,02^a$; $5,55 \pm 0,05^a$ e $5,50 \pm 0,01^b$ para os sorvetes P, PI, PO e PP, respectivamente.

Sorvetes probióticos normalmente mantêm um pH superior à 4,6, característico de leites fermentados, uma vez que são armazenados sob temperaturas baixas, minimizando as reações bioquímicas associadas à atividade microbiana (Cruz et al., 2011).

3.2 Sobrevivência de *L. paracasei* Lpc-37 às condições gastrointestinais simuladas

A Figura 1 representa a sobrevivência *in vitro* de *L. paracasei* Lpc-37 em sorvete submetido às condições gastrointestinais simuladas.

As contagens de *L. paracasei* Lpc-37 viáveis apresentaram redução de cerca de 4 log UFC g⁻¹ logo após 30 minutos de exposição à níveis de pH entre 1,4 e 1,9 e às concentrações de pepsina e lipase características do ambiente gástrico, sendo este declínio maior em sorvetes PO e PP. Uma redução das contagens de *L. paracasei* Lpc-37 também ocorreu após 4 h (240 min) de exposição às condições gastrointestinais simuladas. Contudo, parte destes micro-

organismos foi recuperada quando o pH aumentou para 6,7-7,5, decorridas 6 h (360 min) de ensaio. Resultados semelhantes, atribuídos a danos temporários de micro-organismos probióticos devido às condições de estresse pelo baixo pH, foram observados por vários autores para outras cepas bacterianas (Liserre et al., 2007; Buriti et al., 2010). Além disso, quando um micro-organismo é exposto à um estresse prévio, como a exposição às condições desfavoráveis de temperatura e pH, as células sobreviventes podem apresentar uma melhor tolerância à ambientes desfavoráveis posteriormente, como é o caso das condições adversas do trato gastrointestinal (Buriti et al., 2010).

L. paracasei Lpc-37 apresentou contagens médias entre 3,31 e 4,27 log UFC⁻¹ após 6 h (360 min) de exposição às condições gastrointestinais simuladas em sorvete, sendo que seus índices de sobrevivência foram maiores quando em presença de inulina e polidextrose. Estudos prévios sugerem que em produtos simbióticos, os prebióticos podem exercer uma atividade de proteção aos micro-organismos probióticos durante sua passagem pelo trato gastrointestinal (Donkor, Nilmini, Stolic, Vasiljevic & Shah, 2007). Embora não tenham apresentado efeito para a manutenção da viabilidade de *L. paracasei* Lpc-37 em sorvete durante armazenamento, inulina e polidextrose favoreceram a sobrevivência deste micro-organismo em condições de estresse.

Bertazzoni Minelli et al. (2004) também demonstram a alta resistência de cepas de *L. paracasei* ao estresse gastrointestinal e adicionalmente, constataram a sua capacidade de aderência às células do epitélio intestinal. A habilidade dos micro-organismos probióticos em sobreviver às condições gástricas e entéricas, para então colonizar o trato gastrointestinal, é considerada um biomarcador essencial para garantir os benefícios potenciais atribuídos ao consumo de produtos probióticos (Marzotto et al., 2006). Portanto, os resultados obtidos consistem em elementos significativos para a caracterização de *L. paracasei* Lpc-37 e ampliam o anseio voltado ao desenvolvimento de sorvetes simbióticos.

3.3. *Overrun e características nutricionais*

Os valores de *overrun* obtidos para os sorvetes P, PI, PO e PP foram de 64,40 ± 2,40; 60,06 ± 4,48; 61,77 ± 3,47 e 62,94 ± 2,13, respectivamente. As fibras solúveis estudadas não modificaram os valores de *overrun* nas condições às quais os sorvetes foram produzidos (P < 0,05). Resultados semelhantes foram relatados por Akalin & Erisir (2008), em sorvete simbiótico com 4% de oligofrutose, e M. B. Akin, M. S. Akin & Kirmaci (2007), em sorvete simbiótico com até 2% de inulina.

Entretanto, a adição de fibras solúveis aumentou a quantidade de sólidos totais, contribuindo para uma redução proporcional de gorduras nos sorvetes delas adicionados (Tabela 3). O percentual de carboidratos foi estimado em aproximadamente 22,18% para os sorvetes simbióticos e 25,41% para o sorvete probiótico. Os sorvetes adicionados de fibra dietética atingiram valores energéticos de em média 90 kcal 60 g⁻¹, enquanto o sorvete probiótico obteve aproximadamente 96 kcal 60 g⁻¹.

No Brasil, os sorvetes apresentam aproximadamente 8,1% de gorduras, enquanto nos EUA, devem igualar ou superar 10% (ABIS, 2012; FDA, 2011). Segundo classificação internacional, o sorvete com teor reduzido de gorduras é aquele que apresenta um mínimo de 25% de redução do teor de gorduras comparado ao produto referência e tal classificação permite que os sorvetes desenvolvidos integrem esta categoria (IDFA, 2012). O interesse do consumidor por produtos com um teor reduzido de gordura incentiva o emprego dessas substâncias nestes produtos, que deste modo, podem contribuir para a diminuição da incidência de doenças crônico-degenerativas (Devereux et al., 2003; Akalin et al., 2007).

3.4. Análises sensoriais

Os resultados obtidos para o teste de aceitação dos sorvetes desenvolvidos encontram-se na Tabela 4.

Tamime, Saarela, Korslindsøndergaard, Mistry & Shah (2005) e Akalin & Erisir (2008) indicam que sorvetes são veículos promissores para micro-organismos probióticos e sua presença nesse tipo de produto raramente compromete as suas características sensoriais. Os resultados obtidos reforçam esta afirmação, sendo que os sorvetes desenvolvidos apresentaram, para todos os atributos, escores que expressam o grau de aceitação entre “gostei” e “gostei muito”. A aceitação dos atributos cor e odor não diferiu significativamente entre as formulações ($P < 0,05$). Para o atributo textura, o sorvete PI destacou-se positivamente aos sorvetes P e PO. O destaque do sorvete PI manteve-se para os atributos aparência e sabor, para os quais este produto apresentou os maiores escores. Tais fatos conferem com relatos de Devereux et al. (2003), que demonstraram que a inulina, além de suas propriedades funcionais, proporciona efeitos favoráveis aos aspectos tecnológicos do produto, atuando como agente de textura.

Os maiores percentuais de respostas para a estimativa da frequência de consumo dos sorvetes ocorreram para a atitude “consumiria frequentemente”, à exceção do sorvete PO, que obteve maior percentual de respostas “comeria ocasionalmente” (Figura 2). Novamente, a

inulina apresentou destaque como ingrediente, sendo que o maior número de ocorrências para a atitude “consumiria frequentemente” foi para o sorvete PI (44%).

Mesmo que as respostas obtidas em laboratório pelos potenciais consumidores de sorvete probiótico e/ou simbiótico não reflitam exatamente suas atitudes reais de consumo, os resultados obtidos fornecem uma estimativa de sua intenção em consumir um produto probiótico e tal elemento é essencial ao considerar que os benefícios à saúde atribuídos à estes produtos dependem da regularidade de seu consumo.

No teste de preferência, as formulações não apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,05$). Em estudo semelhante sobre os efeitos de *L. paracasei* e inulina em *mousses*, não foram detectadas diferenças significativas para a preferência sensorial entre *mousses* de chocolate probióticos e simbióticos (Aragon-Alegro, Alegre, Cardarelli, Chiu, & Saad, 2007).

As médias obtidas para os graus de intensidade dos atributos gosto doce, gosto ácido e sabor característico de sorvete de morango também não apresentaram diferenças significativas entre os sorvetes (Figura 3). A capacidade edulcorante atribuída à oligofrutose mostrou-se negligenciável neste experimento. Esta e as demais fibras solúveis também apresentaram efeito nulo sobre o gosto ácido e sobre o sabor característico de sorvete de morango.

4. Conclusões

L. paracasei Lpc-37 apresentou resistência aos processos tecnológicos para obtenção de sorvete, estabilidade durante o período de armazenamento do produto e habilidade de resitência *in vitro* ao estresse gastrointestinal. Inulina e polidextrose desempenharam atividade protetora ao micro-organismo probiótico, elevando seus índices finais de sobrevivência *in vitro* às condições gastrointestinais simuladas. Os índices de ácido láctico mantiveram-se estáveis entre 30 e 90 dias de armazenamento do produto, sugerindo que após um período de adaptação às condições de armazenamento à 18 °C, a atividade metabólica de *L. paracasei* Lpc-37 foi praticamente nula. As fibras solúveis contribuíram para uma redução proporcional de gorduras nos sorvetes delas adicionados e conseqüente redução calórica. Efeitos aos atributos sensoriais, quando ocorreram, garantiram o destaque dos sorvetes adicionados de inulina, seguido daqueles adicionados de polidextrose. Entretanto, as fibras solúveis apresentaram efeito nulo sobre escolha de preferência e sobre a estimativa de intensidade de gosto doce, ácido e sabor característico de sorvete de morango.

Portanto, a inclusão de *L. paracasei* Lpc-37 em sorvete apresentou viabilidade tecnológica e condições para cumprir seu papel funcional no colón, estimada em ensaio *in*

vitro. Adicionalmente, inulina e polidextrose, conferiram melhorias sob os aspectos funcionais, nutricionais e sensoriais de sorvete simbiótico. Os resultados obtidos ampliam as possibilidades de desenvolvimento de alimentos funcionais, uma vez que os sorvetes desenvolvidos contemplam a demanda dos consumidores por produtos simultaneamente atrativos e saudáveis.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Ricsel Comercial Ltda., pelo fornecimento de oligofrutose e inulina, à Danisco S/A, pelo fornecimento de cultura liofilizada DVS de *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 e polidextrose, e ao Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais, pelo apoio financeiro.

Referências

ABIS (2012). Associação Brasileira das Indústrias de Sorvete. Brasil deve produzir mais de 1 bilhão de litros em 2010. < http://www.abis.com.br/noticias_2010_3.html>.

Akalin, A. S. & Erisir, D. (2008). Effects of inulin and oligofrutose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic ice cream. *J Food Sci*, 73, 4, 2008.

Akalin, A. S., Gönç, S., Ünal, G. & Fenderya, S. (2007). Effects of fructooligosaccharide and whey protein concentrate on the viability of starter culture in reduced probiotic yogurt during storage. *J Food Sci*, 72, 222-227.

Akin, M. B., Akin, M. S., Kirmaci, Z. (2007). 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 Chem*, 104, 93-99.

Alamprese, C., Foschino, R., Rossi, M., Pompei, C. & Corti, S. (2005). Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG addition in ice cream. *Int J Dairy Technol*, 58, 200-206.

Alamprese, C., Foschino, R., Rossi, M., Pompei, C. & Savani, L. (2002). Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and influence of its addition in retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentrations. *Int Dairy J*, 12, 201-208.

AOAC. (2007). Association Of Official Analytical Chemists International. *Official Methods of Analysis of AOAC International* (18th ed.). Gaithersburg: AOAC International.

Aragon-Alegro, L. C., Alegro, J. H. A., Cardarelli, H. R. C., Chiu, M. C., Saad, S. M. I. (2007). Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. *LWT Food Sci Techy*, 40, 669-675.

Bertazzoni Minelli, E., Benini, A., Marzotto, M., Sbarbati, A., Ruzzenente, O., Ferrario, R., Hendriks, H. & Dellaglio, F. (2004). Assessment of novel probiotic *Lb. casei* strains for the production of functional dairy foods. *Int Dairy J*, 14, 723-736.

Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 27, 911-917.

Buriti, F. C. A., Castro, I. A. & Saad, S. M. I. (2010). Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *Int J Food Microbiol*, 137, 121-129.

Castele, S. Van De, Vanheuverzwijn, T., Ruysen, T., Assche, P. Van, Swings, J. & Huys, G. (2006). Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. *Int Dairy J*, 16, 1470-1476.

Chiu, C. H., Lu, T. Y., Tseng, Y. Y. & Pan, T. M. (2006). The effects of *Lactobacillus*-fermented milk on lipid metabolism in hamsters fed on high-cholesterol diet. *Appl Microbiol Biot*, 71, 238-245, 2006.

Christiansen, P. S., Edelsten, D., Kristiansen, J. R. & Nielsen, E. W. (1996). Some properties of ice cream containing *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus*. *Milchwissenschaft*, 51, 502-504.

Craig, S. A. S., Holden, J. F., Khaled, M. Y. (2000). Determination of polydextrose as dietary fiber in foods. *JAOAC Int*, 83, 1006-1012.

Cruz, A. G., Antunes, A. E. C., Arami, J. B., Sousa, A. L. O. P., Faria, J. A. F. & Saad, S. M. I. (2011). 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*, (pp. 359-388). São Paulo: Livraria Varela.

Cruz, A. G., Antunes, A. E. C., Sousa, A. L. O. P., Faria, J. A. F. & Saad, S. M. I. (2009). Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food Res Int*, v. 42, p. 1233-1239.

Devereux, H. M., Jones, G. P., McCormack, L., Hunter, W. C. (2003). Consumer acceptability of low fat foods containing inulin and oligofructose. *J Food Sci*, 68, 1850-1854.

Donkor, O. N., Nilmini, S. L. I., Stolic, P., Vasiljevic, T. & Shah, N. P. (2007) Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. *Int Dairy J*, 17, 657-665.

FAO/WHO. (2001). Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. *Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria*. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf>.

FDA. (2001). Food and Drug Administration. *Code of Federal Regulations: frozen desserts*. <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=135.110>>.

Foschino, R., Beretta, C. & Ottogalli, G. (1992). Studio delle condizioni ottimali di congelamento e scongelamento di colture lattiche termofile. *L'industria del Latte*, v. 28, p. 49-67, 1992.

Franck, A. (2002). Technological functionality of inulin and oligofructose. *Brit J Nutr*, 87, S287-S291.

Gibson, G. R. & Rastall, R. A. (2006). *Prebiotics: Development & application*. England: John Wiley & Sons Ltd.

Gibson, G. R. & Roberfroid, M. B. (2008). *Handbook of prebiotics*. Boca Raton, CRC Press.
Homayouni, A., Ehsani, M. R., Azizi, A., Razavi, S. H. & Yarmand, M. S. (2007). An introduction to functional dairy foods. In: *Proceedings of the First National Functional Food Congress*, p. 60.

IAL. (2008). Instituto Adolfo Lutz. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz.

IDF. (1992). International Dairy Federation. *General standard of identify for fermented milks*. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.

IDFA. (2012). International Dairy Foods Association. *Ice cream labeling*. <<http://www.idfa.org/news--views/media-kits/ice-cream/ice-cream-labeling/>>.

Kailasapathy, K. & Sultana, K. (2003). Survival and b-galactosidase activity of encapsulated and free *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in ice-cream. *Aust J Dairy Technol*, 58, 223-227.

Kask, S., Adamberg, K, Orłowski, A, Vogensen, F. K., Moller, P. L., Ardö, Y. & Paalme, T. (2003). Physiological properties of *Lactobacillus paracasei*, *L. danicus* and *L. curvatus* strains isolated from Estonian semi-hard cheese. *Food Res Int*, 36, 1037-1046.

Lawless, H. T. & Heymann, H. (2010). *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices* (2nd ed.). London: Springer.

Liserre, A. M., Ré, M. I. & Franco, B. D. G. M. (2007). Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Biotechnol*, 21, 1-16.

Mahan & Escott-Stump (2004). *Krause's food, nutrition, & diet therapy*. (11th ed.) Philadelphia: Saunders Publishing.

- Marshall, R. T., Goff, H. D. & Hartel, R. W. (2003). *Ice cream*. (6th ed.). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Mathara, J. M., Schillinger, U., Guigas, C., Franz, C., Kutima, P. M., Mbugua, S. K., Shin, H. K. & Holzapfel, W. H. (2008). Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. *Int J Food Microbiol*, 126, 57-64.
- Marzotto, M., Maffei, C., Paternoster, T., Ferrario, R., Rizzotti, L., Pellegrino, M., Dellaglio, F. & Torriani, S. (2006). *Lactobacillus paracasei* A survives gastrointestinal passage and affects the fecal microbiota of healthy infants. *Res Microbiol*, 157, 857-866.
- Medici, M., Vinderola, C. G. & Perdigon, G. (2004). Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresco cheese. *Int Dairy J*, 14, 611-618.
- Niness, K. R. (1999). Inulin and oligofructose: what are they? *J Nutr*, 129, 1402-1406.
- Papademas, P. & Bintsis, T. (2002). Microbiology of ice cream and related products. In: Robinson, R. K. (Eds.), *Dairy microbiology handbook* (3rd ed., pp. 213-260). New York: Wiley Inter-Science.
- Puupponen-Pimiä, R., Aura, A. M., Oksman-Caldentey, K. M., Myllärinen, P., Saarela, M., Mattila-Sanholm, T. & Poutanen, K. (2002). Development of functional ingredients for gut health. *Trends Food Sci Tech*, 13, 3-11.
- Raninen, K., Lappi, J., Mykkänen, H. & Poutanen, K. (2011). Dietary fiber type reflects physiological functionality: comparison of grain fiber, inulin, and polydextrose. *Nutr Rev*, 69, 9-21.
- Ravula, R. R. & Shah, N. P. (1998). Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yoghurts and fermented milk drinks. *Biotechnol Tech*, 12, 819-822.
- Schillinger, U., Guigas, C. & Holzapfel, W. H. (2005). In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *Int Dairy J*, 15, 1289-1297.

Shah, N. P. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *J Dairy Sci*, 83, 894-907.

Tamime, A. Y., Saarela, M., Korslindsøndergaard, A., Mistry, V. V. & Shah, N. P. (2005). Production and maintenance of viability of probiotic micro-organisms in dairy products. In: Tamime, A. (Ed.), *Probiotic dairy products: society of dairy technology*, (p.39-72). Oxford, Ames: Blackwell.

Vinderola, G. Prosello, W. Molinari, F. Ghiberto, D. & Reinheimer, J. (2009). Growth of *Lactobacillus paracasei* A13 in Argentinian probiotic cheese and its impact on the characteristics of the product. *Int J Food Microbiol*, 135, 171-174.

Tabela 1 – Contagens de *L. paracasei* Lpc-37 viáveis (log UFC g⁻¹) em sorvete durante armazenamento à -18 °C.

Sorvete	1º dia	30º dia	60º dia	90º dia
P	8,12 ± 0,02 ^{Bc}	8,19 ± 0,01 ^{Aa}	8,20 ± 0,01 ^{Aa}	8,17 ± 0,00 ^{Ab}
PI	8,17 ± 0,03 ^{Aa}	8,19 ± 0,04 ^{Aa}	8,14 ± 0,03 ^{Ba}	8,15 ± 0,01 ^{Aa}
PO	8,17 ± 0,02 ^{Aa}	8,15 ± 0,05 ^{Aa}	8,16 ± 0,02 ^{ABa}	8,14 ± 0,02 ^{Aa}
PP	8,14 ± 0,01 ^{ABb}	8,19 ± 0,00 ^{Aa}	8,09 ± 0,09 ^{Bb}	8,16 ± 0,02 ^{Aab}

P = sorvete probiótico; PI = sorvete simbiótico, com inulina; PO = sorvete simbiótico, com oligofrutose; PP = sorvete simbiótico, com polidextrose. ^{AB} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes em mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Duncan (P < 0,05). ^{abc} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes em mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de Duncan (P < 0,05).

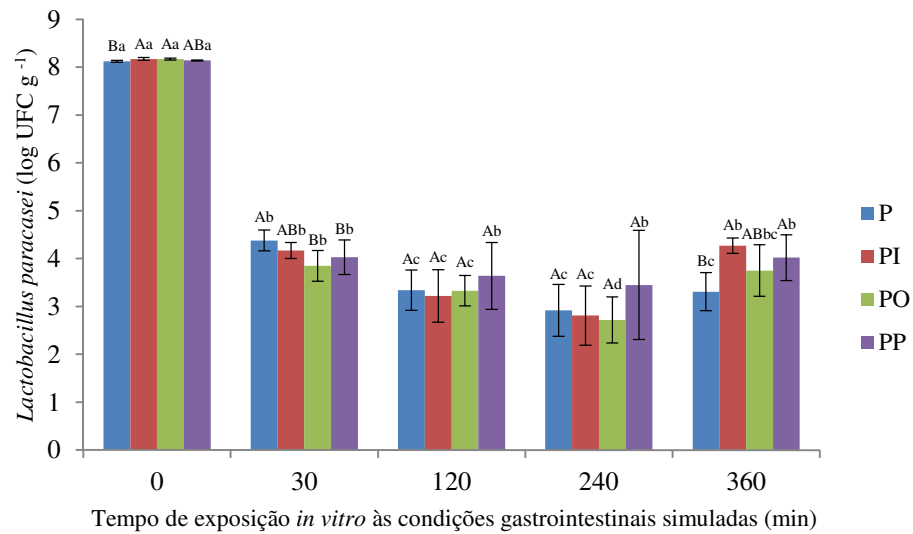


Figura 1 – Sobrevivência de *L. paracasei* Lpc-37 (log UFC g⁻¹) em sorvete antes e durante exposição *in vitro* às condições gastrointestinais simuladas por 30, 120, 240 e 360 minutos. P = sorvete probiótico; PI = sorvete simbiótico, com inulina; PO = sorvete simbiótico, com oligofrutose; PP = sorvete simbiótico, com povidexrose. ^{AB} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes para o mesmo tempo diferem estatisticamente pelo teste de Duncan (P < 0,05). ^{abcd} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes para o mesmo sorvete diferem estatisticamente pelo teste de Duncan (P < 0,05).

Tabela 2 – Índices de ácido láctico (%) em sorvetes probiótico e simbióticos durante armazenamento à -18 °C.

Sorvete	1º dia	30º dia	60º dia	90º dia
P	0,40 ± 0,02 ^{Ab}	0,43 ± 0,02 ^{Aa}	0,43 ± 0,02 ^{Aa}	0,42 ± 0,01 ^{Aa}
PI	0,35 ± 0,01 ^{Cb}	0,38 ± 0,02 ^{Ba}	0,38 ± 0,01 ^{Ba}	0,39 ± 0,01 ^{Ca}
PO	0,34 ± 0,01 ^{Cb}	0,39 ± 0,02 ^{Ba}	0,39 ± 0,01 ^{Ba}	0,40 ± 0,01 ^{Ba}
PP	0,38 ± 0,01 ^{Bb}	0,42 ± 0,02 ^{Aa}	0,42 ± 0,01 ^{Aa}	0,42 ± 0,01 ^{Aa}

P = sorvete probiótico; PI = sorvete simbiótico, com inulina; PO = sorvete simbiótico, com oligofrutose; PP = sorvete simbiótico, com polidextrose. ^{ABC} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes em mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Duncan (P < 0,05). ^{ab} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes em mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de Duncan (P < 0,05).

Tabela 3 – Composição nutricional (%) em sorvetes probiótico e simbióticos.

Sorvete	Sólidos totais (%)	Gorduras (%)	Proteínas (%)	Cinzas (%)
P	35,27 ± 0,16 ^b	4,65 ± 0,14 ^a	4,20 ± 0,01 ^a	1,01 ± 0,01 ^a
PI	38,20 ± 0,04 ^a	4,07 ± 0,04 ^b	4,03 ± 0,00 ^a	0,93 ± 0,02 ^b
PO	38,23 ± 0,07 ^a	4,06 ± 0,00 ^b	4,00 ± 0,16 ^a	0,91 ± 0,03 ^b
PP	38,28 ± 0,01 ^a	4,07 ± 0,04 ^b	4,03 ± 0,15 ^a	0,92 ± 0,01 ^b

P = sorvete probiótico; PI = sorvete simbiótico, com inulina; PO = sorvete simbiótico, com oligofrutose; PP = sorvete simbiótico, com povidexrose. ^{ab} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes em mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Duncan (P < 0,05).

Tabela 4 – Graus de aceitação atribuídos aos atributos sensoriais de sorvetes probiótico e simbióticos.

Sorvete	Aparência	Cor	Odor	Sabor	Textura
P	5,44 ^{ab}	5,36 ^a	5,14 ^a	5,38 ^{ab}	5,18 ^b
PI	5,84 ^a	5,50 ^a	5,28 ^a	5,66 ^a	5,82 ^a
PO	5,28 ^b	5,22 ^a	5,20 ^a	5,10 ^b	5,08 ^b
PP	5,36 ^b	5,20 ^a	5,12 ^a	5,68 ^a	5,54 ^{ab}

P = sorvete probiótico; PI = sorvete simbiótico, com inulina; PO = sorvete simbiótico, com oligofrutose; PP = sorvete simbiótico, com povidexrose. ^{ab} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes em mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

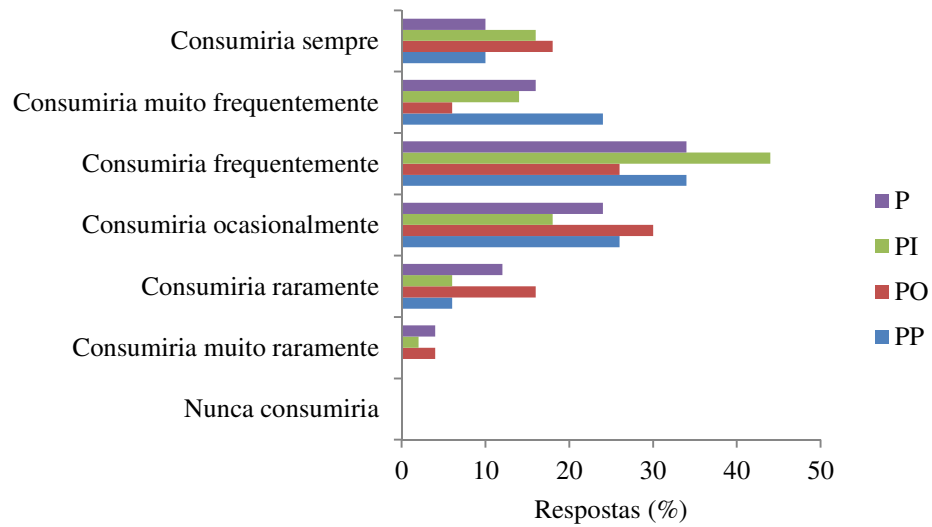


Figura 2 – Estimativa da frequência de consumo de sorvetes probiótico e simbióticos. P = sorvete probiótico; PI = sorvete simbiótico, com inulina; PO = sorvete simbiótico, com oligofrutose; PP = sorvete simbiótico, com polidextrose.

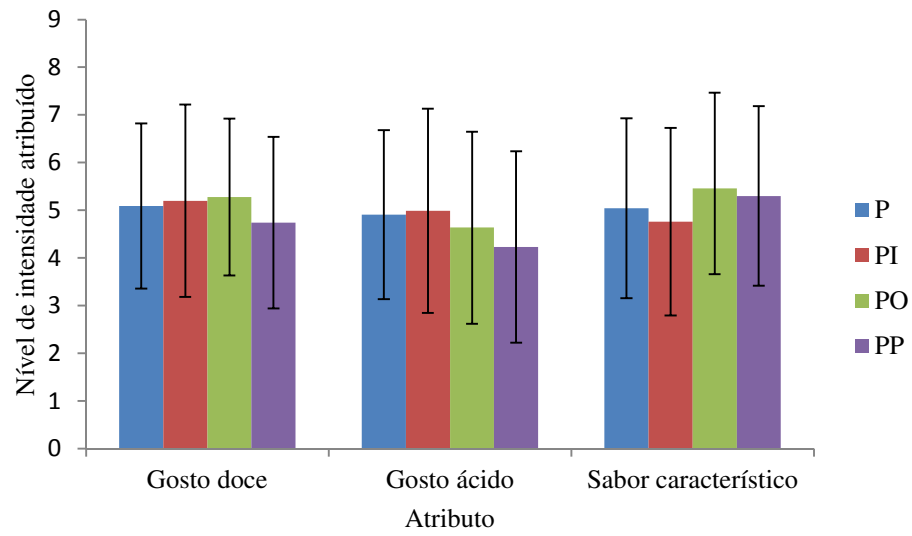


Figura 3 – Índices de intensidade de gosto doce, gosto ácido e sabor característico de sorvete de morango em sorvetes probiótico e simbióticos. P = sorvete probiótico; PI = sorvete simbiótico com inulina; PO = sorvete simbiótico com oligofrutose; PP = sorvete simbiótico com povidexose.

5 CONCLUSÕES

L. paracasei Lpc-37 apresentou resistência aos processos tecnológicos para obtenção de sorvete e estabilidade durante o período de armazenamento deste produto, mantendo contagens elevadas em sorvete probiótico e simbiótico.

Os índices de ácido láctico não apresentaram diferença estatística em determinações subsequentes ao 30º dia, sugerindo que após um período de adaptação às condições de armazenamento à 18 °C, a atividade metabólica de *L. paracasei* Lpc-37 foi praticamente nula.

L. paracasei Lpc-37 demonstrou satisfatória habilidade de resistência ao estresse celular desencadeado pelos níveis de pH, sais biliares e enzimas característicos do trato gastrointestinal. Nestas condições, sua sobrevivência foi estatisticamente superior em sorvetes simbióticos incluídos de inulina e polidextrose, comparada à sua sobrevivência em sorvete probiótico, demonstrando que estas fibras solúveis podem desempenhar atividade protetora ao micro-organismo probiótico durante sua passagem pelo trato gastrointestinal.

Inulina, oligofrutose e polidextrose não modificaram os valores de *overrun* nas condições às quais os sorvetes foram produzidos. Entretanto, as mesmas fibras solúveis aprimoraram as características nutricionais de sorvete simbiótico, contribuindo para uma redução proporcional do teor de gorduras nos sorvetes delas adicionados e consequente redução calórica. Os percentuais de gorduras obtidos para os sorvetes produzidos garantem que estes integrem a categoria dos sorvetes com teor reduzido de gorduras, e tal fato pode aumentar o apelo comercial para estes produtos.

Os sorvetes desenvolvidos apresentaram graus de aceitação satisfatórios para os atributos aparência, cor, odor, sabor e textura, demonstrando *L. paracasei* Lpc-37 e as fibras solúveis inulina, oligofrutose e polidextrose não apresentaram efeito negativo à estas características. Percebeu-se ainda, uma melhoria significativa na aceitação do atributo textura do sorvete simbiótico com inulina em relação aos sorvetes probiótico e simbiótico com oligofrutose. Entretanto, as fibras solúveis apresentaram efeito nulo sobre escolha de preferência e sobre a estimativa de intensidade de gosto doce, ácido e sabor característico de sorvete de morango.

A inclusão de *L. paracasei* Lpc-37 em sorvete apresentou viabilidade tecnológica e condições para cumprir seu papel funcional no colón, estimada em ensaio *in vitro*. Adicionalmente, inulina e polidextrose, conferiram melhorias sob os aspectos funcionais,

nutricionais e sensoriais de sorvete simbiótico. Os resultados obtidos ampliam as possibilidades de desenvolvimento de alimentos funcionais, uma vez que os sorvetes desenvolvidos contemplam com a demanda dos consumidores por produtos simultaneamente atrativos e saudáveis.

Estudos dirigidos a períodos de armazenamento superiores e pesquisas sobre a influência de *L. paracasei* Lpc-37 e fibras solúveis em características reológicas, tais como, viscosidade, firmeza e índice de derretimento, poderão ser conduzidos em longo prazo, buscando o desenvolvimento de sorvetes simbióticos compatíveis com a legislação específica e que apresentem características aceitáveis por seus possíveis consumidores.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, R. Probiotics: an emerging food supplement with health benefits. **Food Biotechnology**, v. 19, p. 227-46, 2005.

AKALIN, A. S.; GÖNÇ, S.; ÜNAL, G.; FENDERYA, S. Effects of fructooligosaccharide and whey protein concentrate on the viability of starter culture in reduced probiotic yogurt during storage. **Journal of Food Science**, v. 72 p. 222-227, 2007.

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, p. 93-99, 2007.

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

ANDERSON J. W.; BAIRD, P.; DAVIS, R. H., FERRERI, A.; KNUDTSON, M.; KORAYM, A.; WATERS, V.; WILLIAMS, C. L. Health benefits of dietary fiber. **Nutrition Reviews**, v. 67, p.188-205, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE SORVETES. Brasil deve produzir mais de 1 bilhão de litros em 2010. São Paulo, 2010. Disponível em: <http://www.abis.com.br/noticias_2010_3.html> Acesso em: 06 fev. 2012.

BENEO-ORAFI. **Nutritivo e saboroso de uma maneira natural**. Disponível em: <http://www.orafti.com/administration/views/html/fckuserfiles/brochure_PO.pdf> Acesso em 06 fev. 2012.

BERGEY, D. H. & HOLT, J. G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Lippincott Williams & Wilkins, 1994.

BERTAZZONI MINELLI, E.; BENINI, A.; MARZOTTO, M.; SBARBATI, A.; RUZZENENTE, O.; FERRARIO, R.; HENDRIKS, H.; DELLAGLIO, F. Assessment of novel probiotic *Lb. casei* strains for the production of functional dairy foods. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 723-736, 2004.

BRASIL. **Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 06 jun. 2012.

BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada n. 266, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para gelados comestíveis e preparados para gelados comestíveis. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 set. 2005.

BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada n. 359, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 dez. 2003.

BUDDINGTON, R. Using probiotics and prebiotics to manage the gastrointestinal tract ecosystem. In: CHARALAMPOPOULOS, D. & RASTALL, R. A. (Org.). **Prebiotics and probiotics science and technology**. v.1. New York: Springer, 2009. cap. 1, p.1-32.

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

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

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

CHIU, C. H.; LU, T. Y.; TSENG, Y. Y.; PAN, T. M. The effects of *Lactobacillus*-fermented milk on lipid metabolism in hamsters fed on high-cholesterol diet. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 238-245, 2006.

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

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

CRITTENDEN, R. G. & PLAYNE, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p.353-361, 1996.

CRUZ, A. G.; ANTUNES, A. E. C.; ARAMI, 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. (Org.). **Probióticos e prebióticos em alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas**. São Paulo: Livraria 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, p. 1233-1239, 2009.

CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. Gastrointestinal effects of prebiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 87, p. S145-S151, 2002.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

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

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf> Acesso em: 06 fev. 2012.

FERREIRA, C. L. L. F. Benefícios das culturas lácticas probióticas. In: OLIVEIRA, M. N. (Org.). **Tecnologia de produtos lácteos funcionais**. São Paulo: Atheneu Editora, 2009. cap. 6, p. 213-234.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Probiotics**. New York, 2004. Disponível em: <http://www.webdietitians.org/Public/GovernmentAffairs/92_adap1099.cfm>. Acesso em 06 fev. 2012.

FOSCHINO, R.; BERETTA, C.; OTTOGALLI, G. Studio delle condizioni ottimali di congelamento e scongelamento di colture lattiche termofile. **L'industria del Latte**, v. 28, p. 49-67, 1992.

FRANCK, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**, v. 87, p. S287-S291, 2002.

FRANZ, C. M. A. P.; CHO, C. S.; HOLZAPFEL, W. H. Probiotics: Taxonomy and Technological Features. In: SHAH, N. P.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. (Org.). **Probiotic and prebiotic foods: technology, stability and benefits to human health**. New York: Nova Science Publishers, 2011. p.1-23.

GIBSON, G. R. & RASTALL, R. A. **Prebiotics: development & application**. England: John Wiley & Sons Ltd., 2006.

GIBSON, G. R. & ROBERFROID, M. B. **Handbook of prebiotics**. Boca Raton: CRC Press, 2008.

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

GOMES, A. M. P. & MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Food Science and Technology**, v.10, p.139-157, 1999.

GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; SHAH, N. P. Probiotic Dairy Products as Functional Foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, 2010.

HOMAYOUNI, A.; EHSANI, M. R.; AZIZI, A.; RAZAVI, S. H.; YARMAND, M. S. An introduction to functional dairy foods. In: **Proceedings of the First National Functional Food Congress**, p. 60, 2007.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes: proposed definition of dietary fiber**. Washington: National Academies Press, 2001.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **General standard of identify for fermented milks**. Brussels, Belgium: International Dairy Federation, 1992.

KAILASAPATHY, K. & SULTANA, K. Survival and β -galactosidase activity of encapsulated and free *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in ice-cream. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, p. 223-227, 2003.

KASK, S.; ADAMBERG, K; ORLOWSKI, A; VOGENSEN; F. K.; MOLLER, P. L.; ARDÖ, Y.; PAALME, T. Physiological properties of *Lactobacillus paracasei*, *L. danicus* and *L. curvatus* strains isolated from Estonian semi-hard cheese. **Food Research International**, v. 36, p. 1037-1046, 2003.

KAUR, N. & GUPTA, A. K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **Journal of Biosciences**, v. 27, p. 703-714, 2002.

LAGO, C. C.; BERNSTEIN, A.; BRANDELLI, A.; NOREÑA, C. Z. Characterization of powdered yacon (*Smallanthus sonchifolius*) juice and pulp. **Food and Bioprocess Technology**, 2011.

LERAYER, A. L. S.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I.; VIALTA, A. Culturas lácticas e probióticas: identificação, classificação, detecção e aplicação tecnológica. In: OLIVEIRA, M. N. (Org.). **Tecnologia de produtos lácteos funcionais**. São Paulo: Atheneu Editora, 2009. cap. 4, p. 125-186.

LIN, F. M.; CHIU, C. H.; PAN, T. M. Fermentation of milk-soymilk and Lycium chinense Miller mixture using a new isolate of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU101 and *Bifidobacterium longum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 559-564, 2004.

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

MATHARA, J. M.; SCHILLINGER, U.; GUIGAS, C.; FRANZ, C.; KUTIMA, P. M.; MBUGUA, S. K.; SHIN, H. K.; HOLZAPFEL, W. H. Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 57-64, 2008.

MEDICI, M.; VINDEROLA, C. G.; PERDIGÓN, G. Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresco cheese. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 611-618, 2004.

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

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

ODRÓÑEZ PEREDA, J. A. **Tecnologia de Alimentos: Componentes dos Alimentos e Processos**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

OLIVEIRA, M. N. & PENNA, A. L. B. Prebióticos. In: OLIVEIRA, M. N. (Org.). **Tecnologia de produtos lácteos funcionais**. São Paulo: Atheneu Editora, 2009. cap. 7, p. 235-248.

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

PERELMUTER, K.; FRAGA, M.; ZUNINO, P. In vitro activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.1718-1725, 2008.

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

RACHMILEWITZ, D.; KATAKURA, K.; KARMELI, F.; HAYASHI, T.; REINUS, C.; RUDENSKY, B.; AKIRA, S.; TAKEDA, K.; LEE, J.; TAKABAYASHI, K.; RAZ, E. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects probiotics in murine experimental colitis. **Gastroenterology**, v.126, p.520-528, 2004.

RANINEN, K.; LAPPI, J.; MYKKÄNEN, H.; POUTANEN, K. Dietary fiber type reflects physiological functionality: comparison of grain fiber, inulin, and polydextrose. **Nutrition Reviews**, v. 69, n. 1, p. 9-21, 2011.

ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, Rome, v. 34, p. S105-S110, 2002.

ROBINSON, R. K. **Microbiology of frozen foods**. London, U. K.: Elsevier Applied Science Publishers, 1985.

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. (Org.). **Probióticos e prebióticos em alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas**. São Paulo: Livraria Varela, 2011. cap 15, p. 359-388.

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.

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

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

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3.ed. Varela, 2007.

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

VINDEROLA, G. PROSELLO, W. MOLINARI, F. GHIBERTO, D. REINHEIMER, J. Growth of *Lactobacillus paracasei* A13 in Argentinian probiotic cheese and its impact on the characteristics of the product. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p.171-174, 2009.

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

WANG, X. & GIBSON, G. R. Effects of the *in vivo* fermentation of oligofrutose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. **Journal of Applied Bacteriology**, v.75, p.373-380, 1998.

ZHONG, J., LUO, B. XIANG, M., LIU, H., ZHAI, Z.,WANG,T. & CRAIG, S.A.S. Studies on the effects of polydextrose intake on physiologic functions in Chinese people. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 6, p. 1503-1509, 2000.

APÊNDICES

Apêndice A – Ficha de análise sensorial para teste de aceitação e teste de intenção de consumo.

ANÁLISE SENSORIAL DE SORVETE

Data: / /

Sexo: () Masculino () Feminino

Idade: () 18-25 () 26-35 () 36-45 () Acima de 45

Grau de Instrução: () Ensino Fundamental () Ensino Médio () Superior Incompleto
() Superior Completo () Pós-Graduação

AMOSTRA 745

Você está recebendo uma amostra de sorvete codificada. Avalie cada atributo segundo o grau de gostar ou desgostar, marcando um "x" na escala abaixo:

	Aparência	Cor	Odor	Sabor	Textura
Gostei muitíssimo					
Gostei muito					
Gostei					
Indiferente					
Desgostei					
Desgostei muito					
Desgostei muitíssimo					

Avalie também, segundo sua intenção de consumo, marcando um "x" na escala abaixo:

Consumiria sempre
Consumiria muito frequentemente
Consumiria frequentemente
Consumiria ocasionalmente
Consumiria raramente
Consumiria muito raramente
Nunca consumiria

Apêndice B – Ficha de análise sensorial para teste de intensidade de gosto e sabor e teste de preferência.

ANÁLISE SENSORIAL DE SORVETE

Data: / /

Sexo: () Masculino () Feminino

Idade: () 18-25 () 26-35 () 36-45 () Acima de 45

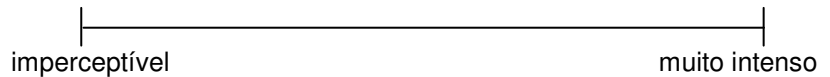
Grau de Instrução: () Ensino Fundamental () Ensino Médio () Superior Incompleto

() Superior Completo () Pós-Graduação

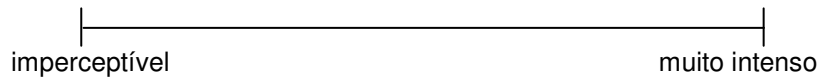
Você está recebendo quatro amostras de sorvete codificadas. Avalie cada uma segundo a intensidade do atributo específico, marcando um traço vertical na escala abaixo:

AMOSTRA 213

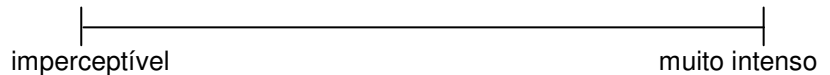
Gosto doce



Gosto ácido ou sabor característico de iogurte de morango



Sabor característico de sorvete de morango



Agora, avalie as quatro amostras em ordem crescente de preferência:

.....
(1)
mais preferida

.....
(2)

.....
(3)

.....
(4)
menos preferida

ANEXOS

Anexo A – Guia para submissão de *papers* ao periódico *International Dairy Journal*.

Guide for Authors



Introduction

International Dairy Journal publishes original, refereed research papers and critical reviews that advance scientific knowledge of all aspects of dairy science and technology. Within this scope, the journal pays particular attention to applied research and its interface with the dairy and food industries.

The journal provides a platform for the communication of research in dairy science that is of significant relevance to the broader international community, including the research and development of dairy and allied products from milk of bovine and non-bovine species. The journal's coverage includes:

- Biosynthesis, chemistry and physico-chemical properties of milk constituents
- Microbiology, enzymology, biotechnology and bioengineering
- Dairy engineering and new developments in processing
- Relevant emulsion science, food structure and texture
- Raw material quality and effect on relevant products
- Flavour and off-flavour development
- Product development and usage of dairy ingredients in other foods
- Relevant sensory science/consumer studies
- Analytical techniques
- Nutritional and human health implications of milk components or dairy products

International Dairy Journal does not publish papers related to milk production, feeding, cow health and other aspects of on-farm milk production, unless there is a clear relationship to dairy technology, human health or final product quality.

Types of paper

Original full-length research papers should contain material that has not been previously published elsewhere, except in a preliminary form. These papers should not exceed 6000-8000 words (text and references) or about 25 manuscript pages.

Review papers will be accepted in areas of topical interest and will normally emphasise literature published over the previous five years.

Short Communications are research papers constituting a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to literature, and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 2,000 words or about 8 manuscript pages, including figures, tables and references. They will be reviewed in the same way as research papers.

Letters to the Editor are published from time to time on subjects of topical interest.

Book reviews are commissioned by the Editors as warranted. Unsolicited book reviews are generally not considered.

Submission of Revised Papers

Revised papers received more than three months after reviewers' comments were sent may be treated as new submissions, at the discretion of the Editor. If the author has not replied to reminders/enquiries about revisions within 6 months, the paper will be considered to have lapsed, and any subsequent submission will be treated as a new submission and must be submitted to the journal using the above process, addressed to the Editor-in-Chief, with an explanation that it had previously been submitted to the journal.

Questions regarding content of a proposed submission can be directed to the Editor-in-Chief:

International Dairy Journal
c/o Professor P. Jelen, Editor-in-Chief
University of Alberta
Alberta, Canada
E-mail: idx.jelen@interbaun.com

Contact details for submission

Submission of all types of manuscripts to *International Dairy Journal* proceeds totally online. Via the Elsevier Editorial System (EES) website for this journal (<http://ees.elsevier.com/inda>) you will be guided step-by-step through the creation and uploading of the various files.

Page charges

This journal has no page charges.



Before You Begin

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Plagiarism and Ethical Concerns

By submitting this manuscript, the authors agree that text, equations, or figures from previously published articles or books have been clearly identified in full and their origin clearly explained in the adjacent text, with appropriate references given at the end of the paper. Duplication of text is rarely justified, even with diligent referencing. Exceptions may be made for descriptions of standard experimental techniques, or other standard methods used by the author in the investigation; but an appropriate citation is preferable. Authors who duplicate material from their own published work in a new article, without clearly identifying the repeated material and its source as outlined above, are self-plagiarising.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans* <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; *EU Directive 2010/63/EU for animal experiments* http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors

of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Authors are strongly advised that papers not conforming to the required standards will be rejected without review.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the

article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail. Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

It is the journal's policy to keep the peer review process anonymous. The name of a reviewer will only be revealed with the approval of the reviewer. When submitting a manuscript, authors may indicate names of experts who are not suitable/appropriate for reviewing the paper.



Preparation

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

All pages of the manuscript must be numbered. All lines must be numbered continuously throughout the manuscript.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Conclusions must not reiterate any discussion or introductory comments, they must be genuine conclusions drawn from the results of the study.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in

appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract should not exceed 150 words.

Units and Abbreviations

System International (SI) units must be used. You may wish to consult the website of the Bureau International des Poids et Mesures for guidance, <http://www1.bipm.org/en/si>.

Abbreviations for units should follow British Standards Institute standard *SI units and recommendations for the use of their multiples and of certain other units* (BS ISO 1000:1992, supersedes BS 5555). Further information is available on the BSI website <http://www.bsi-global.com>. The unit 'litre' must be abbreviated as 'L' (also mL, μ L, etc.). Use the negative index system for all combinations of unit abbreviations (e.g. g mL^{-1} , not g/mL). However, the solidus can be used in cases of % w/w or % w/v. The unit billion (10^9 in America, 10^{12} in Europe) must not be used as it is ambiguous. Temperatures should be given in degrees Celsius (e.g. 37 °C).

In general, the journal follows the conventions of the *CBE Style Manual* (Council of Biology Editors, Bethesda, MD, 1983, 5th edn). Follow *Chemical Abstracts* and its indexes for chemical names. Enzyme nomenclature should follow the IUBMB Enzyme Commission recommendations (<http://www.chem.qmul.ac.uk/enzyme/>) (relevant EC numbers should be given). Standard abbreviations of units of measurement should be used to identify the data. Please ensure that all figures have axes labelled properly, and the quantities on the axes specify the units used (use the negative index system, e.g. g mL^{-1} , not g/mL). Tables should not duplicate results presented in the manuscript as a different form (e.g. in graphs).

Abbreviations should be defined in brackets after their first mention in the text. Standard units of measurements and chemical symbols of elements may be used without definition in the body of the paper.

Milk is considered to be a "mass" or "non-countable" noun. Other such examples are ice, rice, wool, air, oxygen, weather, furniture, traffic, advice, sunshine, harm and so on. These nouns can be preceded by some, any, enough, this, that, and much. It is appropriate to precede these nouns with a definite or indefinite article - for example, the sunshine, the ice - but they frequently appear with no article. As milk is considered to be a non-countable noun, it is generally grammatically incorrect to use the term milks, except in some limited uses. What is generally "counted" are the samples or cartons or types of milk.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Database linking and Accession numbers

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below. Authors should explicitly mention the *database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article.

Please use the following format: **Database ID: xxxx**

Links can be provided in your online article to the following databases (examples of citations are given in parentheses):

- [GenBank](#): Genetic sequence database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) (GenBank ID: BA123456)
- [PDB](#): Worldwide Protein Data Bank (PDB ID: 1TUP)
- [CCDC](#): Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC ID: AI631510)
- [TAIR](#): The Arabidopsis Information Resource database (TAIR ID: AT1G01020)
- [NCT](#): ClinicalTrials.gov (NCT ID: NCT00222573)
- [OMIM](#): Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM ID: 601240)
- [MINT](#): Molecular INTERactions database (MINT ID: 6166710)
- [MI](#): EMBL-EBI OLS Molecular Interaction Ontology (MI ID: 0218)
- [UniProt](#): Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProt ID: Q9H0H5)

Formulae and Equations

- Formulae must be typewritten, each on a separate line. Leave ample space around the formulae.
- Subscripts and superscripts should be clear.
- Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter l.
- Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.
- For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
- All equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses.
- The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp.
- Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$.
- In chemical formulae, valence of ions must be given as e.g. Ca^{2+} and CO_3^{2-} , not as Ca^{++} or CO_3^{-} .
- Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ^{18}O .
- The repeated writing of complicated chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound followed by its abbreviation (ethylene-diamine-tetra-acetic acid, EDTA) should be given in full. The abbreviation is to be used in the case of a very long name or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication (Smith, 2003);
2. Two authors: both authors' names and the year of publication (Smith & Jones, 2004);
3. Three, four or five authors: all authors names and year of publication (Smith, Jones, & Brown, 2005). For all subsequent citations of this work use et al. (Smith et al., 2005).
4. Six or more authors: first author's name followed by et al. and the year of publication (Black et al., 2007).

Citations may be made directly or parenthetically. Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, b, 1999; Allan & Jones, 1995; Allen et al., 1994). Kramer et al. (2000) have recently shown..."

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK. Details concerning this referencing style can also be found at <http://linguistics.byu.edu/faculty/henrichsenl/apa/apa01.html>.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (1979). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for

each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.



After Acceptance

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints



The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.



Author Inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

Anexo B – Carta de aprovação emitida pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM.

 <p>MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa Comitê de Ética em Pesquisa - CEP- UFSM REGISTRO CONEP: 243</p> 
--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – (CONEP/MS) analisou o protocolo de pesquisa:

Título: Viabilidade de probióticos em sorvete enriquecido com oligofrutose e sobrevivência às condições gastrointestinais simuladas.

Número do processo: 23081.007968/2011-71

CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0145.0.243.000-11

Pesquisador Responsável: Neila Silvia Pereira dos Santos Richards

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador deve apresentar ao CEP:

Janeiro/ 2012- Relatório final

Os membros do CEP-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 15/08/2011

Santa Maria, 15 de Agosto de 2011



Félix A. Antunes Soares
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa-UFSM
Registro CONEP N. 243.