

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP

Departamento de Alimentos e Nutrição

Desenvolvimento de sorvete de “iogurte” simbiótico à base de extrato aquoso de soja e de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) fermentado com *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014.

Daniela Peres Miguel

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Doutor em Alimentos e Nutrição, área Ciência dos Alimentos.

Araraquara / SP

2009

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

M636d Miguel, Daniela Peres
Desenvolvimento de sorvete de “iogurte” simbiótico à base de extrato aquoso de soja e de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) fermentado com *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014. / Daniela Peres Miguel. – Araraquara, 2009.
117 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição
Orientador: Elizeu Antonio Rossi

. 1. Sorvete. 2. Iogurte. 3. Soja. 4. Yacon. I. Rossi, Elizeu Antonio, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Elizeu Antonio Rossi

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

ORIENTADOR

Prof. Dr. João Bosco Faria

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

MEMBRO

Daniela Cardoso Umbelino Cavallini

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

MEMBRO

Izildinha Moreno

Instituto de Tecnologia de Alimentos, Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Centro de Tecnologia de Laticínios.

MEMBRO

Valéria Monteiro da Silva Eleutério Pulitano

Centro Universitário Central Paulista

MEMBRO

À minha filha Luiza, anjinha disfarçada, cujas gargalhadas, abraços, beijos e birras amenizaram os momentos difíceis e alegraram a caminhada, esperando que um dia entenda a necessidade da minha ausência em vários momentos deste período.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr.Elizeu Antonio Rossi, o meu especial agradecimento pela oportunidade de orientação, amizade, compreensão e exemplo de conduta profissional que me renderam não só conhecimentos teóricos, mas um grande crescimento pessoal.

À FAPESP pelo financiamento concedido ao projeto.

Aos meus pais, José Paulo e Edma, por tudo que sou, pelo respeito, amor, compreensão, carinho e incentivo.

Ao meu companheiro Paulo, pela grande força e incentivo, amor e respeito, e por me ajudar a ser uma pessoa melhor a cada dia.

À profa. Célia de Sylos, pelos importantes comentários e sugestões, que muito ajudaram na melhoria do trabalho.

À Roseli (Rô), pelos ensinamentos, amizade, simpatia, pelo enorme auxílio na realização das análises, e também pelos momentos de descontração.

À Nadi, Nádia, Dani, Marla, Raquel, Mari, Laura, pela grande amizade, ajuda na realização do trabalho e, sobretudo, por terem tornado minhas horas no laboratório mais alegres e divertidas.

Ao Macarrão, Flávio e Teresinha, pela grande ajuda na realização dos processamentos dos sorvetes na Unisoja, tendo sido de grande valia para o trabalho, e pela grande amizade.

A todos os colegas do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, especialmente, Adriana, Maraiza e Elizene, pelo auxílio, amizade e afeto.

E a todos que me incentivaram e que de alguma forma me auxiliaram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	04
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.	07
3.1. Probióticos	07
3.2. Lactobacillus acidophilus: viabilidade e fatores relacionados com a estocagem de produtos fermentados	10
3.3. “Iogurte” de soja fermentado por bactérias ácido lácticas	12
3.4. Prebióticos	15
3.5. Yacon	18
3.6. Sorvete	21
3.7. Sorvete do tipo frozen yogurt	24
3.8. Oxidação da gordura em sorvetes de iogurte	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Material	29
4.1.1. Preparo do Material	29
4.1.1.2. Obtenção do extrato de soja	29
4.1.1.3. Obtenção do extrato de yacon	30
4.1.1.4. Obtenção dos “iogurte” processados a base de extrato aquoso de soja e de yacon	33
4.1.1.5. Obtenção dos sorvetes de “iogurte” processados a base de extrato aquoso de soja e de yacon	35
4.2. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	38
4.3. MÉTODOS	39

4.3.1. Caracterização de <i>L. acidophilus</i> CRL 1014 quanto à resistência a sais biliares	39
4.3.2. Caracterização de <i>L. acidophilus</i> CRL 1014 quanto à condições ácidas	39
4.3.3 Determinação da viabilidade das bactérias ácido lácticas.	40
4.3.4. Análise Sensorial	40
4.3.5. Determinação do grau de oxidação da gordura	41
4.3.6. Avaliações físico-químicas dos <i>frozen yogurt</i>	42
4.3.7. Análise estatística dos resultados	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. Resistência do <i>L. acidophilus</i> CRL 1014 à sais biliares	45
5.2. Resistência de <i>L. acidophilus</i> CRL 1014 às condições ácidas	47
5.3. Desenvolvimento do “iogurte”	50
5.3.1. Análise Sensorial dos diferentes “iogurtes”	53
5.3.2. Viabilidade de <i>L. acidophilus</i> CRL 1014	60
5.4. Processamento das amostras de sorvete de “iogurte”	62
5.4.1. Avaliação sensorial do processamento 1 das diferentes formulações	67
5.4.2. Viabilidade das bactérias ácido lácticas na formulação do sorvete de “iogurte”.	72
5.4.3. Oxidação da gordura	77
5.4.4. Determinação da Composição Química	84
5.4.5. Determinação da concentração de frutooligossacarídeos tipo inulina	87
6. CONCLUSÕES	91
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTA DE TABELAS

	24
Tabela 1 – Composição química média do yacon em base úmida	46
Tabela 2 – Consumo mundial de sorvete	48
Tabela 3 – Tempo (minutos) de retardo no crescimento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> CRL 1014 na presença de diferentes concentrações de sais biliares	54
Tabela 4 – Tempo (minutos) de retardo no crescimento de <i>L. acidophilus</i> CRL 1014 frente a diferentes pH	64
Tabela 5 – Médias de aceitação dos diferentes produtos fermentados	64
Tabela 6 – Teste de aceitação dos sorvetes de “iogurte” referentes ao primeiro processamento	65
Tabela 7 – Teste de aceitação dos sorvetes de “iogurte” referentes ao segundo processamento	66
Tabela 8 – Teste de aceitação dos sorvetes de “iogurte” referentes ao terceiro processamento	69
Tabela 9 – Médias obtidas na comparação entre os processamentos 1, 2 e 3 após 180 dias de estocagem	73
Tabela 10 – Características sensoriais dos diferentes produtos, ao longo de 180 dias	79
Tabela 11 – Valores médios* de células viáveis (UFC/mL) no sorvete simbiótico, ao longo do período de estocagem	80
Tabela 12 – Valores das equações das retas e os coeficientes de correlações das distintas curvas- padrões relativas aos diferentes produtos	81
Tabela 13 – Concentrações médias de malonaldeído (mg/g amostra) nos diferentes produtos, em para cada período de estocagem	85
Tabela 14 – Concentrações médias de malonaldeído (mg/g amostra),verificadas de forma individualizada para cada produto ao longo do período de estocagem	87
Tabela 15 – Composição centesimal das amostras de sorvete processadas	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da inulina	16
Figura 2 – Raiz do Yacon (<i>Smallanthus sonchifolia</i>)	19
Figura 3 – Fluxograma do processo de produção de extrato aquoso de soja	31
Figura 4 – Fluxograma do processo de produção de extrato aquoso de yacon em escala de laboratório	32
Figura 5 – Fluxograma do processamento empregado para a obtenção do produto fermentado simbiótico	34
Figura 6 – Fluxograma do processamento dos sorvetes	36
Figura 7 – Etapas do processamento dos sorvetes	37
Figura 8 – Crescimento de <i>L. acidophilus</i> CRL 1014 frente a diferentes concentrações de Oxgall	42
Figura 9 – Perfil do crescimento de <i>L. acidophilus</i> CRL 1014 frente a diferentes valores de pH	51
Figura 10 – Valores de pH observados durante fermentação dos diferentes “iogurtes”.	57
Figura 11 – Gráfico de <i>Boxplot</i> para as amostras de “iogurte”, referente ao atributo “aparência”	57
Figura 12 – Gráfico de <i>Boxplot</i> para as amostras de “iogurte”, referente ao atributo “aroma”	58
Figura 13 – Gráfico de <i>Boxplot</i> para as amostras de “iogurte”, referente ao atributo “textura”	58
Figura 14 – Gráfico de <i>Boxplot</i> para as amostras de “iogurte”, referente ao atributo “sabor”	59
Figura 15 – Gráfico de <i>Boxplot</i> para as amostras de “iogurte”, referente ao atributo “impressão global”	72
Figura 16 – Representação gráfica dos resultados obtidos na determinação das características sensoriais do produto 1 (sorvete de “iogurte”: 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon)	72

Figura 17 –Representação gráfica dos resultados obtidos na determinação das características sensoriais do produto 2 (sorvete à base de extratos de yacon e soja com os demais ingredientes do iogurte, acidificado com adição de ácido láctico).	72
Figura 18 – Viabilidade de bacilos no produto 1 (sorvete de “iogurte”: 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon)	77
Figura 19 – Curva Padrão para o produto 1 (sorvete de “iogurte”: 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon)	78
Figura 20 – Curva Padrão para o produto 2 (sorvete à base de extratos de yacon e soja com os demais ingredientes do iogurte, acidificado com adição de ácido láctico)	78
Figura 21 – Concentrações médias de malonaldeído nos produtos ao longo do período de estocagem	84
Figura 22 – Cromatograma da inulina no sorvete simbiótico	88
Figura 23 – Cromatograma da inulina no sorvete controle (sem cultivo probiótico)	89

RESUMO

Esse estudo teve por objetivo o desenvolvimento de amostras de sorvete de “iogurte” simbiótico à base de extratos aquoso de soja e de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) fermentado com *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014. O *L. acidophilus* CRL 1014 foi caracterizado quanto à resistência ao pH e à sais biliares. Foram processadas formulações com diferentes proporções do extrato aquoso de yacon em substituição parcial ao extrato de soja, as quais foram submetidas à avaliações sensoriais para a definição da melhor combinação entre os extratos analisados. Também foi realizada a contagem de células viáveis do microrganismo em estudo na formulação selecionada. No processamento das amostras de “iogurte” foi verificado que quanto maior a quantidade de yacon presente nas diferentes formulações maior o tempo necessário para se atingir o pH estabelecido de 4,3, embora esse tempo tenha variado somente de 7,5 a 9,5 horas, exceto, para a formulação constituída somente por extrato de yacon, que ultrapassou o período de 10,5 horas sem ter o seu pH reduzido. A partir dos resultados obtidos nos testes sensoriais foi constatado que a formulação de “iogurte” contendo 100% de extrato de soja (sem extrato de yacon) obteve as maiores médias em termos absolutos para todos os atributos avaliados não diferindo da formulação com 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon, sendo esta a selecionada para a etapa subsequente deste estudo, uma vez que a formulação 1 não se caracteriza como sendo um produto simbiótico. A formulação 4 (iogurte com 25% de extrato de soja e 75% de extrato de yacon) foi a amostra que apresentou as menores médias em termos absolutos para todos os atributos avaliados. A contagem de células viáveis *L. acidophilus* CRL 1014 obtida para o “iogurte” simbiótico de $1,8 \times 10^9$ esteve acima do nível recomendado de 10^6 a 10^7 UFC/mL, satisfazendo assim o critério estabelecido para alimentos probióticos. A partir do testes de resistência as condições ácidas e aos sais biliares, verificou-se que o *L. acidophilus* CRL 1014, apesar de ter apresentado um tempo de retardo, foi capaz de se desenvolver na presença de sais biliares na concentração máxima de 0,5% de Oxgall e apresentou resistência às condições ácidas similares às do suco gástrico. As análises sensoriais das amostras de sorvete não apresentaram grandes variações para os atributos avaliados, ao longo do período de estocagem à temperatura de -23°C , sem comprometer, de forma significativa, a qualidade sensorial dos mesmos. As características probióticas do sorvete simbiótico foram preservadas, uma vez que apresentaram contagens de células viáveis superiores a 10^6 UFC/mL ao longo de 180 dias de estocagem a -23°C . Foi observada a produção crescente de malonaldeído nos dois sorvetes processados, ao longo do período de estocagem, sendo que o cultivo probiótico foi eficaz na contenção da oxidação. Os sorvetes de “iogurte” apresentaram uma concentração de inulina adequada para um produto prebiótico.

Palavras-chaves: sorvete; iogurte; soja; yacon.

ABSTRACT

This study aimed to develop samples of symbiotic frozen yogurt with soybean and yacon (*Smallanthus sonchifolius*) fermented with *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014. The *L. acidophilus* CRL 1014 was characterized for resistance to pH and bile salts. Formulations were processed with different proportion soybean water extract by adding yacon water extract, which were subjected to sensory evaluation to determine the best combination of the extract analyzed. The viable cells were counted in the formulation selected. In the processing of samples of yogurt was found that the higher concentration of yacon extract present in the different formulations increased the time required for the samples to reach the preset pH, although this time has varied only from 7.5 to 9.5 hours, except for the formulation consists of only yacon extract, which exceeded the period of 10.5 hours without having its pH reduced. From the results obtained in the sensory tests it was showed that the formulation of yogurt containing 100% of soy extract (no yacon extract) had the highest average in absolute terms for all sensory attributes and there was no significant difference between the formulation with 75% soy extract and 25% of yacon extract, this being selected as a basis for this study, since the formulation 1 is not characterized as a synbiotic product. Formulation 4 (yogurt with 25% of soy extract and 75% of yacon extract) was a sample showing the lowest means in absolute terms for all attributes. The viability of *L. acidophilus* CRL 1014 obtained for the synbiotic yogurt 1.8×10^9 were above the recommended level from 10^6 to 10^7 CFU / mL, thus satisfying the criteria established for probiotic foods. From the tests of resistance to acidic conditions and to bile salts, it was found that *L. acidophilus* CRL 1014, despite having a time delay, was able to grow in the presence of bile salts in the maximum concentration of 0.5% Oxgall and showed resistance to acidic conditions similar to those of gastric juice. The sensory evaluation of ice cream did not show major changes to the attributes analyzed during the period of storage at a -23°C without compromising significantly the sensory quality of them. The probiotic properties of symbiotic ice cream been preserved as it had viable cell counts higher than 10^6 CFU / mL after 180 days of storage at -23°C . Was observed the growing production of malondialdehyde in both ice cream processed during the period of storage, but the probiotic cultivation was effective in containing the oxidation. The symbiotic frozen “yogurt” showed an appropriate concentration of inulin to be characterized as prebiotic.

Key-words: ice-cream; yogurt; soybean; yacon.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Alguns alimentos não são apenas considerados fontes de nutrientes necessários à manutenção da vida. Estudos os relacionam à prevenção de doenças e melhora da função de órgãos e tecidos. O interesse por esta classe de alimentos, denominada, alimentos funcionais, particularmente pelos probióticos, tem aumentado muito e está diretamente relacionado com a crescente valorização da qualidade de vida.

Os microrganismos caracterizados como sendo probióticos, na grande maioria, pertencem ao grupo das bactérias lácticas e incluem, principalmente, os dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Entretanto, ainda se faz pouco uso destes microrganismos, uma vez que as pesquisas sempre esbarram na dificuldade de desenvolver produtos com uma boa aceitação sensorial e com microrganismos viáveis durante toda a vida útil do produto (pré-requisito para que a ação probiótica seja preservada).

Os alimentos fermentados também têm se constituído em importantes componentes da dieta devido não somente às suas características nutricionais, mas também às suas propriedades profiláticas e terapêuticas. Nesse sentido, o extrato de soja vem sendo utilizado para o preparo de um tipo de produto fermentado, melhorando sua aceitabilidade.

Além do iogurte, das bebidas fermentadas e dos queijos, outro veículo considerado apropriado para se adicionar tanto culturas probióticas quanto ingredientes prebióticos à dieta humana é o sorvete. Alguns estudos têm demonstrado ser possível processar sorvete do tipo *frozen yogurt* empregando diferentes fermentos e diferentes proporções destes nas misturas.

A combinação de prebióticos e probióticos pode resultar em efeitos sinérgicos, principalmente quando essa combinação é selecionada apropriadamente de forma a aumentar os efeitos benéficos de cada um deles. Dentre os prebióticos que têm recebido maior atenção, destacam-se a inulina e os oligossacarídeos, os quais se caracterizam como ingredientes alimentares não digeríveis que estimulam seletivamente a multiplicação e/ou atividade de bifidobactérias na microbiota do cólon. Atualmente, um vegetal que vem sendo muito estudado por apresentar até 20% do peso fresco de inulina e oligofrutose é o yacon (*Smallanthus sonchifolius*), que foi introduzido no Brasil no começo dos anos 90, por agricultores japoneses (VORAGEN, 1998; VILHENA, 2000).

Diante da procura dos consumidores por alimentos saudáveis e dos potenciais efeitos benéficos da soja, este estudo teve por finalidade desenvolver um sorvete de “iogurte” à base de extrato aquoso de soja e de yacon (fonte de prebióticos) fermentado por *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014, resultando em um produto simbiótico com potencial para atuar no intestino delgado do consumidor, estimulando a multiplicação das bifidobactérias endógenas do cólon.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de um sorvete de “iogurte” simbiótico à base de extrato aquoso de soja e de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) fermentado com *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014.

2.2. Objetivos específicos:

- Avaliar *L. acidophilus* CRL 1014 quanto à resistência ao pH e à sais biliares;
- Desenvolver o sorvete de “iogurte” simbiótico, a partir de “iogurtes” processados com diferentes proporções do extrato aquoso de yacon em substituição parcial ao extrato de soja;
- Avaliar as características químicas, microbiológicas e sensoriais do produto obtido comparando-as com o produto não fermentado, ou seja, aquele processado a partir das mesmas matérias-primas acidificadas com adição direta de ácido láctico.

Revisão Bibliográfica

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Probióticos

A constatação de efeitos probióticos de cultivos bacterianos viáveis data de há muitos anos e tem variado, ao longo do tempo, em função do conhecimento em diferentes momentos. O termo “probiótico” tem recebido diferentes definições ao longo dos últimos anos.

Segundo Fooks et al. (1999) a palavra probiótico se deriva de duas palavras gregas que significam “para vida”. O termo foi usado para definir a substância que estimula o crescimento de outro microrganismo (LILLEY e STILLWELL, 1965) ou extratos de tecido com os quais se promove o crescimento microbiano (SPERTY, 1971). Parker (1974) foi o primeiro a usar a palavra probiótico no contexto de suplementação animal e foi definida como organismos e substâncias que contribuem para o balanço da microbiota intestinal. Entretanto, a palavra ‘substância’ poderia incluir suplementos tais como os antibióticos, cuja função é virtualmente oposta.

Fuller (1989) redefiniu probióticos excluindo o termo “substâncias” que poderiam incluir antibióticos e estimulantes microbianos. Este autor definiu os probióticos como um suplemento alimentício de microrganismos vivos que afeta de forma benéfica o animal hospedeiro pelo seu incremento no balanço da microbiota intestinal.

De maneira mais detalhada Havenaar e Huis in’t Veld (1992) definem agentes probióticos, como “microrganismos viáveis (o que incluem bactérias lácticas e leveduras na forma

de células liofilizadas ou de produto fermentado) que exibem um efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro após a ingestão, devido à melhoria das propriedades da microbiota intestinal humana”.

Atualmente, a definição aceita internacionalmente caracteriza probióticos como “microrganismos vivos não patogênicos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (SANDERS, 2003). Alguns benefícios atribuídos à ingestão de probióticos incluem: alívios dos sintomas causados pela intolerância à lactose; promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos através da produção de ácidos acético e lático; de bacteriocinas; estimulação do sistema imune; efeitos anti-carcinogênicos entre outros (DOUGLAS e SANDERS, 2008; LOMER et al., 2008).

Segundo definição da ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, os probióticos são microorganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2005).

A seleção de bactérias probióticas tem como base os seguintes critérios preferenciais: os gêneros aos quais pertencem as bactérias devem ser de origem humana; estabilidade frente à ácido e a bile; capacidade de aderirem à mucosa intestinal e de colonizarem, ao menos temporariamente, o trato gastrointestinal humano; capacidade de produzirem compostos antimicrobianos e serem metabolicamente ativas no intestino; segurança para uso humano; histórico de não patogenicidade e não estarem associadas a doenças (STANTON et al., 2003; GUARNER et al., 2005 ; GOEL et al., 2006).

Neste sentido, inúmeros são os estudos relativos às características desejáveis para um bom agente probiótico. Destaca-se principalmente a necessidade de uma tolerância aos ácidos e sais

biliares, para assegurar a manutenção de um número elevado de células viáveis durante o armazenamento e passagem pelo trato gastrintestinal, sendo igualmente conveniente que as estirpes selecionadas sejam capazes de gerar um produto final com sabor e textura aceitáveis (KURMANN e RASIC, 1991; SALMINEN et al., 1996)

A sobrevivência das bactérias probióticas no produto alimentício é imprescindível. A Legislação Brasileira define que a quantidade mínima viável para o probiótico deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na porção diária do alimento para ser de importância fisiológica para o consumidor (ANVISA, 2008). O consumo de quantidades adequadas dos microrganismos probióticos desejados nos bioprodutos (10^9 a 10^{10} UFC/100g de produto) é suficiente para a manutenção das concentrações ativas fisiologicamente (quantidade intestinal de 10^6 a 10^7 UFC/g) *in vivo* (CHARTERIS et al., 1998).

A sobrevivência da bactéria probiótica no meio de fermentação, depende das cepas usadas, interação entre espécies presentes, condições de cultivo, composição química do meio (p.e. fonte de carbono), acidez final, conteúdo de sólidos, promotores e inibidores do crescimento, concentração de açúcares (pressão osmótica), oxigênio dissolvido (especialmente pelas bifidobactérias), nível de inoculação, temperatura de incubação, tempo de fermentação e temperatura de estocagem (LOURENS-HATTINGH et. al., 2001).

Oliveira et al. (2002) salientam que além da seleção de cepas probióticas para uso em humanos, através dos critérios já mencionados anteriormente, as culturas devem ser empregadas com base no seu papel fisiológico. Sendo assim, culturas com boas propriedades tecnológicas devem apresentar boa multiplicação no leite, promover propriedades sensoriais adequadas no produto e serem estáveis e viáveis durante armazenamento.

Derivados lácteos probióticos já são encontrados disponíveis no mercado e a variedade desses produtos continua em expansão. Nos últimos quinze anos, período em que os produtos suplementados com culturas probióticas passaram a assumir um papel de importância no universo científico, muitas pesquisas com probióticos têm sido voltadas para leites fermentados e iogurtes, sendo estes os principais produtos comercializados no mundo contendo estas culturas probióticas. Entretanto, sorvetes, sorvetes de iogurte, diversos tipos de queijo, leite em pó destinado a recém nascidos, também já foram testados como veículos para cepas probióticas, revelando-se apropriados (OLIVEIRA et al., 2002 ; MIGUEL e ROSSI, 2003; STANTON et al., 2003).

3.2. *Lactobacillus acidophilus*: viabilidade e fatores relacionados com a estocagem de produtos fermentados

Os efeitos benéficos dos leites fermentados tiveram sua base científica no começo do século XX, com o microbiologista russo Eli Metchnikoff, que propôs uma teoria sobre o prolongamento da vida, baseada no consumo diário de leites fermentados pelos povos dos Bálcãs (GONZÁLEZ, 1997). Ele acreditava que a atividade metabólica das bactérias lácticas inibiria as bactérias intestinais do mesmo modo que inibem a deterioração dos alimentos (ADAMS e MOSS; 1997).

O primeiro pesquisador a isolar bastonetes anaeróbios facultativos das fezes de lactentes foi Moro, que os chamou de *Bacillus acidophilus*, nome genérico para lactobacilos intestinais. Lactobacilos são, em geral, caracterizados como Gram-positivos, não formadores de esporos, não flagelados, homofermentativos e apresentam vias fermentativas de síntese de ácido lático e acético, etanol e gás carbônico. Até o presente, 56 espécies do gênero *Lactobacillus* já foram identificadas. Destes microrganismos, os mais comumente sugeridos para uso dietético são as linhagens de *L.*

acidophilus, cuja nomenclatura foi alterada, recentemente, devido às reclassificações com base em técnicas genéticas de identificação (GOMES e MALCATA, 1999; CHARTERIS, 1997).

O consumo de produtos contendo *L. acidophilus* tem a potencialidade de melhorar os movimentos peristálticos do intestino, aumentando a absorção de nutrientes, prevenindo ou controlando infecções intestinais, bloqueando os receptores dos patógenos, inativando os efeitos das enterotoxinas e favorecendo o desenvolvimento de microrganismos resistentes a patógenos, especialmente contra *Escherichia coli* (LEE et al., 1999). Além disso, tem a capacidade de melhorar a digestão da lactose em pessoas classificadas como lactose-intolerantes, metabolizar alguns tipos de fármacos, reduzir o nível de colesterol e o risco de câncer de cólon (GILLILAND, 1989).

Estas culturas têm sido utilizadas para aumentar a vida-de-prateleira dos produtos lácteos, devido à formação de componentes metabólicos como ácido lático, ácido propiônico, diacetil e substâncias antagonísticas que exercem efeito inibitório sobre as bactérias Gram-negativas, responsáveis pela deterioração de produtos alimentícios e muitas vezes causadores de toxi-infecções (VOSNIAKOS et al., 1991; VEDAMUTHU, 1991; MANZANARES, 1996).

Os veículos existentes para carrear bactérias probióticas integram três grandes grupos: alimentos infantis, preparações farmacêuticas e produtos lácteos. Destes, o grupo mais representativo é o dos produtos lácteos, principalmente leites fermentados, iogurtes, sorvetes e queijos, nos quais utilizam-se freqüentemente culturas iniciadoras, como as de *Lactobacillus acidophilus* (GOMES e MALCATA, 1999).

Shah et al. (1995) relatam que os principais fatores que afetam a viabilidade das culturas probióticas durante a fabricação e estocagem do iogurte são a acidificação, o pH e o peróxido de hidrogênio. Outros fatores, como a temperatura de estocagem, conteúdo de oxigênio, concentração de ácidos láctico e acético, entre outros, também têm sido citados em pesquisas reportando os efeitos destes fatores (SAMONA e ROBINSON, 1994), entretanto, estes parâmetros não tem sido estudados simultaneamente (DAVE e SHAH 1997), o que retarda e prejudica ainda mais o avanço tecnológico dos iogurtes com estas culturas.

Contudo, segundo Vinderola et al. (2000), fatores como acidez, oxigênio dissolvido, interações entre espécies, práticas de inoculação e condições de estocagem podem condicionar a sobrevivência da microbiota probiótica nos produtos lácteos. Estes mesmos autores concluíram não haver estudos suficientes sobre a sobrevivência dos probióticos durante a estocagem refrigerada.

3.3. “Iogurte” de soja fermentado por bactérias lácticas

Os alimentos à base de soja ainda sofrem resistência ao consumo devido ao seu sabor tido como desagradável. Nesse sentido, a fermentação do extrato aquoso de soja tem contribuído consideravelmente para a melhoria das características sensoriais destes produtos. Norteados por esta situação, Rossi et al. (1984) obtiveram, a partir do extrato aquoso de soja, um produto similar ao iogurte, com custo reduzido, de boa aceitabilidade e que mantém conservadas as características nutricionais e terapêuticas apresentadas pelos produtos fermentados convencionais.

Pithong et al. (1980) mostraram que *L. acidophilus* cresce bem no “leite” de soja devido à utilização eficiente da sacarose, enquanto *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* não cresce rapidamente sem suplementação de glicose e extrato de leveduras, embora diminua levemente o teor de estaquiose com um correspondente aumento no teor de rafinose e sacarose.

Nesta mesma linha de estudo, Souza et al. (1988) avaliaram a aceitabilidade do sabor de “iogurte” contendo 60, 75 e 85% de “leite” de soja. O produto classificou-se no grau de apreciação “gostei” da escala hedônica. A aceitabilidade do sabor do produto diminuiu linearmente com o acréscimo de “leite” de soja, como era de se esperar, mas esta diminuição de apenas 0,4 ponto para um acréscimo de 25% de “leite” de soja não foi significativa em termos da perda de qualidade. Diante do que se ganha em valor nutricional e redução no custo do produto, o autor conclui como sendo viável utilizar até 85% de “leite” de soja no produto.

Visando o desenvolvimento e avaliação sensorial do “iogurte” de soja, Favaro Trindade et al. (2001) elaboraram “iogurtes” através da fermentação de “leite” de soja, usando uma cultura mista de *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. O “leite” de soja com 9^o Brix foi homogeneizado sob pressão (17 MPa) e fermentado com e sem adição de sacarose (2,0 e 2,5 g por 100 g) por 4, 5, 6 e 7 horas. Os “iogurtes” obtidos foram analisados em relação às características sensoriais, pH, acidez titulável, fitatos e oligossacarídeos. Foi obtido um “iogurte” com ótimas qualidades sensoriais a partir do “leite” de soja homogeneizado com adição de 2% de sacarose e fermentado por 6 h. Os microrganismos utilizados não produziram fitases e α -galactosidases e, conseqüentemente, os teores de α -galactosídeos e de fitatos não foram alterados pelo processamento.

Além dos vários estudos realizados com o objetivo de se melhorar a tecnologia e as características sensoriais do “iogurte” de soja, atualmente grande ênfase vem sendo dada às pesquisas que têm como finalidade evidenciar os efeitos benéficos das bactérias lácticas e definir as características desses microrganismos para uso como coadjuvante dietético.

Rossi et al. (1994) estudaram 18 cepas bacterianas de *Lactobacillus acidophilus* e *Enterococcus faecium*. Essas cepas foram testadas quanto a sua capacidade de remoção do colesterol adicionado ao meio de cultura em presença de sais biliares. As maiores remoções do colesterol foram obtidas pelo *Enterococcus faecium* CRL 183 e pelo *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 (55,4% e 54%, respectivamente). Apoiado nesses resultados foi desenvolvido um produto de soja fermentado com *Enterococcus faecium* associado com *Lactobacillus jugurti*, o qual apresentou propriedades tecnológicas e sensoriais semelhantes aos fermentados tradicionais (ROSSI et al., 1999). Rossi et al. (2000) também testaram o efeito de um novo produto a base de soja, fermentado com *E. faecium* e *L.jugurti* nos níveis de lípides séricos de coelhos induzidos à hipercolesterolemia. Os resultados demonstraram uma redução de 18,4% no colesterol total e um aumento de 17,8% na fração – HDL.

Em estudo mais recente, Haully et al. (2005) avaliaram as características probióticas dos microrganismos (*Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) utilizados no preparo de “iogurte” de soja suplementado com os prebióticos oligofrutose e inulina (frutooligossacarídeos), suas características físico-químicas, microbiológicas e índice de aceitação. O fermento misto utilizado no preparo do “iogurte” apresentou resistência à bile e ao ácido e manteve a viabilidade celular necessária para caracterizar o “iogurte” como probiótico. O “iogurte” de soja suplementado com os prebióticos oligofrutose e inulina apresentou maior viscosidade, coesividade e adesividade e menor dureza que o “iogurte” não suplementado. Além disso, esse produto apresentou um bom índice de aceitação.

É oportuno salientar que até o presente momento, nenhum estudo foi realizado com o intuito de se desenvolver um produto fermentado utilizando como cepa probiótica *L. acidophilus* CRL 1014 e posteriormente verificar suas propriedades funcionais “in vivo”.

3.4. Prebióticos

Prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que chegam ao cólon e estimulam seletivamente a proliferação ou atividade de populações de microrganismos desejáveis deste local. Esses componentes atuam mais frequentemente no intestino grosso, embora eles possam ter também algum impacto nos microrganismos do intestino delgado (GILLILAND, 2001; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002).

Os ingredientes dos alimentos classificados como prebióticos geralmente exibem as seguintes características: limitada hidrólise e absorção no trato gastrointestinal superior; estimulação seletiva da multiplicação das bactérias benéficas no cólon; potencial para reprimir patógenos e limitar virulência por processos como a imunoestimulação e o estímulo da microbiota benéfica que promove a resistência à colonização por patógenos (PEREIRA e GIBSON, 2002).

Os prebióticos abrangem os frutanos, que incluem a inulina natural, inulina hidrolisada enzimaticamente ou oligofrutose e frutooligossacarídeos sintéticos, além de galactoligossacarídeos, lactulose, isomaltoligossacarídeo, xiloligossacarídeos e gentioligossacarídeos (GIBSON e FULLER, 2000). Os frutanos tipo inulina têm sido os mais investigados (FOOKS et al., 1999 ; GILLILAND, 2001) e estão presentes em vários alimentos como alho, cebola, banana, alcachofra de Jerusalém, yacon, entre outros (ROBERFROID, 2000 ; KAUR e GUPTA, 2002).

A inulina foi descoberta por Rose em 1804. Em meados do século XIX a rota bioquímica foi elucidada, entretanto suas propriedades de resistência à digestão só foram descobertas no início do século XX. Mais recentemente é que foram descritas as propriedades benéficas à saúde deste tipo de carboidrato, despertando maior interesse pela sua produção industrial (GIBSON et al., 1994).

A inulina é um carboidrato pertencente ao grupo de polissacarídeos chamados frutanas, composto por uma cadeia principal de unidades de frutose, em ligações β -(2,1)-frutofuranosídicas, com uma unidade de glicose terminal (Figura 1). Sua fórmula pode ser descrita como **GF_n**, onde **G** representa a molécula de glicose, **F** a molécula de frutose e **n** o número de unidades de frutose (VAN LOO et al., 1995; ROBINSON, 1995).

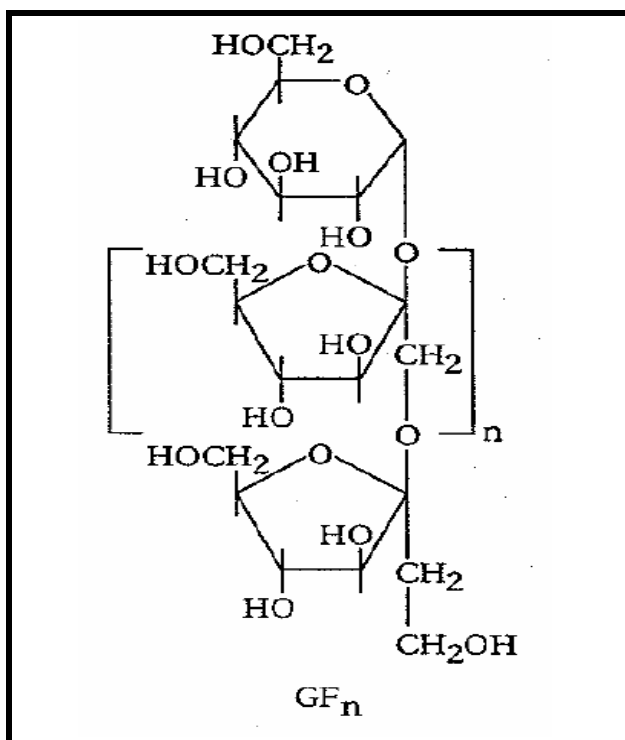


Figura 1– Estrutura química da inulina

Fonte: ROBERFROID (1993); MACHETTI (1993)

No Brasil, a Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos da ANVISA (2005) publicou uma lista de alegações de propriedades funcionais e ou de saúde para determinados ingredientes. Para os frutoligosacarídeos (FOS) e a inulina descrevem a seguinte alegação que deve vir no rótulo dos produtos: “contribuem para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma dieta equilibrada e hábitos de vida saudáveis”. Além disso, também constam as seguintes observações: 1. A porção diária do produto pronto para consumo deve atender pelo menos ao atributo “fonte” de fibras alimentares estabelecido pela Portaria SVS/MS nº 27/98 (mínimo de 3 g fibras / 100 g para sólidos e 1,5 g /

100g para líquidos); 2. Na tabela de informação nutricional deve ser declarada a quantidade de frutoligossacarídeos ou inulina abaixo de fibra alimentar.

A dose diária aceitável (DIA) para inulina é estabelecida em 40 gramas. Entretanto, não existem evidências de toxicidade ou distúrbios gastrintestinais associados ao consumo de inulina. A média diária de consumo *per capita* varia de 1 a 10 gramas em populações da parte ocidental dos EUA e da Europa (VAN LOO et al., 1995). Alterações positivas na composição da microbiota intestinal foram demonstradas em estudos *in vivo* em humanos com doses de 5 e 20g por dia de inulina, geralmente com a administração durante um período de 15 dias (NINESS, 1999). Coussement (1999) recomendou doses de até 10g de inulina por porção de produto. Roberfroid (2000), sugeriu que, doses de 4 a 5g por dia são suficientes para o estímulo da multiplicação das bifidobactérias.

Recentemente, Roberfroid (2007), afirmou que a dose diária de prebióticos não é um determinante do efeito prebiótico. Segundo o autor, esse efeito é principalmente influenciado pela concentração de bifidobactérias nas fezes antes do início da suplementação da dieta com o prebiótico. Ainda, segundo o autor, o “argumento dose” não possui embasamento científico e leva o consumidor a enganos. O autor propõe um índice prebiótico, definindo-o como “um aumento da quantidade absoluta de bifidobactérias expresso, dividido pela dose diária de prebiótico ingerido”.

Há vários estudos em relação à inclusão da inulina em produtos processados. Já foi utilizada como substituto de gordura em produtos cárneos, produzindo salsichas mais macias que as tradicionais (MENDOZA et al., 2001) e em pães (O'BRIEN et al., 2003). Em sorvetes com reduzido conteúdo de gordura, a adição de inulina resultou em um aumento na viscosidade (EL-NAGAR et al., 2002), uma diminuição no ponto de congelamento e uma melhora nas propriedades sensoriais

(SCHALLER-POVOLNY e SMITH, 1999). Dello Staffolo et al. (2004) não verificaram diferenças na viscosidade e na aceitabilidade de iogurte, quando adicionado de 1,3% de inulina. Também já foi avaliada no desenvolvimento de barra de cereais associada a um gelado comestível com baixo teor de gordura e adicionada de microrganismos probióticos. Neste estudo, foi verificada a viabilidade tecnológica do produto contendo 1,5% de gordura láctea e 8% de inulina. (HARAMI, 2008).

Quadros e Bortolozo (2007) desenvolveram um iogurte adicionado de inulina, caracterizando-se como prebiótico e para fins especiais, como alternativa para uma alimentação mais saudável, que poderia ser consumido por pessoas com dieta restrita em gordura ou açúcares. A partir desta proposta, foi elaborado um iogurte adicionado de inulina e sucralose, com matéria-prima desengordurada. Para tanto, foram realizados cinco ensaios, incluindo concentrações diferentes de sucralose. O melhor resultado foi obtido no ensaio cuja concentração de inulina era de 5% e 0,05% de sucralose, o qual apresentou boa consistência e um pH de 4,53. Este estudo resultou na elaboração de um iogurte semelhante ao tradicional, de boa aceitação, com baixa concentração calórica, isento em gorduras e rico em fibras solúveis, com resultado adequado do ponto de vista microbiológico, o que justifica sua classificação como um produto para fins especiais (produto funcional).

3.5. Yacon

O yacon (*Smallanthus sonchifolius*), planta originária das regiões andinas, foi introduzido no Brasil no início dos anos 90 e apresenta de 3 a 19% (peso seco) de inulina, (VAN LOO et al., 1995 ; MOSHFEGH et al.,1999).

O tubérculo de yacon pertence à família das *Compositae*, cientificamente é conhecido como *Polymnia sonchifolia* ou *Smallanthus sonchifolia* (GRAEFE et al., 2004). As raízes tuberosas do yacon são fusiformes (Figura 2) e podem variar consideravelmente de sabor, tamanho e cor. Possuem aparência similar à batata doce e podem pesar de 100 a 1200 g (SILVA et al.,

2003). A cor da casca varia do marrom até uma tonalidade arroxeada, enquanto a porção comestível pode ser branca, amarela, laranja ou roxa dependendo da variedade (GRAU e REA, 2004).



Figura 2 – Raiz do Yacon (*Smallanthus sonchifolia*).

A composição deste tubérculo apresenta variações com a região de plantio. Na Tabela 1 é apresentada a composição média do yacon proveniente de algumas regiões diferentes dos Andes latino-americanos (HERMANN et al., 1997-98).

As folhas e caule do yacon são ricos em proteínas. Já as raízes tuberosas apresentam teores significativos de potássio, fósforo e ferro (NIETO, 1991). Ao contrário da maioria das espécies vegetais, não estocam carboidratos em forma de amido, mas sim frutanos. O suco de yacon é rico em aminoácidos essenciais livres (KAPULER e GURUSIDIAH, 1994), sendo a asparagina, glutamina, prolina e arginina os encontrados em maior concentração (ASAMI et al., 1989).

Tabela 1 – Composição química média do yacon em base úmida

COMPONENTES	COMPOSIÇÃO
CARBOIDRATOS	8,9-12,7 %
ÁGUA	8,64-12,7 %
CINZAS	0,43-0,6 %
PROTEÍNAS	0,27-0,37 %
LIPÍDIOS	0,01-0,05 %
FIBRAS	0,31-0,41 %
SÓLIDOS SOLÚVEIS (°BRIX)	9,0-12,6 %
AÇÚCARES TOTAIS	18-42 %
CÁLCIO	5,6-13,1 mg/100g
FÓSFORO	18,2-30,9 mg/100g
POTÁSSIO	183,4-295 mg/100g

Fonte: HERMANN et al. (1997-98)

Vários carboidratos são estocados nas raízes de yacon: frutose, glicose, sacarose, oligossacarídeos de baixo grau de polimerização (GP de 3 a 10), também conhecidos por frutooligossacarídeos (FOS) e traços de amido e frutanos, que são oligossacarídeos com GP maior que 10 (ASAMI et al., 1989; OHYAMA et al., 1990).

Dentre os benefícios atribuídos ao yacon, destaca-se a capacidade de redução da glicemia e o auxílio na redução da obesidade. Aybar et al. (2001) estudaram o efeito hipoglicêmico de extrato aquoso de folhas de yacon em ratos normais e com diabetes induzida por estreptozotocina. A administração intraperitonal ou gástrica de decocto (produto obtido por decocção) de yacon a 10% reduziu significativamente o nível de glicose no plasma de ratos normais. A substituição do consumo de água pela infusão do yacon a 2% produziu uma significativa melhoria nos parâmetros corporais e renais dos ratos diabéticos quando comparados

com o grupo controle. Estes resultados sugerem que o extrato de yacon produz um aumento na concentração de insulina no plasma.

3.6. Sorvete

O sorvete passou a ser conhecido no Brasil em 1834, quando o navio norte-americano Madagascar aportou no Rio de Janeiro, carregando 217 toneladas de gelo. Dois comerciantes começaram a fabricar sucos e sorvetes artesanais com frutas nativas, utilizando o nome de ‘gelados’. Em janeiro de 1836, o italiano Luigi Bassino passou também a fabricar sorvetes. A história conta apenas que até 1941 a evolução do sorvete deu-se de forma artesanal. O ano de 1941 foi histórico e representou o início da sorveteria industrial, em altos volumes de produção e utilizando-se a tecnologia do frio. De 1942 até 1980 a indústria de sorvetes apresentou crescimento constante, tendo hoje à disposição do consumidor uma imensa variedade de produtos como bolos gelados, torta de frutas, cones de biscoitos e outras combinações (BACCARIN, 1982). O sorvete tornou-se um dos principais produtos da indústria de leite e de grande interesse dos consumidores (WARKER et al., 2000).

Sorvete está inserido na chamada "família de sobremesas congeladas" e está definido na Portaria nº379 (Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Gelados Comestíveis, Preparados, Pós para o Preparo e Bases para Gelados Comestíveis) do Diário Oficial da União de 29 de abril de 1999.

Segundo Resolução RDC nº. 266 (BRASIL, 2005) os gelados comestíveis são produtos alimentícios obtidos a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas por congelamento, sob contínua agitação, pasteurizada, composta de ingredientes lácteos ou não, com ou sem a adição de outros ingredientes ou substâncias como: açúcares, corantes, aromatizantes, estabilizantes e

emulsificantes, visando atender aos padrões definidos para sólidos totais e *overrun* (incorporação de ar) em condições que garantam a conservação do produto, no estado congelado, ou parcialmente congelado, durante a armazenagem, o transporte e a entrega ao consumidor.

Os sorvetes devem ser considerados não como uma simples guloseima ou produto de verão, mas como uma sobremesa valiosa e nutritiva, que contribui com elementos muito importantes para uma alimentação equilibrada. Além do valor nutricional, o sorvete tem a característica de alta digestibilidade, quando bem homogeneizado. Esses fatores associados a outras características como sabor doce e textura macia fazem dele um alimento ideal para todas as idades. Pela fácil assimilação, o sorvete é excelente para idosos, pessoas de apetite difícil e em casos de úlcera e gastrites crônicas. Exerce função terapêutica, pois, pelo resfriamento, ocorre descongestionamento da mucosa gástrica inflamada e estimula a secreção de enzimas digestivas. Enfim, o sorvete reúne vários atributos em um só produto, resultando na junção da nutrição e o prazer do consumo (CASTILHO, 1992).

Um sorvete ideal deverá obedecer a limites de confiança quanto aos seguintes atributos de qualidade: sabor, corpo, textura, características de derretimento, cor, embalagem, conteúdo microbiológico e composição (MARSHALL e ARBUCKLE, 1996). A avaliação sensorial para verificação da aceitação dos consumidores é crítica para o desenvolvimento de produtos. O sorvete oferece uma combinação de propriedades sensoriais altamente desejáveis, sendo estas classificadas em categorias de aparência (cor, maciez, regularidade), aroma, sabor e textura/preenchimento bucal (dureza, viscosidade, cremosidade) (GUINARD, 1998).

A alta palatabilidade do sorvete é um fator importante em sua escolha enquanto alimento. A textura suave e aveludada amacia o palato. A digestibilidade do sorvete é geralmente

alta, exceto para pessoas intolerantes a lactose (MARSHALL e ARBUCKLE, 1996). Uma importante característica do sorvete é a definida como "secura", relacionada com a aparência do produto (nem macio, nem pegajoso em excesso) e o preenchimento bucal (não muito viscoso) (WALSTRA e JONKMAN, 1998).

Apesar de todos os benefícios, o consumo de sorvete no Brasil ainda tem índices baixos, cerca de 2,7 litros por pessoa/ano, conforme pode-se verificar na Tabela 2. O setor de laticínios em geral, ciente dessa situação, tem buscado o desenvolvimento de tecnologias que permitam inovações nos produtos além de explorar as expectativas do mercado e as necessidades dos consumidores. Segundo dados da empresa de pesquisa A/C Nielsen, o consumo de sorvetes cresceu 17,4% em 2007 em relação a 2006 (ABIS, 2008). Este crescimento está relacionado à variedade de produtos no mercado, como por exemplo, a opção de sorvete com incorporação de agentes probióticos que tem como público alvo principalmente aqueles indivíduos que se preocupam com a relação entre saúde e dieta.

Tabela 2 - Consumo mundial de sorvete

País	Consumo (Litros)	Classificação
Nova Zelândia	26,30	1
Estados Unidos	22,50	2
Canadá	17,80	3
Austrália	17,80	4
Suiça	14,40	5
Suécia	14,20	6
Finlândia	13,90	7
Dinamarca	9,20	8
Itália	8,20	9
França	5,40	10
Alemanha	3,80	11
BRASIL	2,71	12
China	1,80	13

Fonte: ABIS, 2008.

3.7. Sorvete tipo *frozen yogurt*

Desde 1970, quando foi lançado no mercado, o sorvete tipo *frozen yogurt* (sorvete de iogurte) tem conquistado cada vez mais novos consumidores, principalmente em decorrência dos potenciais efeitos benéficos atribuídos às bactérias lácticas utilizadas no processo de fermentação do iogurte (HUGHES e HOOVER, 1991). Segundo alguns autores, o sorvete de iogurte teve origem no Canadá, mas industrialmente, surgiu nos Estados Unidos, mais precisamente em Boston (Massachussets), no ano de 1972, e em poucos anos já estava nas principais cidades dos Estados Unidos (TRAVI ALIMENTOS, 2002).

Kosikowski (1977) define tecnicamente o sorvete de iogurte como sendo um iogurte flavorizado, congelado em equipamentos próprios com a introdução de ar para obter cerca de 50% de “overrun” (incorporação de ar). O sorvete de iogurte é classificado em três principais categorias, *soft*, *hard* ou *mousse*. Esses produtos se assemelham ao sorvete em seus estados físicos e em suas características, combinando a textura e sabor ácido do iogurte com o frescor do sorvete (TAMINE e ROBINSON, 1985).

O aumento do interesse dos consumidores por esta classe de alimentos está relacionado não só às propriedades nutricionais inerentes ao sorvete de iogurte, mas também devido à possibilidade de se obter um produto suplementado com culturas probióticas, por exemplo, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum*. Nestes casos, o consumidor poderá obter efeitos benéficos adicionais, incluindo, atividade anticarcinogênica, controle de infecções intestinais, diminuição dos sintomas característicos da intolerância à lactose, entre outros (GILLILAND, 1989; LAROIA e MARTIN, 1990;. MARSHALL e ARBUCKLE, 1996).

O sorvete de iogurte pode ser processado utilizando-se equipamentos usualmente presentes na maioria das unidades sorveteiras. O processamento começa com a preparação da calda do sorvete, tecnicamente denominada “mix” e geralmente constitui-se de 1,5 a 2% de leite integral, 13 a 15% de sólidos não gordurosos do leite, 0,15 a 0,20% de gelatina, 7 a 10% de sacarose e 4 a 5% de glicose (24 a 26 DE). O total de sólidos varia de 24,6 a 32,2%. Após a mistura destes ingredientes ocorre a pasteurização seguida de homogeneização. Esta calda é resfriada e adicionada do iogurte contendo as culturas probióticas. Seguidamente efetua-se a maturação e após esta etapa a calda é novamente processada para depois se efetuar o acondicionamento em embalagens próprias. Estas embalagens são finalmente armazenadas em equipamentos tipo *freezer* em temperatura de congelamento (KOSIKOWSKI, 1977).

Para a maioria dos fabricantes de sorvete de iogurte, a viabilidade de bactérias lácticas se constitui em um elemento indispensável quando se pretende obter um produto com qualidade (SPECK e HANSEN, 1983; KOSIKOWSKI, 1981). Não existe nenhuma legislação federal vigente que determine a quantidade ou tipo de microrganismos que devam ser empregados no seu processamento, entretanto, alguns países têm estabelecido legislações próprias, onde se tem como prática comum a utilização de culturas tradicionais de iogurte – *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (WHITEHEAD et al., 1993).

Além do emprego das culturas lácticas tradicionais no processamento de sorvete de iogurte, atualmente grande ênfase vem sendo dada aos estudos que visam demonstrar a viabilidade de Bifidobactérias e Lactobacilos neste tipo de produto. Neste sentido, Holcomb e Frank (1991) estudaram “in vitro” a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* em amostras de sorvete de iogurte, para determinar se o produto em questão seria um veículo apropriado para esses dois microrganismos. Esse experimento foi realizado de forma a simular as mesmas condições de tolerância “in vivo” desses microrganismos à bile e aos ácidos antes e após o congelamento. Foi verificado ao final do estudo que as culturas se mostraram aptas a sobreviver e crescer em até 0,45% de sais biliares e em pH de 5,4, antes e depois do congelamento. Entretanto, apenas *Lactobacillus acidophilus* sobreviveu e cresceu depois de submetido à HCL 0,01M, por 2 horas a 37°C.

3.8. Oxidação da gordura em sorvete de iogurte

A oxidação lipídica tem recebido muita atenção por parte dos pesquisadores em decorrência de seus efeitos indesejáveis na saúde humana bem como na diminuição do valor nutricional e da aceitação dos alimentos. Reações entre o oxigênio atmosférico e os lipídeos

insaturados produzem hidroperóxidos, os quais são responsáveis por algumas alterações no sabor e odor de produtos lácteos através do desenvolvimento de “off-flavours” (VALERO et al., 2001 ; FENAILLE et al., 2003; VICHI et AL., 2003).

Produtos com baixo pH são oxidados mais rapidamente que produtos com pH neutro, mesmo a baixas temperaturas de estocagem. Neste sentido, algumas bactérias lácticas têm sido investigadas quanto a capacidade de inibir a oxidação de gorduras em produto lácteos. Inoue et al. (1998) verificaram que amostras sorvete de iogurte com pH ajustado com ácido láctico (não fermentadas) desenvolveram a oxidação da gordura mais rapidamente que a amostra controle (pH reduzido pelo processo fermentativo), demonstrando que a oxidação da gordura não é dependente apenas do valor do pH, mas é também afetada pelo processo de fermentação em si.

Miguel et al. (2004) quantificaram a produção de malonaldeído em amostras de sorvete de iogurte tanto fermentadas com bactérias lácticas quanto com pH ajustado com ácido láctico. Entretanto, o “leite” de soja quando fermentado pelo cultivo de *Lactobacillus delbruecki* ssp. *bulgaricus* + *Streptococcus thermophilus*, mostrou-se menos susceptível à oxidação que o leite de vaca fermentado nas mesmas condições. O cultivo com *E. faecium* + *L. jugurti* foi menos efetivo na inibição e prevenção do processo de oxidação em relação ao cultivo tradicional de iogurte.

Material e Métodos

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

O material analisado constituiu-se de amostra de sorvete de “iogurte” à base de extratos de soja e de yacon fermentado com *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 e amostra de sorvete de “iogurte”, à base de extratos de soja e de yacon, não fermentado, mas sim acidificado com a adição de ácido láctico. As raízes de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) foram obtidas no comércio varejista de Araraquara – SP e o extrato de soja processado na UNISOJA/ FCF/ UNESP.

4.1.1. PREPARO DO MATERIAL

4.1.1.1. Preparo e manutenção da cultura láctica

Foi utilizada cultura pura de *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 procedente da coleção de culturas do Centro de Referência para Lactobacilos (CERELA) – San Miguel de Tucumán – Argentina. Esta cultura foi mantida congelada (-18°C) em um meio composto de leite em pó desnatado, reconstituído a 10% e suplementado com 1% de glicose, 0,5% de extrato de levedura e 5% de glicerol como protetor crioscópico. O inóculo foi preparado pela transferência de 10% da cultura de manutenção, reativada em leite em pó desnatado, reconstituído a 10% e esterilizado em autoclave (121°C/15 min). Em seguida, foi incubado em estufa bacteriológica a 37°C por 14-16 horas.

4.1.1.2. Obtenção do extrato de soja

O extrato solúvel de soja utilizado neste trabalho foi produzido na Unidade de Produção e Desenvolvimento de Derivados de soja – UNISOJA/ FCF/ UNESP, a partir de grãos de

soja (*Glycine max L. Merrill*) cultivar Foscarim. Os grãos decorticados e quebrados foram submetidos a tratamento térmico em banho de imersão em água a 97° C por 7 minutos, para cozimento e inativação da lipoxigenase (MAIA, 2005). Transcorrido este tempo, o aquecimento foi desligado e o material permaneceu no tanque por mais 7 minutos. Foi adicionado de antiespumante comercial (Gustaka Comercial Ltda.) e depois colocado na Unidade Básica de Extração com temperatura controlada a 60° C, sendo então transportado por uma rosca sem fim até as facas de trituração. O material triturado foi centrifugado e o extrato solúvel resultante ("leite" de soja natural) filtrado em tela de nylon de 120 micras. O extrato solúvel de soja foi pasteurizado a 120°C por 20 segundos. Na Figura 3 é apresentado o fluxograma de processamento do "leite" de soja.

4.1.1.3. Obtenção do extrato de yacon

As raízes de yacon, depois de descascadas e cortadas em pedaços de tamanhos homogêneos, foram colocadas numa solução contendo 0,5% de ácido cítrico e 0,03% de ácido ascórbico, a fim de evitar o escurecimento enzimático durante o manuseio. Em seguida, foi realizado o branqueamento por 15 minutos em água aquecida à 96°C, sendo então trituradas em liquidificador por 2 minutos em velocidade máxima. Por fim, o extrato de yacon foi padronizado a 4° Brix e estocado sob temperatura de refrigeração por um período de aproximadamente 24 horas. (PAULY-SILVEIRA, 2009). Na Figura 4 está representado todo o processo de obtenção do extrato de yacon em escala de laboratório.

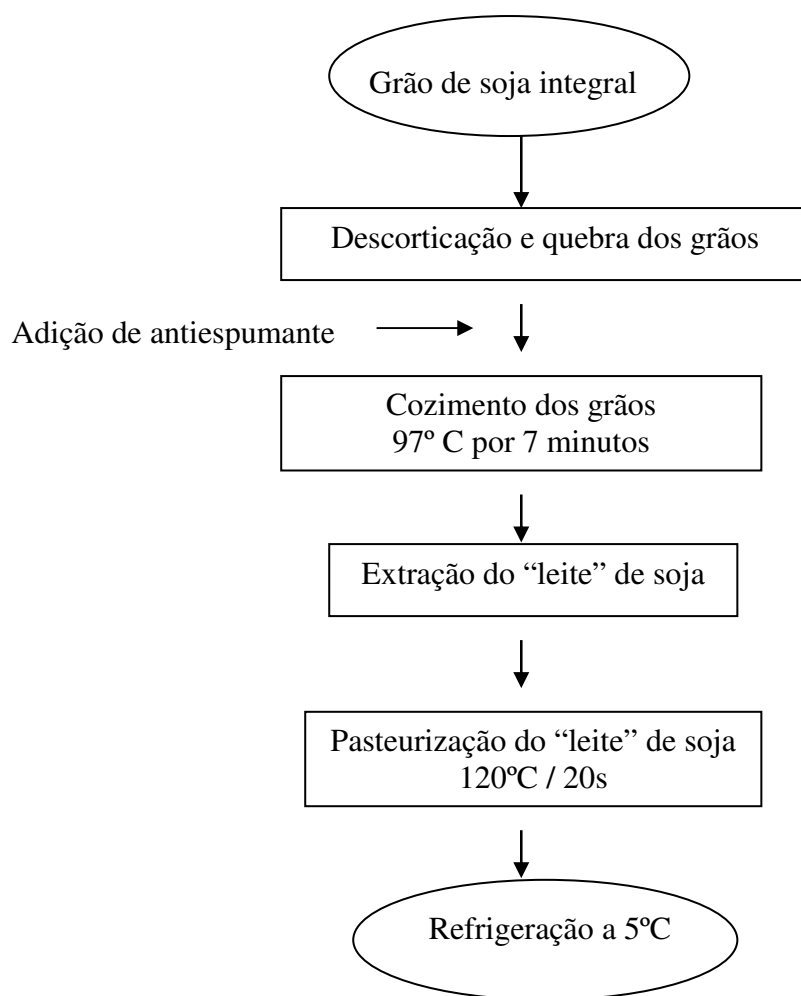


Figura 3. Fluxograma do processo de produção de extrato aquoso de soja.

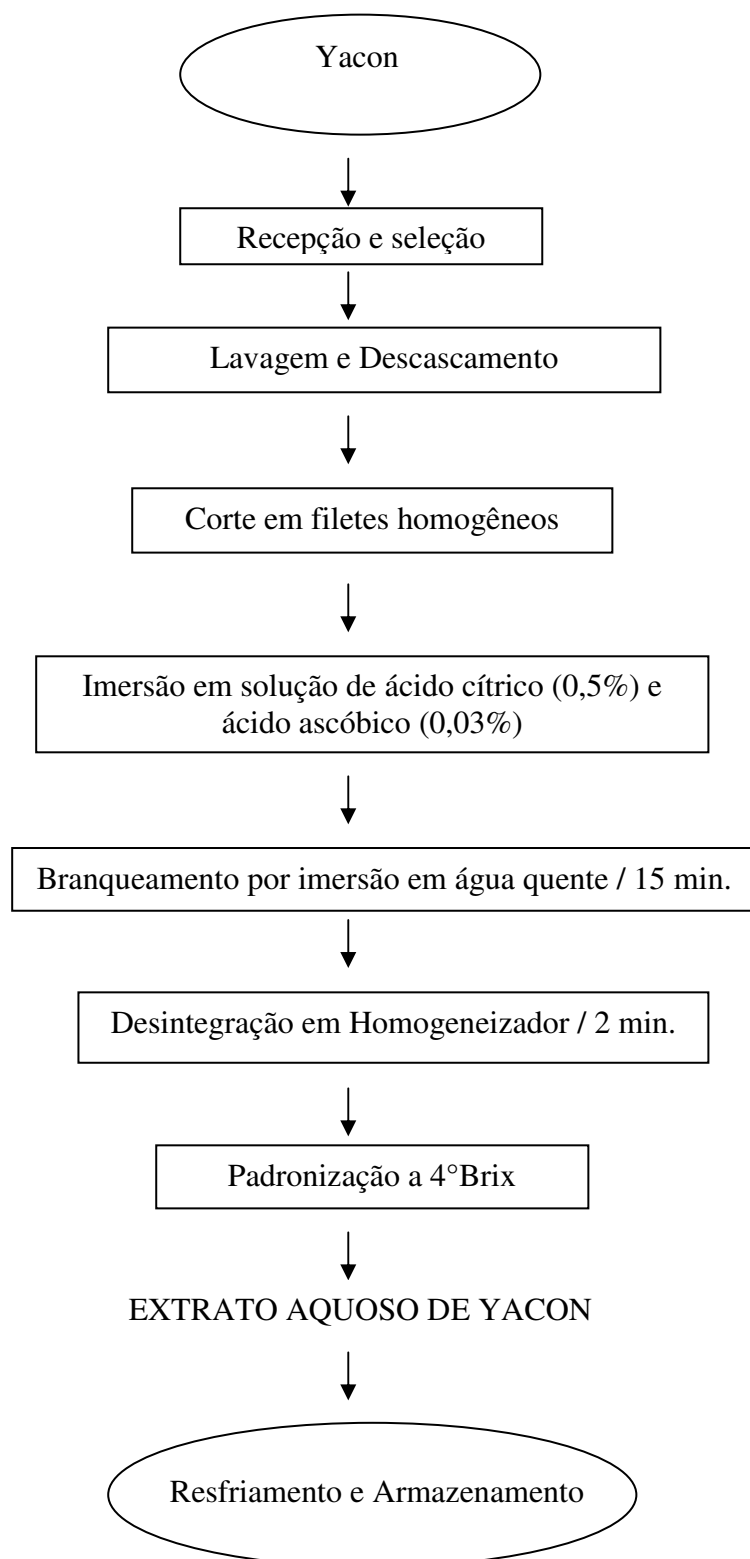


Figura 4. Fluxograma do processo de produção de extrato aquoso de yacon em escala de laboratório.

Fonte: PAULY-SILVEIRA (2009)

4.1.1.4. Obtenção dos “iogurtes” processados a base de extrato aquoso de soja e de yacon

Foram processados dois tipos de “iogurtes” no presente estudo: um produto com pH reduzido até 4,3 através da fermentação pela cultura *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 e o outro (sem fermentação) apresentando o mesmo valor de pH, alcançado com acidificação direta com ácido láctico, utilizado como controle no estudo de oxidação. Ambos foram processados seguindo metodologia básica proposta por Rossi et al. (1984) com algumas modificações, principalmente nas concentrações dos ingredientes.

Aos extratos de soja e de yacon foram adicionados óleo de soja (0,8%), lactose (1,0%) e emulsificante Recodan[®] (0,14%). A mistura obtida foi homogeneizada através de um agitador mecânico na velocidade máxima, durante 5 minutos, quando então foi submetida a um aquecimento controlado até atingir 50°C, adicionando-se o açúcar (6,0%) e, posteriormente, a 70°C, foi acrescentado o leite em pó (2,5%) e à 80°C, a gelatina (0,3%). Por fim, a temperatura foi elevada a 95°C e mantida por 5 minutos para que a “pasteurização” do meio fosse realizada. A mistura foi resfriada em banho de água e gelo até a temperatura de inoculação. A fermentação foi conduzida em temperatura de 37° até que o pH de 4,3 fosse alcançado. O produto já fermentado foi gradualmente resfriado até 30°C em banho de água e gelo para então ser transferido à temperatura de refrigeração (+/- 5°C).

A Figura 5 apresenta um fluxograma, que mostra de maneira simplificada o processamento empregado para a obtenção do produto.

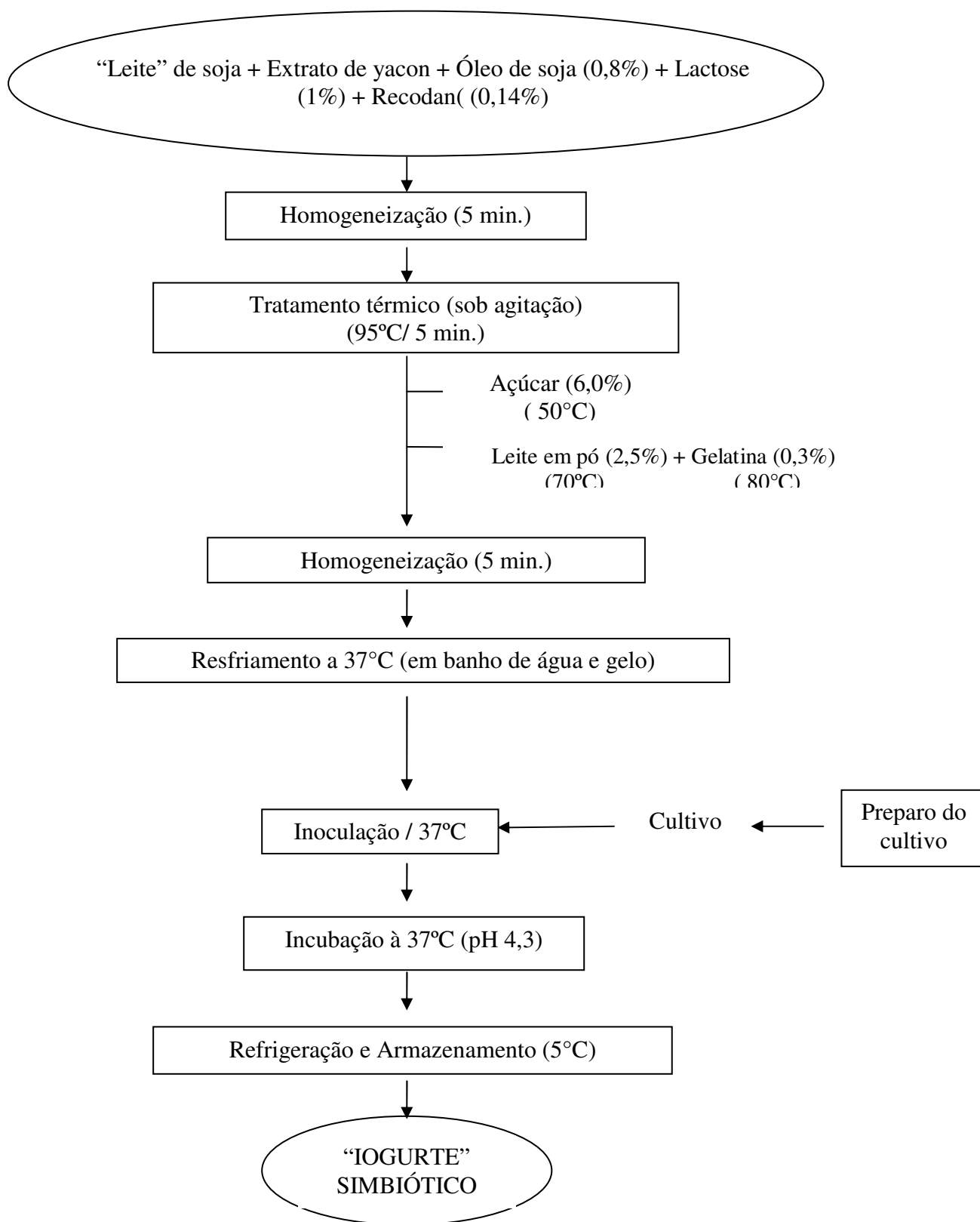


Figura 5. Fluxograma do processamento empregado para a obtenção do produto fermentado simbiótico.

4.1.1.5. Obtenção dos sorvetes de “iogurte” processados a base de extrato aquoso de soja e de yacon

As amostras de sorvete de “iogurte” foram processadas baseadas em metodologia proposta por Miguel e Rossi (2003). Ao “iogurte” de soja e de yacon foram adicionados, primeiramente, 160g de açúcar, 10g de Super Liga Neutra[®] (Duas Rodas), 130g de Selecta Cream[®] (Duas Rodas), 60g de Glicose Duas Rodas[®] (Duas Rodas) e 50g de Creme de soja (Nestlé). Essa mistura foi homogeneizada por 5 minutos em um agitador mecânico e em seguida adicionou-se 10g de Emustab[®] (Duas Rodas), sendo novamente agitada por mais três minutos, quando então foi transferida para o *freezer* por um período de uma hora para o desenvolvimento da maturação. A mistura resultante foi transferida para uma sorveteira marca MDG[®], modelo PHD 80-100. Essa máquina, tecnicamente denominada “artesanal”, não permite o controle de incorporação de “overrun” isto é, da quantidade de ar incorporada à massa, permitindo dessa forma, uma variação de “overrun” entre as amostras processadas. O sorvete foi então acondicionado em embalagens de isopor com capacidade para dois litros e estocado à temperatura de -23°C. As etapas do processamento das amostras de sorvete estão ilustradas nas Figuras 6 e 7.

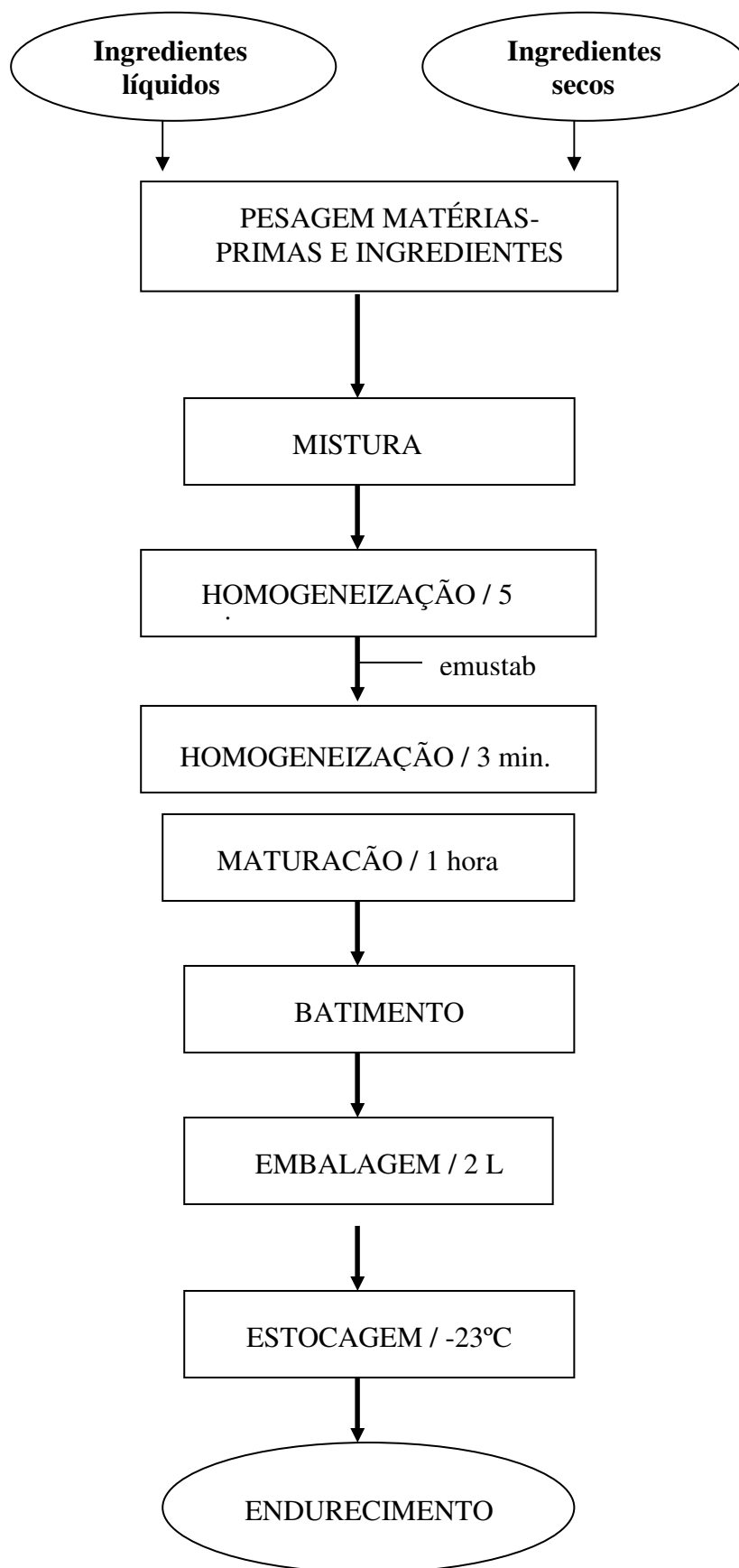


Figura 6 – Fluxograma do processamento dos sorvetes.



Figura 7 – Esquema dos equipamentos utilizados no processamento dos sorvetes de iogurte

4.2. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Parte I – Caracterização de *L. acidophilus* CRL 1014 quanto à resistência ao pH e a resistência a sais biliares.

Parte II – Desenvolvimento e avaliação sensorial do “iogurte” com emprego de diferentes concentrações de extratos de soja e yacon (Quadro 1).

Formulações	Extrato aquoso de soja (%)	Extrato aquoso de yacon (%)
Formulação 1	100	Zero
Formulação 2	75	25
Formulação 3	50	50
Formulação 4	25	75
Formulação 5	Zero	100

Quadro 1 - Formulações dos “iogurtes” com diferentes concentrações de extrato de soja e de yacon.

- Determinação da viabilidade de *L. acidophilus* CRL 1014.

Parte III – Processamento das amostras de sorvete de “iogurte” a partir do “iogurte” de maior aceitação e avaliação dos produtos:

- Avaliação sensorial, quanto à aparência, ao aroma, à textura, ao sabor e à impressão global, logo após o processamento e depois com 90 e 180 dias de armazenamento.
- Avaliação microbiológica (contagem total de *L. acidophilus* CRL 1014) durante o período de 180 dias;
- Determinação do grau de oxidação durante o período de 180 dias;
- Composição centesimal;
- Valor calórico;
- Determinação da concentração de oligossacarídeos;

4.3. MÉTODOS

4.3.1. Caracterização de *L. acidophilus* CRL 1014 quanto à resistência a sais biliares

Neste ensaio foi utilizada a metodologia básica de Gilliland et al. (1984), baseada no tempo necessário para que o crescimento dos microrganismos em análise fosse suficiente para provocar um aumento de 0,3 unidades de densidade óptica (DO_{560}) frente a diferentes concentrações de sais biliares. As células lavadas de *L. acidophilus* CRL 1014 foram incubadas em tubos contendo o meio MRS, suplementados com Oxgall (SIGMA-Aldrich) nas concentrações 0,1; 0,2; 0,3 e 0,5%, e incubadas a 37°C. Um tubo sem Oxgall foi utilizado como controle (pH 6,9). Foram realizadas leituras espectrofotométricas em triplicata, a cada 20 minutos, por um período de 3 horas. O tempo de retardo de crescimento do microrganismo frente a diferentes concentrações de Oxgall foi calculado pela diferença entre DO_{560} do grupo controle e dos demais tubos, até que fosse alcançado um aumento de 0,3 unidades de DO_{560} (REDONDO, 2008).

4.3.2 Caracterização de *L. acidophilus* CRL 1014 quanto à resistência às condições ácidas

Mais uma vez foi utilizada a metodologia básica de Gilliland et al. (1984), baseada no tempo necessário para que o crescimento dos microrganismos em análise fosse suficiente para provocar um aumento de 0,3 unidades de densidade óptica (DO_{560}), em diferentes pH. As células lavadas de *L. acidophilus* CRL 1014 foram incubadas em tubos que continham o meio MRS com pH ajustado para 1,5; 2,0; 3,0 e 4,0 com ácido clorídrico a 1M, e incubadas a 37°C. Foram utilizados tubos controle com pH 6,9 para o meio de cultivo MRS. Realizaram-se leituras espectrofotométricas em triplicata, a cada 30 minutos por um período de 2 horas. O tempo de retardo de crescimento do microrganismo frente aos diferentes pH foi calculado pela

diferença entre DO_{560} do grupo controle e dos demais tubos, até que fosse alcançado um aumento de 0,3 unidades de DO_{560} (REDONDO, 2008).

4.3.3. Determinação da viabilidade das bactérias lácticas

Tanto no “iogurte” quanto no sorvete foi avaliado o número de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus*, seguindo metodologia proposta por Lopez et al. (1998), com as seguintes modificações: acidificação do meio com ácido acético glacial até atingir pH 5,4 e incubação em condições anaeróbicas à 37°C por 72 horas.

4.3.4. Análise Sensorial

As formulações dos diferentes “iogurtes” e dos sorvetes foram avaliadas sensorialmente, por análise de aceitação em relação à aparência, ao aroma, ao sabor, a textura e a impressão global, de acordo com metodologia proposta por Stone e Sidel (1992). Os provadores (80 provadores não treinados) utilizaram escala hedônica, estruturada, de 9 pontos, ancoradas nos extremos pelos termos “gostei muitíssimo” e “desgostei muitíssimo”.

As amostras foram codificadas utilizando-se números com três dígitos, ao acaso, e servidas à temperatura de congelamento, em horários não muito próximos das refeições principais.

O teste foi realizado em cabines individuais providas de abastecimento de água filtrada e cuspidouro, instaladas em laboratório apropriado, com suficiente iluminação artificial. As amostras foram servidas aos provadores de forma monádica, em copos plásticos de 50mL.

4.3.5. Determinação do grau de oxidação da gordura

O teste de oxidação de gordura do sorvete foi realizado através do teste de TBA (ácido tiobarbitúrico) que é um método comumente utilizado para determinar a rancidez oxidativa dos lipídeos. O malonaldeído, um produto secundário da oxidação de ácido graxos polinsaturados, reage com TBA formando um complexo colorido que apresenta absorção máxima entre 520-532nm (DAHLE et al., 1962). Este teste foi realizado a cada 30 dias de armazenamento até o período final da vida útil do produto.

Para a determinação do grau de oxidação das amostras em estudo foi adotado o método de Rosmin et al. (1996) modificado por Miguel et al. (2004). Em um tubo de centrífuga, colocou-se 2g de sorvete mais 5mL de TBA (0,02M) e 10mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10%. Após centrifugação por 5 minutos a 3500 rpm, o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro Whatman nº1 e uma alíquota de 8mL do filtrado foi transferida para um tubo de ensaio de tampa rosqueável. Colocou-se o tubo em banho-maria por 35 minutos à 100°C, para desenvolvimento da cor relativa à reação, sendo resfriado logo em seguida quando então a absorbância foi medida em espectrofotômetro à 532 nm.

Foi realizada uma curva padrão a partir de uma solução estoque (1×10^{-3} M) de 1,1,3,3 – tetraetoxipropano (TEP), utilizando concentrações de 10, 30, 40, 50, 60 e 70µl de TEP. Vale ressaltar que o malonaldeído pode ser obtido pela hidrólise ácida do TEP em uma reação equimolar (GRAY, 1978).

4.3.6. Avaliações físico-químicas dos sorvetes de “iogurte”

- **Determinação dos Frutooligossacarídeos do Tipo Inulina**

As amostras do sorvete simbiótico foram diluídas com água destilada até 1°Brix. Em seguida foram centrifugadas a 12.879 g/ 8 min e filtradas em membrana (Millipore) 0,22 µm diretamente para o frasco amostrador do HPLC (Varian, modelo Pró Star 410).

Os frutooligossacarídeos foram determinados por cromatografia líquida de alta resolução, em equipamento provido de duas bombas binárias, amostrador automático e detector de índice de refração, segundo metodologia descrita por Vidal-Valverde et al. (1993). Foi utilizada coluna Shim-Pack CLCNH2 (250 mm) da marca Shimadzu. A fase móvel foi composta por acetonitrila: água (75:25) em fluxo de 1mL/min, com temperatura de 25°C e tempo de análise de 30 minutos. Foram utilizados padrões inulina provenientes de dália (*Dahlia variabilis*) e de chicória (*Cichorium intybus*), lactose e maltose (Sigma Chemical Co., St. Louis-Missouri) em concentração de 1% (p/v).

- **Umidade e Sólidos Totais**

As determinações de umidade e de sólidos totais das formulações foram realizadas a partir da determinação gravimétrica de voláteis a 95°C em estufa com circulação de ar, até peso constante (AOAC, 1995).

- **Cinzas**

O teor de cinzas foi determinado gravimetricamente através do resíduo mineral fixo obtido em mufla à 550°C, até peso constante (AOAC, 1995).

- **Lipídeos**

O teor lipídico do sorvete foi determinado pelo método Bligh-Dyer (AOAC, 1995).

- **Proteínas**

O teor protéico foi definido por meio da determinação do nitrogênio total pelo método de Kjeldahl, utilizando-se o fator de conversão 6,0, específico para produtos de soja (AOAC, 1995).

- **Carboidratos**

Estimado a partir da fração NIFEXT, diminuindo-se a soma dos demais constituintes de 100. A diferença foi expressa como a parcela de carboidratos para 100g do produto.

- **Valor Calórico**

Através dos resultados das análises de carboidratos, proteínas e gordura, foi estimado o valor calórico do produto, considerando-se proteínas, gorduras e carboidratos como aportando, 4, 9 e 4 Kcal/g, respectivamente. O resultado foi expresso em kcal/100g de produto.

4.3.7. Análise estatística dos resultados

Os valores médios obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) pelo programa SIGMASTAT e por teste de médias de Tukey e Teste de *t*. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Resistência do *L. acidophilus* CRL 1014 à sais biliares

Para resistir às condições do trato gastrointestinal as culturas probióticas devem apresentar tolerância à bile e capacidade de hidrólise de sais biliares, além de resistir às condições ácidas do estômago (KLAENHAMMER e KULLEN 1999). A bile, secretada no fígado e lançada no intestino delgado, reduz a sobrevivência das bactérias por destruir sua membrana celular, cujos principais componentes são os lipídeos e ácidos graxos (GILLILAND e SPECK, 1987). Bactérias probióticas variam consideravelmente em seus níveis de tolerância à bile. A resistência aos sais biliares varia muito entre as espécies de *Lactobacillus* e também entre as cepas (PENNACHIA et al., 2004), o que torna difícil definir a concentração máxima a que um microrganismo deva suportar para ser considerado bile-resistente. Vale ressaltar também que a concentração desta substância no intestino não é estática, variando em função do tempo e em diferentes partes do trato intestinal (MARTEAU et al. 1997).

No presente estudo verificou-se a sensibilidade de *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 frente a diferentes concentrações de Ovgall (mistura de sais biliares), levando-se em consideração o tempo gasto para este microrganismo promover um aumento na densidade ótica (DO₅₆₀) do meio de cultivo em 0,3 unidades, em relação ao grupo controle. Os resultados encontrados (Tabela 3), evidenciam um retardo de 45 minutos no desenvolvimento frente à concentração máxima de Ovgall (0,5%).

Sanders et al. (1996), avaliando cultivos de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium*, concluíram que todas as culturas de lactobacilos e a maior parte das culturas de bifidobactérias foram resistentes à variadas concentrações de sais biliares (1,0 a 3,0%).

Tabela 3. Tempo (minutos) de retardo no crescimento de *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 na presença de diferentes concentrações de sais biliares.

	Concentrações de Ovgall (p/v)			
	0,1%	0,2%	0,3%	0,5%
Tempo (min.)	10	19	30	45

Rossi et al. (1999) realizaram um estudo no qual foi determinada a resistência frente aos sais biliares de vários microrganismos: *Enterococcus faecium* CRL 183, *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 73, *Streptococcus thermophilus* 85 e *Lactobacillus acidophilus*. Os resultados mostraram que *Enterococcus faecium* apresentou o menor retardo no crescimento em todas as concentrações testadas (0,2 – 0,5% de Ovgall), seguido de *L. helveticus* ssp *jugurti*. Quanto a *Lactobacillus acidophilus*, os autores também relataram que este microrganismo apresentou crescimento (variação de DO_{560}) muito lento na concentração máxima de Ovgall (0,5%), isto é, mostrou um retardo de 160 minutos em relação ao controle, tempo maior que o verificado em nosso estudo.

A Figura 8 ilustra o comportamento de *L. acidophilus* CRL 1014 frente às diferentes concentrações de Ovgall utilizadas no estudo.

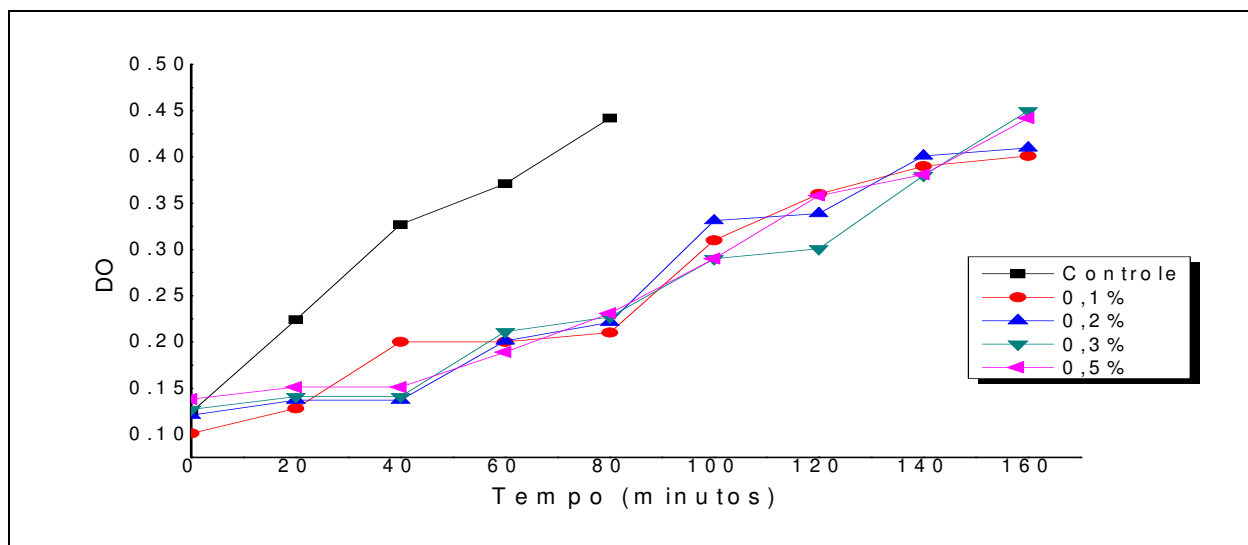


Figura 8. Crescimento de *L. acidophilus* CRL 1014 frente a diferentes concentrações de Osgall

5.2. Resistência de *L. acidophilus* CRL 1014 às condições ácidas

Grande parte das bactérias é destruída quando passam pelo estômago devido a presença do suco gástrico que é um dos melhores mecanismos de defesa contra microrganismos patogênicos. Aproximadamente 2,5 litros de suco gástrico são secretados diariamente, com um pH próximo a 2,0 e uma concentração de sal em torno 0,5% p/v (HILL, 1990). Essa secreção representa uma barreira enzimática e de pH que é letal à maioria dos microrganismos ingeridos. Dessa maneira, para que um microrganismo possa aderir ao epitélio intestinal e se desenvolver, para então ser considerado um probiótico, é necessário que ele resista a todas estas barreiras do trato gastrintestinal (MARTEAU et al, 1993).

A sobrevivência das bactérias ao suco gástrico depende da sua habilidade em tolerar o baixo pH, sendo que o pH do ácido clorídrico secretado no estômago é de 0,9, que em presença de alimento aumenta para 3,0 (ERKKILA e PETAJA, 2000). Segundo vários pesquisadores (GUPTA et al, 1996 ; GOMEZ-GIL et al, 1998 ; PARK et al., 2006), uma

bactéria probiótica deve sobreviver entre os pH 2,0 e 3,0, durante 3 horas. Já na avaliação de Bernardeau et al. (2001) que testaram a resistência de culturas de *L.acidophilus* e *L.rhamnosus* à passagem pelo estômago, o tempo de permanência para que as culturas possam ser consideradas potencialmente probióticas é de 90 minutos em pH 3,0.

Os resultados relativos à resistência ao pH de *L. acidophilus* CRL 1014, ao longo de 120 minutos, encontram-se apresentados na Tabela 4. De maneira geral, esse microrganismo se desenvolveu bem nos diferentes valores de pH. Nos pH 1,5 e 2,0 foi observado um pequeno tempo de retardo no seu crescimento, em relação ao controle (19 e 24 minutos, respectivamente). Entretanto, nos valores de pH de 3,0 e 4,0 foram observados valores de tempos negativos, o que indica que ele se desenvolveu mais rápido do que no pH controle (6,9), demonstrando a sua preferência por valores de pH mais ácidos.

Tabela 4. Tempo (minutos) de retardo no crescimento de *L. acidophilus* CRL 1014 frente a diferentes pH.

	pH			
	1,5	2,0	3,0	4,0
Tempo (min.)	19	24	(-)*10	(-)*15

- valores negativos indicam que os tempos de crescimento foram inferiores ao do controle.

Essa resistência a baixos valores de pH demonstrada por *L. acidophilus* CRL 1014 explica-se por uma característica específica em sua estrutura molecular. Segundo Rius et al., (1994) *L. acidophilus* pode apresentar um citoplasma com alta capacidade tamponante (pH 3,72 a 7,74), favorecendo sua resistência a mudanças do pH e ganho de estabilidade em condições ácidas.

A Figura 9 ilustra melhor o comportamento de *L. acidophilus* CRL 1014 frente a diferentes valores de pH.

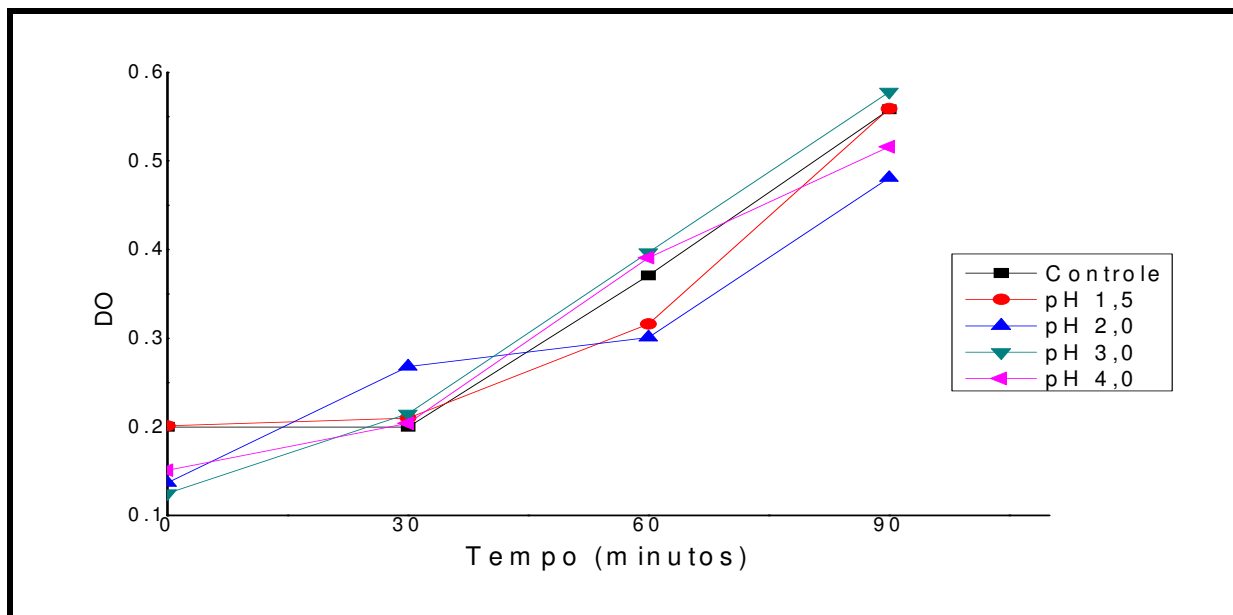


Figura 9. Perfil de crescimento de *L. acidophilus* CRL 1014 frente a diferentes valores de pH.

Chou e Weimer (1999) trabalharam com culturas de *Lactobacillus acidophilus* em condições ácidas (pH 3,5) por 90 minutos e obtiveram resultados de tolerância à 37°C para todas as culturas testadas.

Em concordância com os resultados do presente estudo, Shinoda et al (2001) demonstraram que *Lactobacillus helveticus* CP53 desenvolve-se bem em pH 3,0; 4,0; 5,0 e 6,5. Redondo (2008), em estudo com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 relatou que esses microrganismos são resistentes às condições ácidas do suco gástrico, porém, verificou também, uma superioridade na resistência apresentada pela cepa de *Lactobacillus*, demonstrando que esse microrganismo também cresceu melhor em condições ácidas do que em pH neutro (controle).

Pelos resultados alcançados, é possível afirmar que *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 apresenta características que permitem considerá-lo, a princípio, como um

microrganismo probiótico. Entretanto, outras propriedades, como por exemplo, a capacidade de adesão ao epitélio intestinal, deverão ser avaliadas, além, evidentemente, dos eventuais efeitos benéficos à saúde.

5.3 - Desenvolvimento do “iogurte”

Nos diversos estudos de Rossi e colaboradores relativos ao “iogurte” de soja (Rossi, et al., 1984; Rossi, et al., 1989; Rossi et al. 1999) observa-se que a formulação desse produto encontra-se bem estabelecida, tanto do ponto de vista sensorial quanto tecnológico. Entretanto, ao se modificar o cultivo bacteriano e também a mistura básica a ser fermentada, fez-se necessário acompanhar todo o processo visando definir a viabilidade tecnológica desse novo produto à base de extratos de soja e de yacon, fermentado com cultivo de *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014.

Durante todo o período de fermentação dos “iogurtes” realizou-se o acompanhamento do pH, em intervalos de aproximadamente 1 hora (Figura 10). A redução do pH é consequência da atividade metabólica de bactérias lácticas, indicando, a adequação do meio (substrato) ao seu desenvolvimento. Valores baixos de pH podem favorecer um determinado grupo bacteriano em detrimento de outro. No caso da fermentação do iogurte, bactérias do gênero *Lactobacillus* crescem e toleram valores de pH mais baixos do que as pertencentes ao gênero *Streptococcus* (TAMIME e ROBINSON, 1991).

Analisando as curvas de pH (Figura 10) resultantes do processo de fermentação pelo *L. acidophilus* CRL 1014, pôde-se constatar que a formulação de “iogurte” desenvolvido com 100% de extrato de soja (sem extrato de yacon) atingiu o pH pré-estabelecido de 4,3 (compatível com iogurtes convencionais) no período total de 7,5 horas de incubação à 37°C.

Para a amostra processada com 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon, o pH foi alcançado após 8,5 horas, nas mesmas condições de incubação. Para a formulação do “iogurte” com 50% de extrato de soja e de yacon foi necessário um período maior ainda (9,5 horas) para que o pH de 4,3 fosse atingido, enquanto que para uma concentração maior de yacon (75% e 100%) os tempos de fermentação foram superiores às 9,5 horas. Percebe-se, portanto, que quanto maior a concentração de extrato de yacon presente nas formulações maior é o tempo necessário para as amostras atingirem o pH estipulado, embora essa variação de tempo tenha ficado entre 7,5 a 9,5 horas, exceto, para as formulações 4 e 5 (constituídas por 75 e 100% de extrato de yacon, respectivamente) que ultrapassaram o período de 10,5 horas.

Apesar desses tempos terem sido superiores ao verificado no processamento de iogurtes convencionais, ainda assim, foram menores que os verificados em outros estudos similares, também realizados com *L. acidophilus* (OLIVEIRA e DAMIN, 2003; OLSON e ARYANA, 2008) .

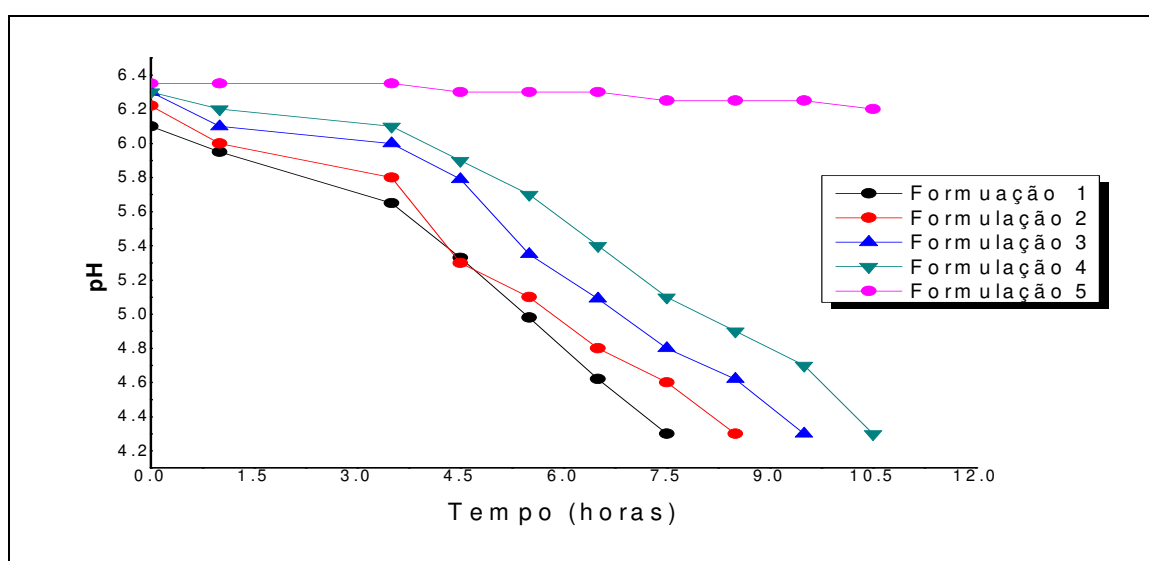


Figura 10 – Valores de pH observados durante a fermentação dos diferentes “iogurtes”. Formulação 1: iogurte com 100% de extrato de soja; Formulação 2: iogurte com 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon; Formulação 3: iogurte com 50% de extrato de soja e 50% de extrato de yacon; Formulação 4: iogurte com 25% de extrato de soja e 75% de extrato de yacon; Formulação 5: 100% de extrato de yacon.

Vale salientar que o produto utilizando-se apenas o extrato de yacon (sem a associação com extrato de soja), possivelmente não apresentou redução do pH pela sua alta concentração de carboidratos, que somada à sacarose adicionada no processo (6%) pode ter inibido o crescimento dos microrganismos do “iogurte”. Estudos comprovaram uma diminuição na velocidade de produção de ácido por *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* quando se aumenta a concentração de açúcar de 6 para 12%, provocando um efeito osmótico adverso e diminuindo de forma significativa a atividade de água do meio (TAMIME e ROBINSON, 1991).

Vários são os fatores que podem interferir no processo fermentativo, destacando-se, dentre eles, a fonte e o tipo de carboidratos, associação e concentração do inóculo.

De modo geral, o “leite” de soja, por si só, não se constitui em um bom meio para o desenvolvimento das culturas lácticas, o que já é bastante elucidado por pesquisadores da área. Dentro deste contexto, a suplementação do “leite” de soja com fontes de carboidratos fermentescíveis vem sendo utilizada, possibilitando o crescimento da cultura láctica e obtendo a acidez desejável em um tempo significativamente menor (WANG e ASCHERI, 1991).

Oliveira e Damin (2003) processaram doze lotes de leites fermentados preparados a partir de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus*; *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus rhamnosus*. Parâmetros cinéticos para a diminuição do pH até 4,5 foram calculados. O tempo para atingir esse pH variou conforme a co-cultura empregada: 5,5h para *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a 12,5h para *L. acidophilus* e *L. rhamnosus*.

Olson e Aryana (2008) analisaram o efeito de diferentes concentrações de *L. acidophilus* no processamento de iogurte. O tempo de fermentação necessário para atingir o pH de 4,5 aumentou proporcionalmente ao aumento da quantidade de inóculo empregado, variando de 7,5 a 10,5h.

A adição de bactérias probióticas aos produtos lácteos apresenta uma série de dificuldades, sendo o longo tempo de fermentação uma das principais. De um modo geral, as bactérias bífidas crescem pouco no leite, produzindo pouco ácido, resultando em um tempo de fermentação prolongado. Essas bactérias exigem um baixo potencial de oxi-redução (Eh) para iniciar o desenvolvimento, além de fatores de crescimento. A produção de ácido é crítica e define as características de qualidade e a vida de prateleira esperada para o produto. Uma alternativa para melhorar essa situação é o emprego de ajustadores biológicos. O emprego de bio-ajustadores em produtos probióticos tem como finalidade básica resolver problemas de sabor, aroma e textura; aumentar a taxa de crescimento e diminuir o tempo de fermentação; além de garantir o processo fermentativo evitando problemas de contaminação (FERREIRA, 2001).

5.3.1 – Análise Sensorial dos diferentes “iogurtes”

Os testes sensoriais foram realizados nas amostras de “iogurte” processadas com diferentes concentrações de extratos de soja e de yacon (Quadro 1) com o intuito de se verificar qual a formulação que apresentaria a melhor aceitação em relação aos atributos aparência, aroma, sabor, textura e impressão global e dessa maneira servir de base para o desenvolvimento da segunda etapa do presente estudo, que consiste no processamento de amostras de sorvete de “iogurte”. Na Tabela 5 estão apresentados os resultados obtidos na avaliação sensorial dos diferentes produtos processados

Tabela 5- Médias de aceitação dos diferentes produtos fermentados.

	Aparência	Aroma	Textura	Sabor	I. Global
Formulação 1	6,34± 1,44 ^a	6,22 ± 1,37 ^a	6,88 ± 1,64 ^a	6,27 ± 1,72 ^a	6,38 ± 1,44 ^a
Formulação 2	6,06± 1,52 ^a	6,52 ± 1,64 ^a	6,81 ± 1,59 ^{ab}	5,74 ± 1,47 ^{ab}	6,04 ± 1,56 ^a
Formulação 3	5,26± 1,80 ^b	6,14 ± 1,74 ^a	5,34 ± 1,88 ^{bc}	5,02 ± 1,49 ^b	5,33 ± 1,65 ^b
Formulação 4	4,73± 1,46 ^c	5,88 ± 1,88 ^a	4,28 ± 1,52 ^c	4,10 ± 1,00 ^c	4.32 ± 2,47 ^c

Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; n=80 provadores

Formulação 1: iogurte com 100% de extrato de soja; Formulação 2: iogurte com 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon; Formulação 3: iogurte com 50% de extrato de soja e 50% de extrato de yacon; Formulação 4: iogurte com 25% extrato de soja e 75% extrato de yacon

De maneira geral, os resultados sensoriais (Tabela 5) revelam que as formulações 1 (iogurte com 100% de extrato de soja) e 2 (iogurte com 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon) foram as de maior aceitação e não apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,05$) para nenhum dos atributos sensoriais, embora, a formulação 1 tenha obtido as maiores médias em termos absolutos para todos os atributos, exceto para o atributo aroma. A formulação 4 (iogurte com 25% de extrato de soja e 75% de extrato de yacon) foi a amostra que apresentou as menores médias em termos absolutos, seguida da formulação 3 (iogurte com 50% de extrato de soja e 50% de extrato de yacon).

A primeira impressão que se tem de um alimento é geralmente visual, sendo que, a aparência é um dos aspectos considerados fundamentais na qualidade e aceitação do produto. No que diz respeito ao quesito aparência, os resultados obtidos mostram que a formulação 1 obteve as maiores médias diferindo estatisticamente das formulações 3 e 4, sem, entretanto, diferir da formulação 2.

O aroma do iogurte depende da cultura empregada no seu processamento e de seu metabolismo durante a fermentação. Pelos resultados obtidos para o atributo aroma das amostras de “iogurte” desenvolvidas neste estudo, percebe-se que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre elas.

Outro parâmetro sensorial analisado foi a textura. De acordo com os resultados expressos na Tabela 5 verifica-se que a formulação 1 apresentou a maior média em termos absolutos sem diferir estatisticamente da formulação 2, mas diferindo das formulações 3 e 4. A formulação 3 se mostrou sem diferença significativa das amostras 2 e 4. O fato do extrato de yacon apresentar-se com uma textura levemente arenosa pode ter contribuído para que as amostras que continham maior concentração deste extrato apresentassem resultados inferiores. Resultados semelhantes também foram observados por Pauly-Silveira (2009) no desenvolvimento de um produto fermentado por *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416, no qual foram empregados, simultaneamente, os extratos aquosos de soja e de yacon (rico em inulina).

Para o atributo sabor, nota-se o mesmo comportamento para as formulações 1 e 2, isto é, não diferiram estatisticamente entre si, embora a formulação 1 tenha se revelado superior em termos de valores absolutos. Novamente a formulação 4 apresentou a menor média diferindo das demais formulações. Um aspecto de grande valia que deve ser ressaltado é que o “flavor” constitui um dos principais fatores que afetam a aceitação de um produto alimentício. Nesse sentido, é possível que a aceitação das amostras processadas neste estudo, possa ser melhorada através da aromatização, já que as amostras de “iogurte” analisadas foram apresentadas aos julgadores sem adição de aromas, com o propósito principal de não inibir os sabores característicos.

Finalmente, para o atributo impressão global, que acaba por refletir a somatória dos demais atributos, fica demonstrada a superioridade das formulações 1 e 2, uma vez que não diferiram entre si mas diferiram estatisticamente das formulações 3 e 4, sendo esta última a que apresentou as menores médias para todos os atributos sensoriais analisados.

De maneira geral pode-se observar que as médias de aceitação dos atributos avaliados diminuem à medida que se aumenta a concentração de extrato de yacon nas amostras de “iogurte”, em parte devido à “arenosidade” conferida por ele e em parte pelo fato dos consumidores não estarem habituados ao seu paladar característico.

Especificamente, em relação à formulação 2, é importante destacar que as médias obtidas se situaram na faixa do conceito “gostei” (acima de 5,0) para todos os atributos avaliados, o que confere a este produto um bom potencial de aceitação.

Os resultados obtidos nos testes de aceitação também encontram-se apresentados por meio de gráficos de *Boxplot* (Figuras 11 a 15), demonstrando a dispersão, amplitude e mediana de todas as formulações dos “iogurtes” desenvolvidas no experimento, avaliando cada atributo (aparência, textura, aroma, sabor, e impressão global), separadamente.

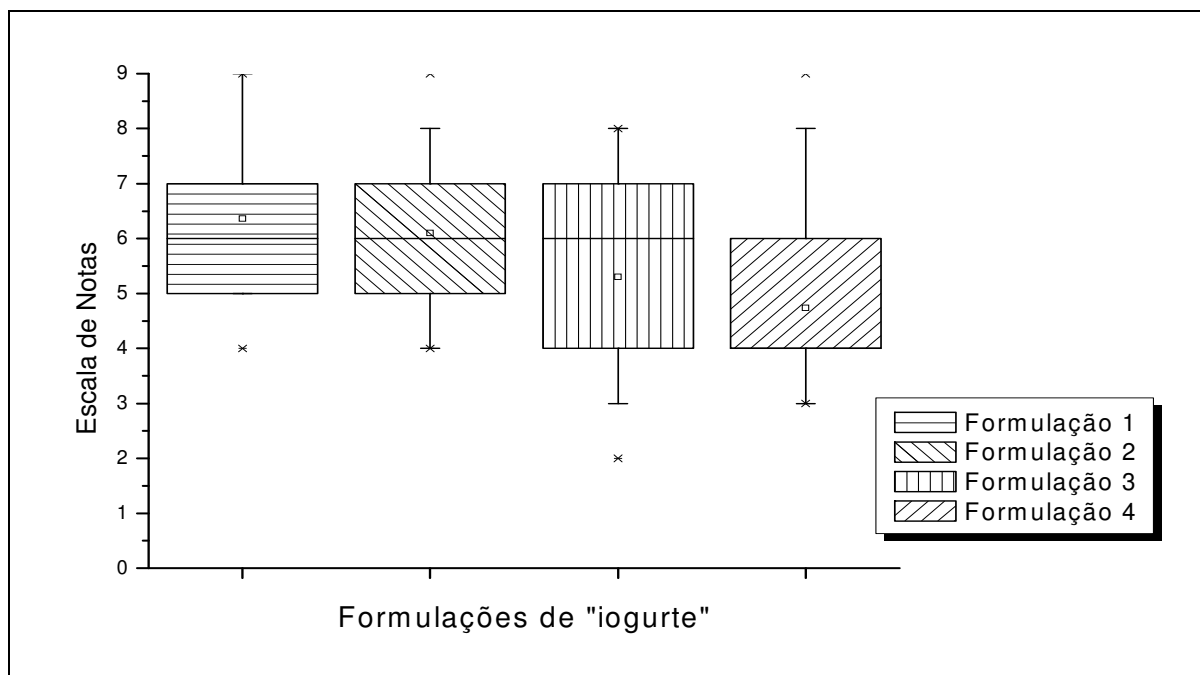


Figura 11 - Gráfico de *Boxplot* para as amostras de “iogurte”, referente ao atributo “aparência”.

Formulação 1: “iogurte” com 100% de extrato de soja; Formulação 2: “iogurte” com 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon; Formulação 3: “iogurte” com 50% de extrato de soja e 50% de extrato de yacon; Formulação 4: “iogurte” com 25% de extrato de soja e 75% de extrato de yacon.

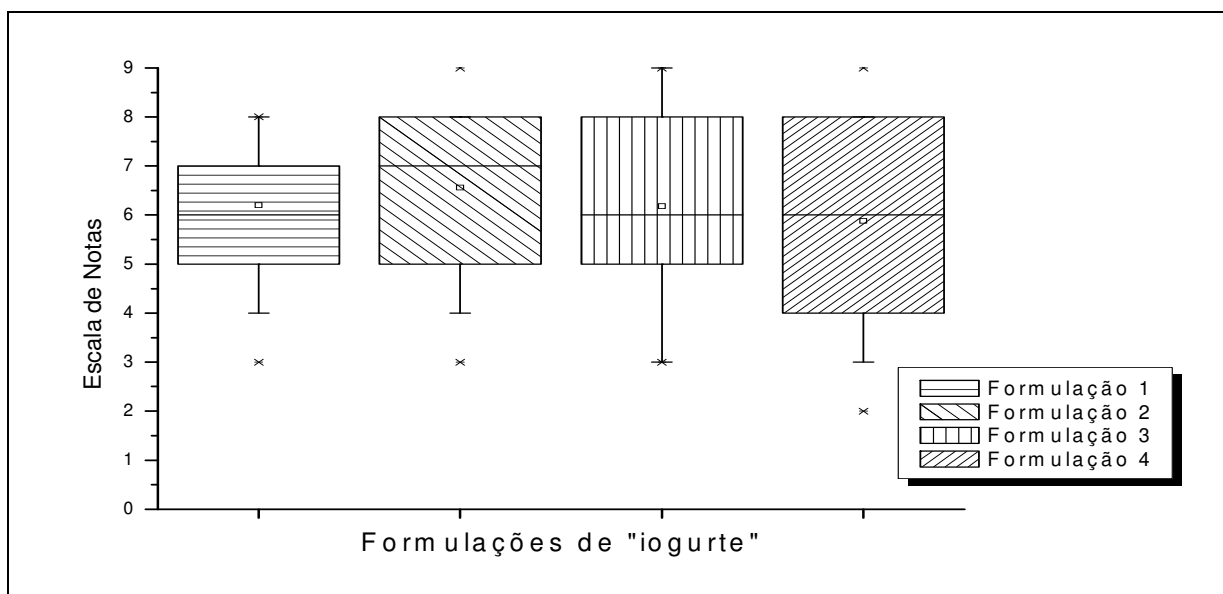


Figura 12 - Gráfico de *Boxplot* para as amostras de “iogurte”, referente ao atributo “aroma”.

Formulação 1: “iogurte” com 100% de extrato de soja; Formulação 2: “iogurte” com 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon; Formulação 3: “iogurte” com 50% de extrato de soja e 50% de extrato de yacon; Formulação 4: “iogurte” com 25% de extrato de soja e 75% de extrato de yacon.

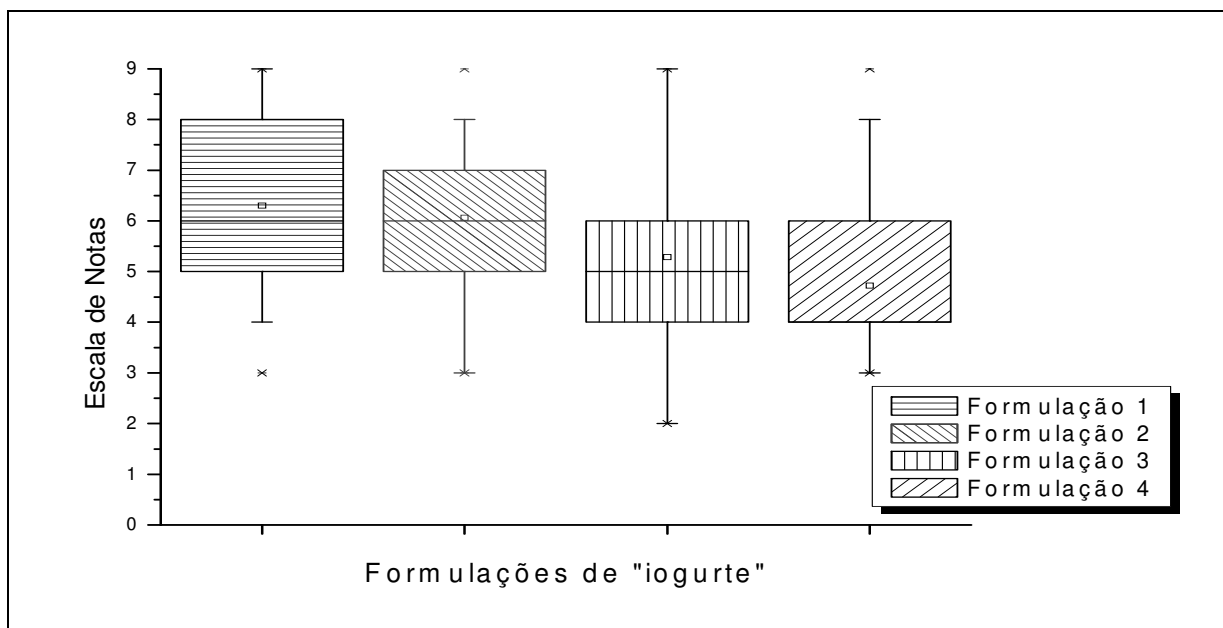


Figura 13 - Gráfico de *Boxplot* para as amostras de “iogurte”, referente ao atributo “textura”.
 Formulação 1: “iogurte” com 100% de extrato de soja; Formulação 2: “iogurte” com 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon; Formulação 3: “iogurte” com 50% de extrato de soja e 50% de extrato de yacon; Formulação 4: “iogurte” com 25% de extrato de soja e 75% de extrato de yacon.

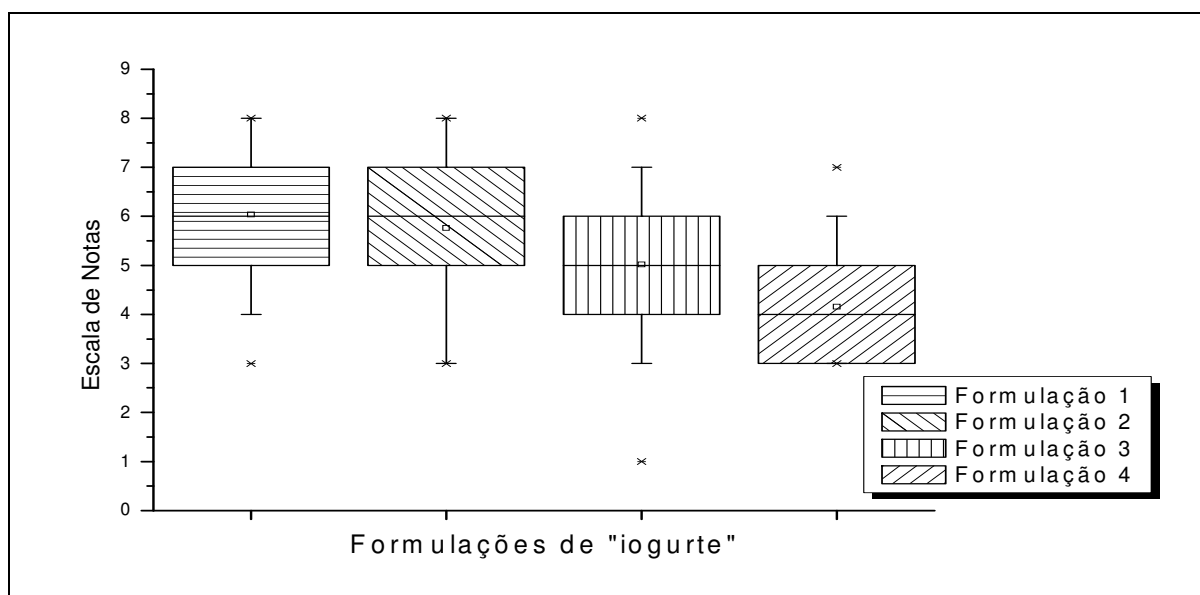


Figura 14 - Gráfico de *Boxplot* para as amostras de “iogurte”, referente ao atributo “sabor”.
 Formulação 1: “iogurte” com 100% de extrato de soja; Formulação 2: “iogurte” com 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon; Formulação 3: “iogurte” com 50% de extrato de soja e 50% de extrato de yacon; Formulação 4: “iogurte” com 25% de extrato de soja e 75% de extrato de yacon.

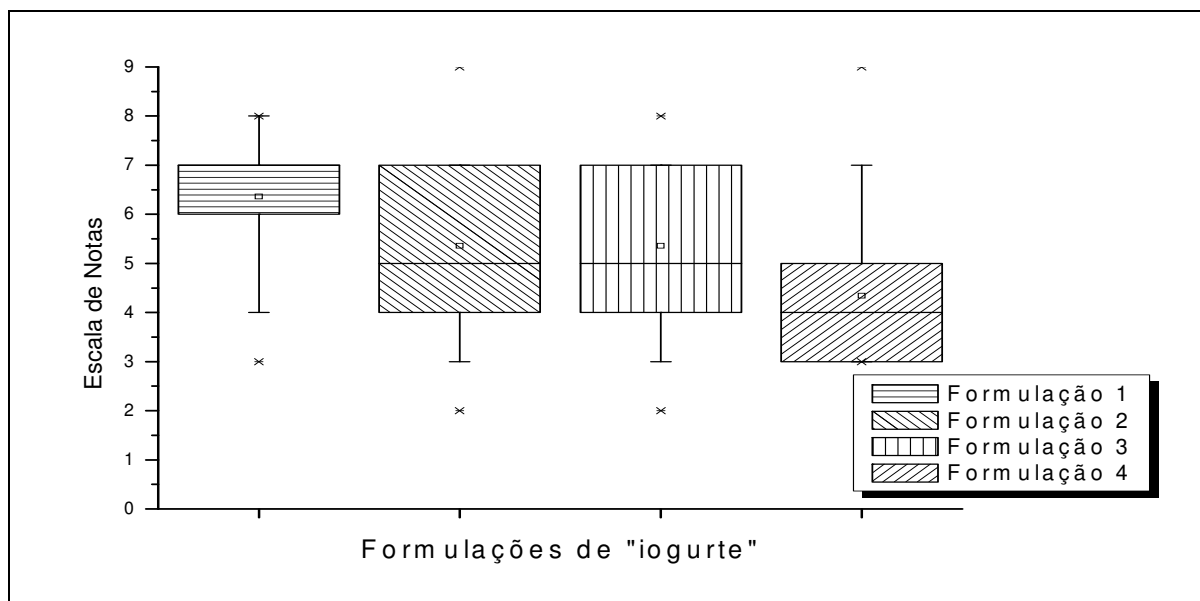


Figura 15- Gráfico de *Boxplot* para as amostras de “iogurte”, referente ao atributo “impressão global”.

Formulação 1: “iogurte” com 100% de extrato de soja; Formulação 2: “iogurte” com 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon; Formulação 3: “iogurte” com 50% de extrato de soja e 50% de extrato de yacon; Formulação 4: “iogurte” com 25% de extrato de soja e 75% de extrato de yacon.

Há atualmente uma tendência dos consumidores em exigirem padrões cada vez maiores para os novos produtos lançados no mercado, uma vez que estão mais bem informados e conscientes da relação que existe entre alimentação e saúde. Os novos produtos devem apresentar sabor agradável, baixo valor calórico ou baixo conteúdo em gorduras, além de apresentar benefícios adicionais à saúde (MOSCATTO et al., 2006).

Staffolo et al (2003) avaliaram as propriedades tecnológicas de amostras de iogurte fortificadas com inulina, entre outros tipos de fibras dietéticas, visando manter as características sensoriais dos produtos semelhantes às de iogurtes já comercializados sem adição de fibras. Os resultados hedônicos demonstraram que os iogurtes apresentaram pontuações para os parâmetros cor e aroma acima da categoria “3” (não gostei nem desgostei) considerada no estudo como o valor mínimo de aceitação (escala estruturada de 5 pontos).

Mais de 50% dos provadores indicaram a categoria “4” (gostei) para o atributo textura e dentre os diversos tipos de fibras empregadas nas formulações, o iogurte processado com inulina foi o que obteve a melhor avaliação para o atributo “sabor”.

Em outro estudo, Candido (2004) desenvolveu uma bebida funcional à base de yacon (*Polymnia sonchifolia*), e determinou sensorialmente a formulação mais adequada para o consumo por indivíduos diabéticos. A bebida foi formulada com suco de yacon e pêssego na proporção de 75:25, adoçado com os edulcorantes acesulfame-K e ciclamato de sódio. A formulação otimizada em termos de preferência continha 50% de suco de yacon, 25% de suco de pêssego e 25% de água, obtendo o valor de 7,67 pontos.

Fuchs et al. (2005) elaboraram um “iogurte” de soja desnatado simbiótico, utilizando cultura iniciadora constituída por *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei* como agente probiótico e inulina e oligofrutose como ingredientes prebióticos e por meio da metodologia de superfície de resposta determinaram que a suplementação do “iogurte” deve ser feita adicionando-se 14,4% de oligofrutose e 4,4% de inulina, considerando-o como uma boa alternativa para o consumo de derivados de soja e agentes prebióticos.

5.3.2 - Viabilidade de *L. acidophilus* CRL 1014

Para que um alimento probiótico exerça seus efeitos benéficos é recomendado que ele apresente uma concentração mínima da bactéria probiótica dentro do prazo de validade do produto. Vários trabalhos propõem que a dose mínima diária da cultura probiótica considerada terapêutica é de 10^8 - 10^9 UFC, o que corresponde ao consumo de 100 g de

produto fermentado contendo 10^6 a 10^7 UFC/g (LEE e SALMINEN, 1995; HOIER et al., 1999).

No produto processado com 75% de extrato de soja + 25% de extrato de yacon foi verificada uma contagem de *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 de $1,8 \times 10^9$ UFC/g. Esse valor encontrado está de acordo com os valores estabelecidos para que um produto possa ser considerado probiótico e provavelmente desempenhar os efeitos terapêuticos esperados.

Prebióticos são usualmente empregados em produtos lácteos com o intuito de estimular seletivamente o crescimento de microrganismos probióticos no intestino humano. Partindo desse princípio, Donkor et al. (2006) investigou o efeito da adição de inulina na sobrevivência e atividade metabólica de *L. acidophilus* L10 e de *L. casei* L26 em amostras de iogurte. A contagem dos cultivos probióticos se apresentou acima de 10^7 UFC/mL. Foi verificado que a suplementação do produto com inulina resultou em um aumento do crescimento das bactérias lácticas durante a fermentação, entretanto os autores ressaltam que o mecanismo pelo qual a inulina afetou estas culturas ainda não está elucidado.

Em nosso estudo, não chegamos a verificar a influência do extrato de yacon, como fonte de inulina e FOS, sobre o desenvolvimento do cultivo de *L. acidophilus* CRL 1014. Entretanto, acreditamos não ter ocorrido nenhum efeito adverso, uma vez que a contagem de células viáveis alcançada foi superior à esperada.

Em estudo desenvolvido por Bernal (2004) foi observado que o maior número de células de microrganismos probióticos em extrato hidrossolúvel de soja foi obtido nas seguintes condições: temperatura de incubação de 37 °C; cultivos bacterianos na proporção de

40/60 de *L. acidophilus* + *L. paracasei* / *B. bifidum*; concentração do inóculo de 5×10^9 UFC/mL; mistura básica constituída por 20 g/L de Xarope com 8,45% de FOS e 7,5 % de extrato de soja desengordurado; tempo de fermentação de 17,75 horas de fermentação; pH final de 5,03 . A autora ressalta que as bifidobactérias utilizam os açúcares presentes na soja como fonte de carbono, liberando mono e dissacarídeos e produzindo mais ácido láctico que acético. As associações de probióticos utilizaram rapidamente os carboidratos simples e os oligossacarídeos provenientes tanto da soja quanto do xarope adicionado, produzindo, principalmente, ácido láctico com leve produção do acético.

Haully et al. (2005) desenvolveram um “iogurte” de soja suplementado com prebióticos oligofrutose (Raftilose P95) e inulina (Raftiline GR) e avaliaram a viabilidade celular por um período de 28 dias (4°C). O número de bactérias lácticas viáveis presentes no “iogurte” de soja suplementado, no 28º dia de armazenamento, foi de $9,28 \log \text{UFC. mL}^{-1}$. Número semelhante não foi observado no iogurte sem suplementação, que a partir do 21º dia de armazenamento, apresentou contagem de $5,36 \log \text{UFC.mL}^{-1}$, o que já era insuficiente para caracterizá-lo como probiótico. Na última avaliação esse valor chegou a $5,28 \log \text{UFC.mL}^{-1}$, indicando que apenas os oligossacarídeos da soja não foram suficientes para manter a viabilidade das bactérias lácticas e garantir a classificação do produto como probiótico. Por fim, foi concluído que o iogurte suplementado com prebióticos manteve a viabilidade das bactérias lácticas, protegendo esses microrganismos durante o período de estocagem avaliado.

5.4. Processamento das amostras de sorvete de “iogurte”

Como já mencionado, os testes sensoriais foram realizados nas amostras de “iogurte” processadas com diferentes concentrações de extratos de soja e de yacon (item 4.2) com intuito de se verificar qual a formulação que apresentaria a melhor aceitação em relação aos atributos aparência, aroma, sabor, textura e impressão global e dessa maneira servir de base

para o desenvolvimento da segunda etapa do presente estudo, que consiste no processamento de amostras de sorvete de “iogurte”. Sendo assim, a formulação com 25% de extrato de yacon e 75% de extrato de soja foi selecionada, não só por ter obtido uma boa avaliação sensorial, mas também por apresentar na sua composição o extrato de yacon como fonte de prebióticos, como era previsto nos objetivos desse estudo. Cabe salientar, que foi processada uma formulação de sorvete de “iogurte” também à base de extratos de soja e de yacon, entretanto sem sofrer fermentação, sendo o pH de 4,3, obtido por meio de acidificação direta com ácido láctico, com a finalidade de se ter um produto controle para comparação dos possíveis efeitos da cultura probiótica empregada (*L. acidophilus* CRL 1014) nas características sensoriais, físico-químicas e de oxidação do sorvete simbiótico.

As análises sensoriais das amostras de sorvete de “iogurte” (Tabelas 6, 7 e 8) foram realizadas nos produtos (simbiótico e sorvete acidificado com ácido láctico) logo após o processamento e após 90 e 180 dias de estocagem à – 23°C. É válido lembrar que cada amostra foi processada em três ocasiões distintas, embora tal procedimento não fosse necessário na avaliação sensorial, uma vez que o número de provadores empregados (80) proporciona, por si só, confiabilidade aos resultados. Entretanto, em decorrência do tipo de máquina utilizada no processamento dos sorvetes, não foi possível fazer o controle do “overrun” de cada processo, o que nos levou a considerar a possibilidade de obtenção de produtos sensorialmente diferenciados, já que a quantidade de ar incorporado poderia ter reflexos no grau de oxidação da gordura, interferindo no sabor e mesmo na cremosidade / leveza, influenciando assim, a textura.

Tabela 6 - Teste de aceitação dos sorvetes de “iogurte” referentes ao primeiro processamento.

Produto	Aparência	Aroma	Textura	Sabor	I. Global
Recém Processado					
1	7,01 ± 1,40	7,13 ± 1,40	6,30 ± 1,83	6,87 ± 1,66	6,94 ± 1,58
2	7,18 ± 1,10	7,10 ± 1,06	6,78 ± 1,17	6,93 ± 1,84	7,28 ± 1,15
Após 90 dias de estocagem à – 23°C					
1	6,84 ± 1,60	7,24 ± 1,65	6,55 ± 1,79	6,63 ± 1,79	6,89 ± 1,63
2	7,05 ± 1,32	7,40 ± 1,75	6,61 ± 1,06	6,94 ± 1,88	7,26 ± 1,94
Após 180 dias de estocagem à – 23°C					
1	6,88 ± 1,26	6,64 ± 1,70	6,64 ± 1,10	6,60 ± 1,88	6,67 ± 1,10
2	6,89 ± 1,34	7,30 ± 1,28	6,39 ± 1,18	6,68 ± 1,20	7,02 ± 1,63

Médias não diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$), segundo o teste *t*

Produto 1: sorvete de “iogurte”: 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon;

Produto 2: sorvete à base de extratos de yacon e soja com os demais ingredientes do iogurte, acidificado com adição de ácido láctico

Tabela 7 - Teste de aceitação dos sorvetes de “iogurte” referentes ao segundo processamento.

Produto	Aparência	Aroma	Textura	Sabor	I. Global
Recém Processado					
1	7,10 ± 1,67	7,14 ± 1,60	6,56 ± 1,81	6,46 ± 1,28	6,90 ± 1,60
2	7,26 ± 1,52	7,08 ± 1,72	6,08 ± 1,01	6,82 ± 1,97	7,36 ± 1,94
Após 90 dias de estocagem à – 23°C					
1	6,74 ± 1,45	6,89 ± 1,71	6,34 ± 1,62	6,16 ± 1,34	6,88 ± 1,63
2	6,94 ± 1,52	6,70 ± 1,79	6,22 ± 1,72	6,75 ± 1,25	6,94 ± 1,94
Após 180 dias de estocagem à – 23°C					
1	6,72 ± 1,80	6,32 ± 1,85	6,02 ± 1,09	6,15 ± 1,55	6,55 ± 1,51
2	6,85 ± 1,55	6,60 ± 1,53	5,96 ± 1,43	6,40 ± 1,11	6,92 ± 1,19

Médias não diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$), segundo o teste *t*

Produto 1: sorvete de “iogurte” de soja e yacon com 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon;

Produto 2: sorvete à base de extratos de yacon e soja com os demais ingredientes do iogurte, acidificado com adição de ácido láctico

Tabela 8 - Teste de aceitação dos sorvetes de “iogurte” referentes ao terceiro processamento.

Recém processado					
Produto	Aparência	Aroma	Textura	Sabor	I. Global
1	7,08 ± 1,26	6,54 ± 1,70	6,14 ± 1,10	6,20 ± 1,88	6,68 ± 1,10
2	7,27 ± 1,34	7,00 ± 1,28	6,39 ± 1,18	6,58 ± 1,20	6,64 ± 1,63
Após 90 dias de estocagem à – 23°C					
1	6,80 ± 1,31	6,34 ± 1,53	6,33 ± 1,76	5,90 ± 1,29	6,36 ± 1,34
2	6,86 ± 1,25	6,98 ± 1,22	6,50 ± 1,34	6,35 ± 1,12	6,50 ± 1,68
Após 180 dias de estocagem à – 23°C					
1	6,64 ± 1,80	6,13 ± 1,89	6,02 ± 1,22	5,86 ± 1,14	6,62 ± 1,55
2	6,71 ± 1,75	6,84 ± 1,57	5,90 ± 1,81	6,22 ± 1,36	6,70 ± 1,82

Médias não diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$), segundo o teste *t*

Produto 1: sorvete de “iogurte”: 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon;

Produto 2: sorvete à base de extratos de yacon e soja com os demais ingredientes do iogurte, acidificado com adição de ácido láctico

Ao se comparar estatisticamente os três processamentos entre si, após 180 dias de estocagem¹ (Tabela 9), verificou-se que, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para nenhum dos atributos sensoriais avaliados para cada uma das duas amostras de sorvete de “iogurte” processadas.

¹ A comparação estatística entre os três processamentos foi feita a partir dos dados obtidos com a avaliação dos produtos após 180 dias de estocagem, justamente por representar o final do período de experimentação. Caso as diferentes quantidades de ar de fato interferissem nos produtos, as consequências sensoriais deveriam ser mais evidenciadas no tempo de estocagem mais prolongado.

Tabela 9 – Médias obtidas na comparação entre os processamentos 1, 2 e 3 após 180 dias de estocagem.

Processamento	Produto	Aparência	Aroma	Textura	Sabor	I.Global
1	1	6,88 ± 0,74 ^a	6,64 ± 1,03 ^a	6,64 ± 0,82 ^a	6,30 ± 1,02 ^a	6,67 ± 1,05 ^a
	2	6,89 ± 1,25 ^a	7,10 ± 0,89 ^a	6,39 ± 1,01 ^a	6,68 ± 0,87 ^a	7,02 ± 1,27 ^a
2	1	6,72 ± 0,78 ^a	6,32 ± 0,87 ^a	6,02 ± 1,00 ^a	6,15 ± 0,69 ^a	6,55 ± 1,17 ^a
	2	6,85 ± 0,99 ^a	6,80 ± 0,76 ^a	5,96 ± 0,87 ^a	6,40 ± 1,13 ^a	6,92 ± 0,93 ^a
3	1	6,64 ± 1,80 ^a	6,13 ± 1,15 ^a	6,02 ± 1,12 ^a	5,86 ± 0,75 ^a	6,62 ± 0,81 ^a
	2	6,71 ± 1,75 ^a	6,84 ± 0,69 ^a	5,90 ± 1,22 ^a	6,22 ± 1,32 ^a	6,70 ± 0,94 ^a

Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; n=80 provadores

Produto 1: sorvete de “iogurte”: 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon;

Produto 2: sorvete à base de extratos de yacon e soja com os demais ingredientes do iogurte, acidificado com adição de ácido lático

De acordo com os dados apresentados na Tabela 8, onde a comparação estatística, neste caso, foi feita entre amostras iguais para cada um dos processamentos, pode-se verificar que não foram observadas diferenças ($p < 0,05$) entre as médias de aceitabilidade para os cinco atributos avaliados entre os mesmos produtos. Isso demonstra que a incorporação de ar, caso tenha ocorrido em concentrações diferentes nos três processamentos, não foi um fator de interferência nos testes de aceitação.

Frente ao exposto, foi escolhido um dos processamentos, para facilitar o entendimento da discussão dos resultados. Sendo assim, o processamento 1 foi o escolhido por apresentar as maiores médias, em termos absolutos, para o atributo impressão global que acaba por refletir a somatória dos demais atributos. Portanto, a seguir, passaremos a apresentação e discussão de todos os dados experimentais obtidos a partir das avaliações

realizadas nas amostras dos sorvetes obtidos no processamento 1.

5.4.1. Avaliação sensorial do processamento 1 das diferentes formulações

Os resultados referentes ao primeiro processamento (Tabela 9), com avaliações em todos os tempos de estocagem, demonstram que, os produtos não diferiram significativamente entre si para nenhum dos atributos sensoriais estudados. Analisando estes resultados, pode-se perceber uma ligeira tendência de maior aceitação dos consumidores pelo sorvete acidificado frente ao sorvete simbiótico, uma vez que o primeiro apresentou as maiores médias em termos absolutos para todos os atributos, exceto, para o atributo “textura” referente ao do tempo de 180 dias de armazenamento.

Este fato pode estar associado ao sabor mais ácido característico de produtos que sofreram fermentação láctica. Davidson et al. (2000) apontam a acidez como o atributo mais importante, em termos de percepção de sabor, nos sorvetes de “iogurte”. No mesmo estudo, os autores determinaram que os sabores de baunilha, chocolate e café, receberam melhores pontuações sensoriais quando a acidez foi mantida relativamente baixa. Speck e Hansen (1983) determinaram que sorvetes de iogurte com baixa acidez titulável (0,28 a 0,38%) receberam as melhores pontuações na avaliação sensorial.

Uma vez que o sorvete de iogurte ainda não tem um padrão de identidade regulamentado, cabe salientar que alguns fabricantes, no intuito de melhorar a aceitabilidade de seus produtos, colocam à venda sorvetes adicionados de iogurte em suas formulações (geralmente de 5 a 10%), apresentando uma acidez quase que imperceptível pelo consumidor, já que o pH desses produtos varia de 6,3 a 6,7. Hekmat e McMahon (1992) avaliaram as características sensoriais de sorvete probiótico fermentado com *L. acidophilus* e

Bifidobacterium bifidum e evidenciaram a maior aceitabilidade dos julgadores pelas amostras com maior valor de pH (5,5 e 6,0) frente a amostra caracterizada com pH 5,0.

Os resultados dos testes sensoriais realizados em nosso estudo não são concordantes com afirmações de alguns autores de que a atividade das bactérias lácticas presentes nos sorvetes de iogurte, geralmente ocasionam alterações químicas (aumento de acidez, por exemplo) nesses produtos, afetando as suas características sensoriais (CHANDAN, 1997; DAVIDSON et al., 2000).

O entendimento desse comportamento observado no presente estudo, só seria possível com a realização de avaliações relativas à quantificação dos metabólitos formados durante o processo de fermentação, ao longo do período de estocagem, em todos os produtos. Alguns destes compostos, que conferem ao sorvete de iogurte, sabor e aroma característicos, devem ser cuidadosamente controlados no sentido de se proporcionar aos consumidores produtos com características sensoriais mais agradáveis (CHANDAN e SHAHANI, 1992).

Por outro lado, a temperatura em que os produtos foram armazenados pode ter favorecido a manutenção das suas propriedades sensoriais. Segundo Ashaye et al. (2001), as temperaturas de congelamento são mais satisfatórias que outras temperaturas de estocagem na conservação dos atributos sensoriais de “iogurte” de soja, tais como, cor, sabor, textura e impressão global.

Segundo Davidson et al. (2000), a suplementação do sorvete de iogurte com culturas probióticas teve apenas um pequeno efeito no sabor do produto e que, a fermentação até pH 5,6 diminuiu significativamente o sabor ácido no sorvete de iogurte. Por fim, evidenciam o

fato de haver informações muito limitadas sobre os efeitos de culturas probióticas na qualidade sensorial de produtos do tipo *frozen yogurt*.

Uma outra análise de interesse neste estudo refere-se ao comportamento de cada um dos produtos ao longo do período de estocagem (Tabela 10). Neste caso também, a análise foi feita entre produtos iguais em cada tempo de estocagem. É possível observar que ambos os produtos avaliados não apresentaram diferenças significativas ao longo do período de 180 dias de armazenamento em nenhuma das propriedades sensoriais analisadas

Tabela 10 – Características sensoriais dos diferentes produtos, ao longo de 180 dias.

Tempo de Armazenamento (dias)	Produto	Aparência	Aroma	Textura	Sabor	I. Global
0	1	7,01 ± 1,40 ^a	7,13 ± 1,40 ^a	6,30 ± 1,83 ^a	6,87 ± 1,66 ^a	6,94 ± 1,58 ^a
	2	7,18 ± 1,10 ^a	7,10 ± 1,06 ^a	6,78 ± 1,17 ^a	6,93 ± 1,84 ^a	7,28 ± 1,15 ^a
90	1	6,84 ± 1,60 ^a	7,24 ± 1,65 ^a	6,55 ± 1,79 ^a	6,63 ± 1,79 ^a	6,89 ± 1,63 ^a
	2	7,05 ± 1,32 ^a	7,40 ± 1,75 ^a	6,61 ± 1,06 ^a	6,94 ± 1,88 ^a	7,26 ± 1,94 ^a
180	1	6,88 ± 1,26 ^a	6,90 ± 1,70 ^a	6,64 ± 1,10 ^a	6,60 ± 1,88 ^a	6,67 ± 1,10 ^a
	2	6,89 ± 1,34 ^a	7,30 ± 1,28 ^a	6,39 ± 1,18 ^a	6,68 ± 1,20 ^a	7,02 ± 1,63 ^a

Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si, segundo o teste de Tukey.

Produto 1: sorvete de “iogurte”: 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon;

Produto 2: sorvete à base de extratos de yacon e soja com os demais ingredientes do iogurte, acidificado com adição de ácido láctico

Compere (1978) evidencia que os sorvetes de iogurte quando comercializados com sabor natural, ou seja, sem aromatização, têm menor aceitação pelos consumidores, por apresentarem um sabor ácido mais acentuado. Deste modo, os fabricantes de *frozen yogurt*, dispensam grande atenção aos agentes flavorizantes empregados nos processamentos de produtos desta categoria.

Knupp (1979) destaca que o sorvete de iogurte apresenta excelente compatibilidade com todos os flavorizantes a base de frutas, os quais já demonstraram ótima aceitação em sorvetes convencionais ao longo dos anos. Outros sabores, como baunilha e chocolate, também são incluídos como bons agentes flavorizantes por representarem sabores tradicionais de sorvetes convencionais. Quanto ao sorvete de iogurte de chocolate, recomenda-se que se incube parcialmente o iogurte até que se obtenha um sabor ácido menos acentuado, o que favorece a combinação de sabores entre chocolate e iogurte. De acordo com Davidson et al. (2000), os agentes flavorizantes podem ser significativamente afetados pelos diferentes níveis de compostos orgânicos encontrados nos sorvetes de iogurte.

Ainda são poucos os estudos com sorvete de iogurte onde se encontram presentes os prebióticos, como a inulina, assim como o emprego do “iogurte” de soja como matéria prima desses produtos. Miguel et al. (2004), desenvolveram um sorvete de “iogurte” probiótico fermentado com cultivos de *L. jugurti* + *E. faecium* e *L. delbruecki bulgaricus* + *S. thermophilus* à base de extrato aquoso de soja e avaliaram as características sensoriais dos produtos, constatando a possibilidade de armazenamento pelo tempo de 180 dias de ambos produtos, uma vez que não apresentaram grandes variações para os atributos sensoriais avaliados.

Heenam et al. (2004) incorporaram microrganismos probióticos em um sorvete de soja não fermentado e obtiveram ótima aceitação sensorial destacando que o produto foi um ótimo carreador das culturas lácticas empregadas. Os autores ressaltam que *L. acidophilus MJLA1* foi o cultivo que apresentou não só as melhores qualidades sensoriais, como também as maiores taxas de sobrevivência nas amostras.

Tuitemwong (1996) e colaboradores analisaram amostras de sorvete de “iogurte” de soja com bactérias do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Estas amostras foram preparadas com ou sem adição de *Bifidobacterium bifidus* e várias combinações das bactérias lácticas isoladas de vegetais fermentados. Os *mix* de culturas de bactérias *bifidus* e de outras bactérias ácido lácticas provenientes dos vegetais fermentados apresentaram uma redução maior no pH que as amostras controles (bactérias convencionais na fermentação de iogurte). A adição de 1% de leite em pó desnatado na formulação foi satisfatória tanto na qualidade global do iogurte quanto na fermentação. O sorvete de “iogurte” de soja preparado com bactérias *bifidus* em associação tanto com *Lactobacillus plantarum* quanto *Lactobacillus acidophilus* obteve resultados satisfatórios, com índices de “overrun” e homogeneização melhores que o sorvete controle (*frozen yogurt* com leite de vaca desnatado).

Akin et al. (2007) compararam amostras de sorvete probiótico com diferentes concentrações de sacarose (15, 18 e 21%) e adicionados de 1 e 2% de inulina com sorvetes não suplementados com inulina. Foi evidenciado que sorvetes com maiores concentrações de açúcar apresentaram melhores propriedades físicas e sensoriais, e com relação à adição da inulina, embora tenha sido constatada melhora na viscosidade, não foi verificado efeito nas características sensoriais dos sorvetes.

As Figuras 16 e 17 permitem uma melhor visualização do comportamento de cada um dos produtos no transcorrer do período de armazenamento.

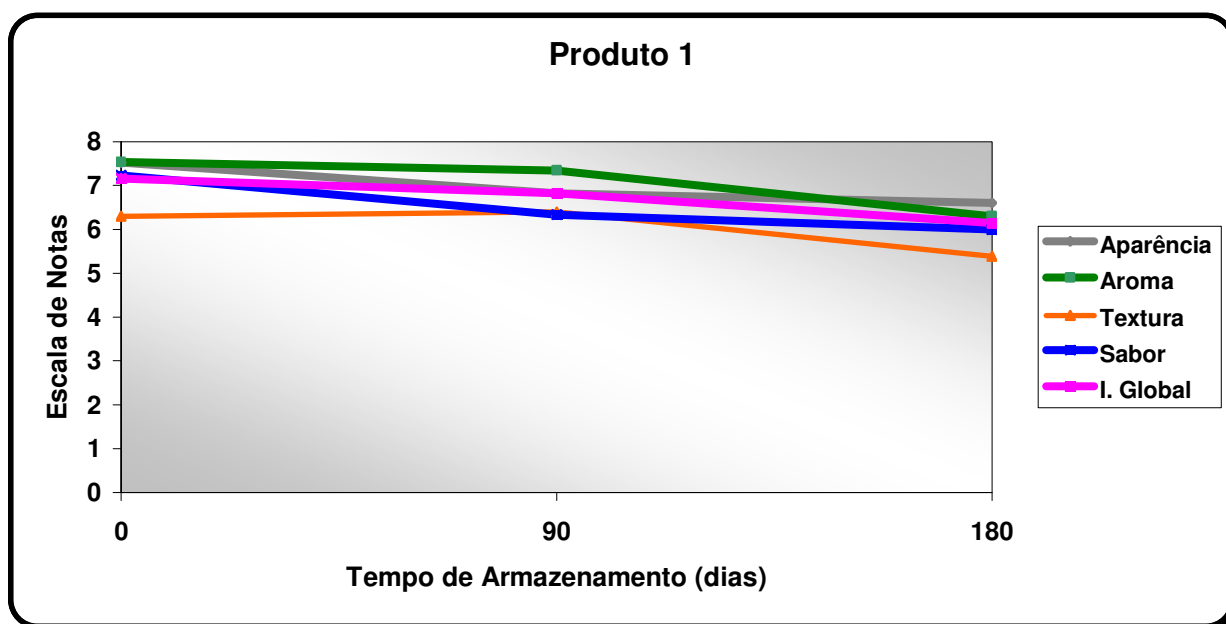


Figura 16– Representação gráfica dos resultados obtidos na determinação das características sensoriais do produto 1 (sorvete de “iogurte”: 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon).

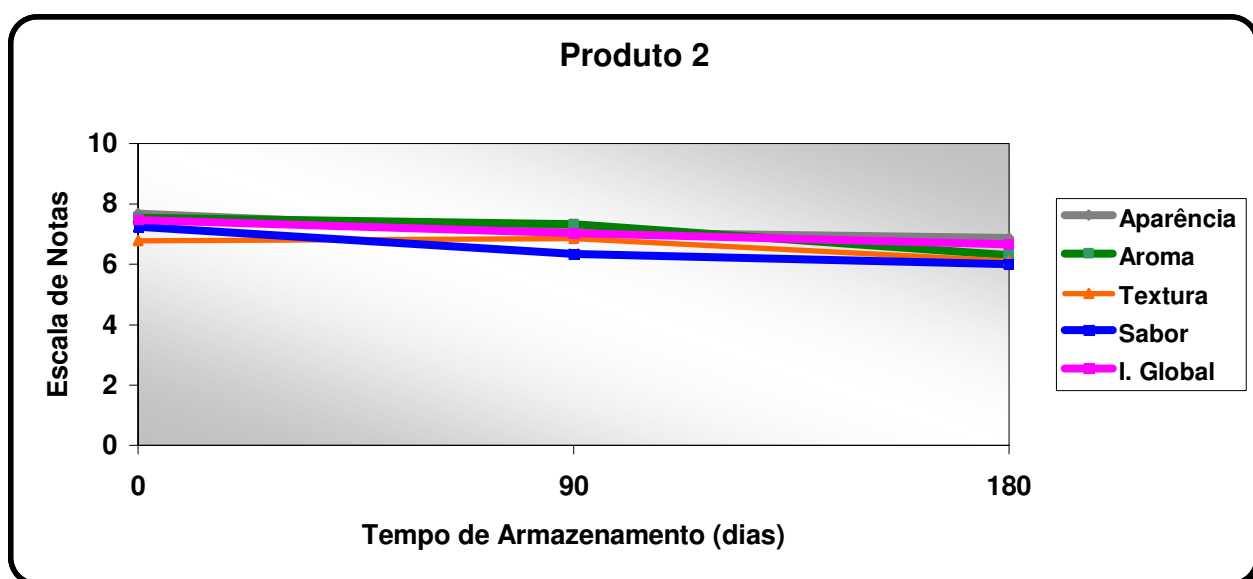


Figura 17 – Representação gráfica dos resultados obtidos na determinação das características sensoriais do produto 2 (sorvete à base de extratos de yacon e soja com os demais ingredientes do iogurte, acidificado com adição de ácido láctico).

5.4.2. Viabilidade das bactérias ácido lácticas na formulação do sorvete de “iogurte”.

A contagem de bacilos das amostras de sorvete no tempo zero (logo após o processamento) e ao longo de 180 dias de estocagem (Tabela 11), foi realizada apenas na

amostra fermentada com *L. acidophilus* CRL 1014 (produto 1).

Tabela 11 - Valores médios* de células viáveis (UFC/mL) no sorvete simbiótico, ao longo do período de estocagem

Tempo (dias)	0	30	60	90	120	150	180
bacilos	$2,2 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$	$9,5 \times 10^8$	$8,4 \times 10^8$	$8,2 \times 10^8$

* Os valores apresentados referem-se às médias das triplicatas para amostras de sorvete de “iogurte”: 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 11, é possível observar que o produto avaliado apresentou uma redução da ordem de um ciclo logarítmico ao longo do período de seis meses de estocagem, na contagem de células viáveis. Entretanto, essa redução não chegou a representar um aspecto negativo, uma vez que a contagem se situou em 10^8 UFC/mL, preservando, assim, a condição para ser considerado um produto probiótico (KIM, 1998; MATTILA – SANDHOLM et al., 2002).

As condições de armazenamento de sorvete de iogurte não são consideradas ideais para a sobrevivências de bactérias lácticas. O processo de congelamento dos produtos pode causar a redução de $\frac{1}{2}$ a 1 ciclo logarítmico na contagem das células viáveis segundo Davidson et al.(2000). A oscilação de temperatura, certamente pode ocasionar a formação de cristais de gelo, principalmente depois de 6 meses de armazenamento, o que pode causar lesões às células bacterianas e consequentemente a sua redução. Estes cristais que se formam no exterior da célula reduzem a quantidade de água livre na qual os solutos estariam dissolvidos, enquanto aqueles que se formam no interior das células apresentam maior potencial de romper a membrana celular, resultando na morte do microrganismo (MARSHALL e ARBUCKLE, 1996). De acordo com Papademas e Bintsis (2002), as

temperaturas de congelamento durante a fabricação e armazenamento de sobremesas geladas também podem tanto inibir o desenvolvimento dos cultivos microbianos empregados para fermentar sorvetes de iogurte, quanto reduzir ou interromper a atividade metabólica dos mesmos.

A redução das células viáveis verificadas no final do período de estocagem do presente estudo, encontra-se, de certa forma, em concordância com os resultados verificados na literatura. Bielecka et al. (1990) estocaram sorvete de iogurte a -25°C por 10 meses e observaram a redução de *Streptococcus* de $1,8 \times 10^8$ para $1,5 \times 10^6$ UFC/g. Isto indicou o potencial de sobrevivência de microrganismos nos sorvetes de iogurte. Foi concluído que o sorvete de iogurte pode ser estocado por 6 meses sem perda significativa da atividade biológica. Whitehead et al. (1993) também estudaram a viabilidade de células em amostras de sorvete de iogurte. Das 20 amostras estudadas, apenas 3% continham contagem $< 10^7$ UFC /g e 45% excederam 10^8 UFC/g.

Davidson et al. (2000) verificaram a viabilidade de culturas probióticas em amostras de sorvete de iogurte, e concluíram que este produto se apresentou como um excelente veículo à incorporação de bactérias probióticas. A estocagem do produto teve pouco ou nenhum efeito negativo na viabilidade deste tipo de bactérias, as quais permaneceram em níveis suficientes para atender aos efeitos terapêuticos de saúde esperados.

Miguel et al. (2004) determinaram a contagem de células viáveis de diversos cultivos microbianos em amostras de sorvete de “iogurte” à base de extrato aquoso de soja e de leite de vaca, verificando que, para um produto do tipo sorvete de iogurte, é importante que a contagem inicial do cultivo probiótico seja de, no mínimo, 10^8 UFC/mL, uma vez que os

produtos avaliados apresentaram uma redução de 2 ciclos logarítmicos ao longo de 180 dias de armazenamento, em temperatura de -23°C.

Alamprese et al. (2005) ao estudarem a influência de *L. rhamnosus* GG em sorvetes com diferentes formulações, variando quantidade de gordura e açúcar, observaram elevadas taxas de sobrevivências dos probióticos durante o armazenamento dos produtos por 365 dias, sem decréscimo na população inicialmente inoculada (8 log UFC g⁻¹), enquanto que Salem et al. (2006) constataram reduções das populações de 2,223 log/g para *L. acidophilus* e de 1,68 log UFC/g para *B. bifidum* em sorvetes armazenados por 84 dias à -26°C.

Fica evidente o fato de que a estabilidade da sobrevivência de bactérias lácticas em sorvete de iogurte sofre variações, sendo que em alguns estudos se relata a redução na contagem dessas bactérias ao passo que em outros a população destas se mantém estável. Certamente, a maior ou menor resistência ao congelamento, é uma característica própria do microrganismo, isto é, varia com o gênero e espécie do mesmo. Por outro lado, diversos estudos mostram que mesmo à baixas temperaturas, pode-se assegurar uma boa taxa de sobrevivência, mas que a mortalidade aumenta com o tempo de armazenamento dos produtos (THUNELL et al., 1984; FOSCHINO et al., 1992).

De maneira geral, pode-se afirmar, com base nos resultados observados, que o cultivo de *L. acidophilus* CRL 1014, apesar de ter sido levemente afetado pela temperatura de congelamento, é capaz de resistir, em número adequado às condições de processamento e de estocagem do sorvete de iogurte simbiótico, constituindo-se assim em bom veículo para incorporação de probióticos.

É sabido que a adição de inulina a produtos lácteos pode auxiliar na sobrevivência e estabilidade de microrganismos probióticos empregados devido às suas propriedades crioprotetoras, auxiliando na redução da formação de cristais de gelo durante as possíveis oscilações de temperatura que podem ocorrer durante o armazenamento dos produtos (AKALIN e ERISIR, 2008).

Como já mencionado anteriormente, no presente estudo, não chegou-se a verificar a influência do extrato de yacon, como fonte de inulina e FOS, sobre o desenvolvimento do cultivo de *L. acidophilus* CRL 1014, portanto, não se pode atribuir à estes ingredientes as altas taxas de sobrevivência da população do cultivo em estudo.

A Figura 18 permite uma melhor visualização da viabilidade de bacilos no transcorrer dos diversos períodos de armazenamento.

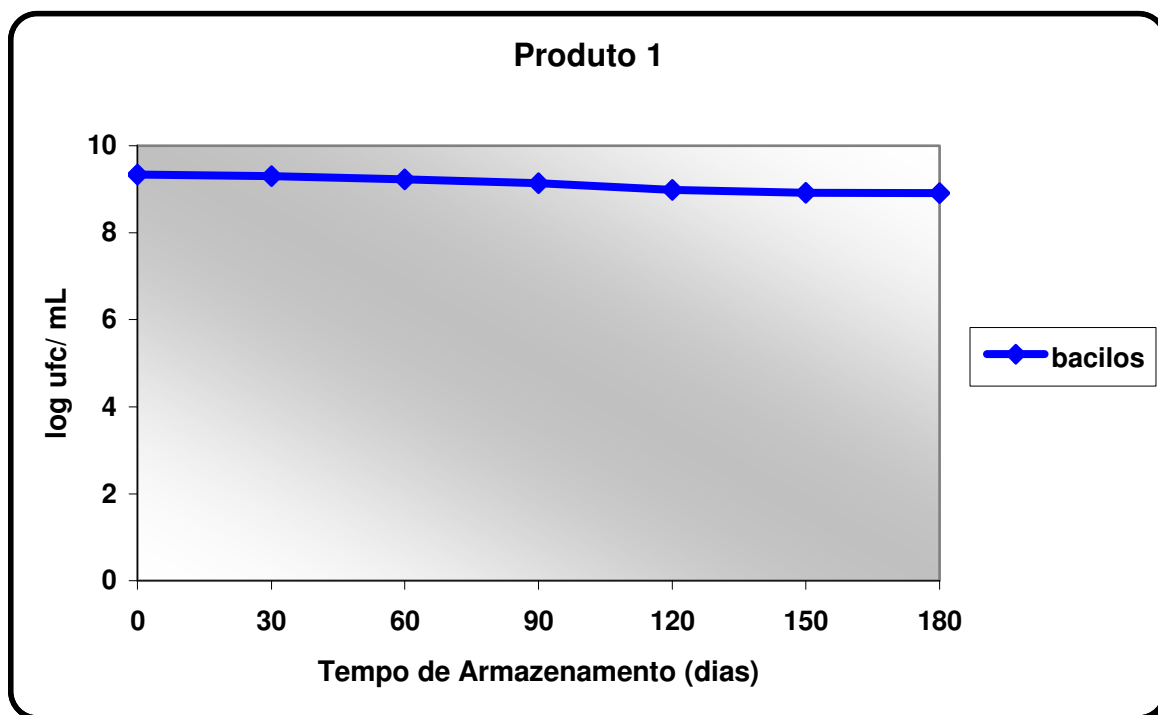


Figura 18 - Viabilidade de bacilos no produto 1 (sorvete de “iogurte”: 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon) .

5.4.3. Avaliação do grau de oxidação da gordura das diferentes formulações

5.4.3.1. Oxidação da gordura

Foram realizadas curvas-padrões relativas aos dois produtos obtidos (Figuras 19 e 20), uma vez que sendo distintos, fez-se necessário a elaboração de uma curva-padrão para cada um deles, levando-se em consideração os diversos interferentes que poderiam estar contidos nas amostras de sorvetes. Na Tabela 12 estão apresentados os valores das equações das retas e os coeficientes de correlações das distintas curvas-padrões relativas aos diferentes produtos. É válido lembrar que as curvas-padrões foram construídas utilizando-se amostras recém-processadas (supostamente sem malonaldeído) em substituição à água, como uma maneira de se eliminar o efeito dos interferentes.

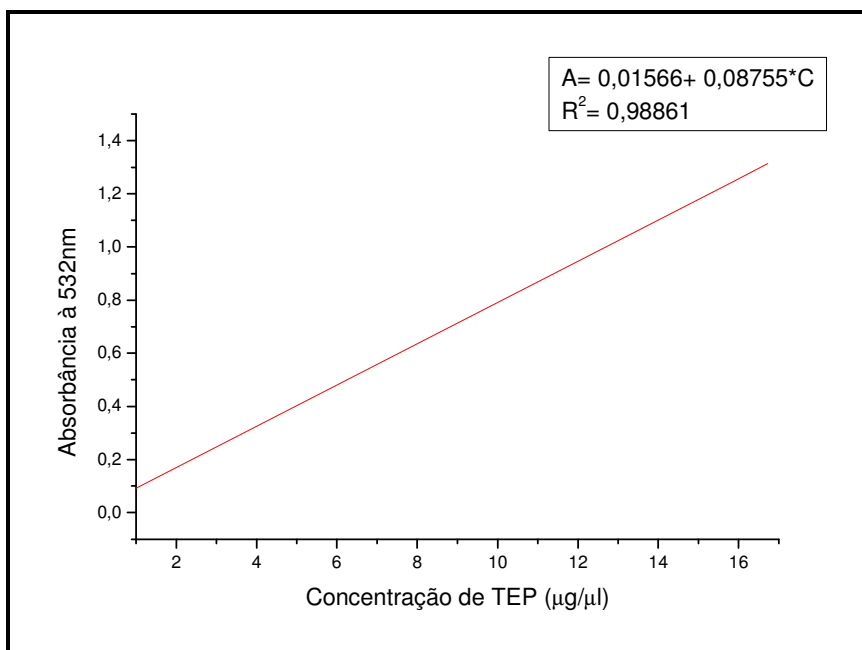


Figura. 19 - Curva Padrão para o produto 1 (sorvete de “iogurte”: 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon) .

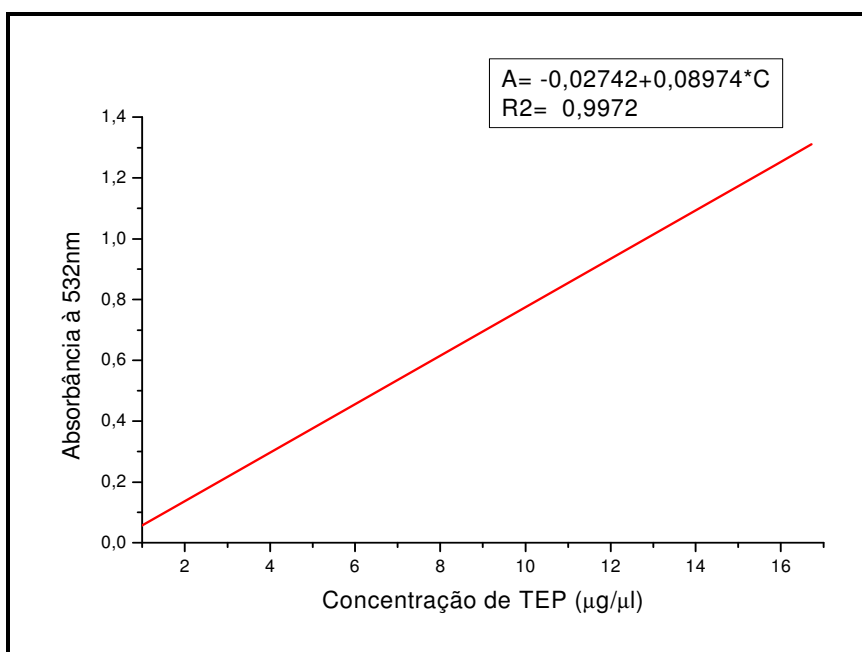


Figura. 20 - Curva Padrão para o produto 2 (sorvete à base de extratos de yacon e soja com os demais ingredientes do iogurte, acidificado com adição de ácido láctico).

Tabela 12 – Valores das equações das retas e os coeficientes de correlações das distintas curvas-padrões relativas aos diferentes produtos.

Produto	Equação da reta	Coeficiente de correlação (R^2)
1	$Y = -0,02 + 0,09 \cdot x$	0,99
2	$Y = -0,03 + 0,09 \cdot x$	0,99

Formulação 1: sorvete de “iogurte”: 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon;
Formulação 2: sorvete à base de extratos de yacon e soja com os demais ingredientes do iogurte, acidificado com adição de ácido láctico.

O método do ácido tiobarbitúrico (TBA), com suas diferentes variações, é um teste amplamente utilizado na avaliação da peroxidação de lipídeos nos alimentos (St. Ângelo., 1996).

Este método vem sendo aperfeiçoado visando se obter dados mais confiáveis e também devido à necessidade, na maioria das vezes, da adaptação deste teste para as condições da amostra (TORRES e OKANI, 1997 ; MATEOS et al., 2005). O princípio básico do método é a reação do malonaldeído com o TBA formando um complexo malonaldeído-TBA de cor vermelha, o qual pode ser medido espectrofotometricamente (OSAWA et al., 2005).

Vários fatores podem afetar a intensidade da cor do complexo, tais como produtos da oxidação de lipídeos, por exemplo, os alca – 2,4 – dienos que também reagem com o TBA , resultando em coloração vermelha e com a mesma faixa de absorção máxima do complexo malonaldeído – TBA (STEGHENS et al., 2001; SIM et al., 2003).

Nos testes realizados com as amostras de sorvete, foi obtido uma coloração alaranjada, e não rósea ou vermelha (cores características do teste de TBA), consequência da presença de interferentes nas amostras. Kosugi e Kikugawz (1985) também constataram o desenvolvimento de uma coloração amarela e laranja na reação com TBA, devido às

condições da reação com substâncias interferentes. Fioriti et al. (1974) afirmam que aldeídos monoinsaturados são responsáveis pela cor amarela enquanto a rósea é devida principalmente aos compostos diinsaturados.

Em geral é esperado que a oxidação da gordura aumente com o tempo de estocagem, podendo ser acelerada pelo aumento da temperatura e em condições de baixos valores de pH (INOUE et al., 1998). Na Tabela 13 são apresentadas as concentrações de malonaldeído nos produtos 1 e 2, que refletem o grau de oxidação durante o período de 180 dias de estocagem a -23°C .

Tabela 13 – Concentrações médias de malonaldeído (mg/g amostra) nos diferentes produtos, em cada período de estocagem.

Tempo de Armazenamento (dias)	Inicial	30	60	90	120	150	180
Produto 1	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00 *	2,10 $\pm$ 0,07 *	3,45 $\pm$ 0,55 *	4,88 $\pm$ 0,09 *	6,35 $\pm$ 0,09 *	6,71 $\pm$ 0,05
Produto 2	0,00 $\pm$ 0,00	4,32 $\pm$ 0,05 *	4,92 $\pm$ 0,07 *	6,27 $\pm$ 0,48 *	6,60 $\pm$ 0,08 *	7,37 $\pm$ 0,13 *	7,53 $\pm$ 0,08

Médias com * na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si, segundo o teste de *t*.

Produto 1: sorvete de “iogurte”: 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon;

Produto 2: sorvete à base de extratos de yacon e soja com os demais ingredientes do iogurte, acidificado com adição de ácido láctico

Observa-se que no período inicial os dois produtos se apresentaram isentos de malonaldeído. Com 30 dias de estocagem, percebe-se que o produto 2 passa a apresentar uma concentração de 4,32mg/g de malonaldeído, indicando um certo grau de oxidação. O contrário

se verifica em relação ao produto 1 que manteve-se sem presença de malonaldeído, diferindo-se significativamente do produto 2. A partir do período de 60 dias, nota-se que o produto 1 começa a apresentar concentração de malonaldeído, embora em menor grau que o produto 2 e ambos diferindo significativamente entre si em todos os tempos avaliados. É válido destacar que o produto 2 apresentou as maiores médias de concentração de malonaldeído em todos os tempos estudados, enquanto que o produto 1 mostrou-se com as menores valores.

Uma outra análise foi realizada com a finalidade de se obter maiores informações a respeito do comportamento de cada produto ao longo do período de armazenamento (Tabela 14). De acordo com esses resultados, é possível verificar que todos os produtos apresentaram um aumento, em maior ou menor extensão, na concentração de malonaldeído ao longo do período de estocagem.

Tabela 14. Concentrações médias de malonaldeído (mg/g amostra),verificadas de forma individualizada para cada produto ao longo do período de estocagem.

Tempo de Armazenamento (dias)	Inicial	30	60	90	120	150	180
Produto 1	0,00 ± 0,00 ^e	0,00 ± 0,00 ^e	2,10 ± 0,07 ^d	3,45 ± 0,55 ^c	4,88 ± 0,09 ^b	6,35 ± 0,09 ^a	6,71 ± 0,05 ^a
Produto 2	0,00 ± 0,00 ^e	4,32 ± 0,05 ^d	4,92 ± 0,07 ^d	6,27 ± 0,48 ^c	6,60 ± 0,08 ^b	7,37 ± 0,13 ^a	7,53 ± 0,08 ^a

Médias com letras iguais na mesma linha não diferem significativamente (p<0,05) entre si, segundo teste de tukey.

Formulação 1: sorvete de “iogurte”: 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon;

Formulação 2: sorvete à base de extratos de yacon e soja com os demais ingredientes do iogurte, acidificado com adição de ácido láctico

Quanto ao produto 1, nota-se um aumento crescente e significativo ($p < 0,05$) nas concentrações de malonaldeído a partir do tempo 60 até o tempo de 150 dias. No tocante ao tempo de 180 dias, embora não tenha diferido do período anterior, diferiu de todos os demais.

Finalmente quanto ao produto 2, após 30 dias de estocagem já se detecta a presença de malonaldeído no produto. Nos tempos de 90 e 120 dias, embora as concentrações de malonaldeído não tenham diferido entre si, mostraram-se maiores que as dos períodos anteriores. Já, ao final do período de estocagem (180 dias), foi verificado o maior grau de oxidação.

De acordo com os resultados dos testes de oxidação verificou-se que o produto 2 apresentou-se com maior concentração final de malonaldeído, evidenciando claramente que o cultivo em questão, presente no produto 1, foi capaz de conter, em certo grau, o processo oxidativo. Tal comportamento é concordante com os dados da literatura que demonstram que determinadas linhagens de bactérias lácticas são capazes de inibir o processo de oxidação nos produtos, embora não se conheça exatamente o mecanismo deste efeito (ZOMMARA et al., 1994; INOUE et al., 1998).

Comparando-se os resultados relativos aos aspectos sensoriais (Tabela 10) e aqueles relativos ao grau de oxidação (Tabelas 13 e 14), pode-se afirmar que o aumento verificado na concentração de malonaldeído nos diferentes produtos, ao longo do período de estocagem, não foi suficiente para promover alterações significativas nos atributos sensoriais avaliados.

Miguel et al. (2004) também avaliaram a oxidação de amostras de sorvetes de “iogurte” tanto fermentados com diferentes cultivos microbianos quanto adicionados de ácido láctico. Os

autores observaram a produção crescente de malonaldeído em todos os produtos, ao longo do período de estocagem, sendo que o cultivo com *E. faecium* + *L. jugurti* foi menos efetivo na inibição do processo oxidativo em relação ao *L. delbrueckii ssp bulgaricus* + *S. thermophilus*. Também foi constatado que o “leite” de soja quando fermentado pelo cultivo de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* + *S. thermophilus* é menos susceptível à oxidação que o leite de vaca fermentado nas mesmas condições.

Vários autores estudaram o sabor proveniente da oxidação em leite, leite em pó integral entre outros alimentos e relataram uma boa correlação entre os valores de TBA com avaliações sensoriais (DUNKLEY e JENNINGS, 1951; BIGGS e BRYANT, 1953; SIDWELL et al., 1954). GREENE e CUMUZE (1981) também relataram que os valores de TBA detectados em seu estudo estavam estritamente correlacionados com sabor de oxidação apontado na avaliação sensorial.

Patton (1974), recomenda que mesmo que ocorra a produção da pigmentação na reação do teste de TBA (teste positivo), os resultados necessitam ser considerados com cautela e aconselha-se compará-los com avaliações sensoriais. Hoyland e Taylor (1991) ressaltaram que o teste de TBA não é aconselhado para o estudo da vida-de-prateleira de alguns produtos, onde os valores de TBA aumentam e depois sofrem um decréscimo, enquanto os resultados da análise sensorial apontam boas médias para estes produtos.

Em resumo, pode-se afirmar que o cultivo de *L. acidophilus* CRL 1014 foi eficaz na redução da velocidade do processo oxidativo do sorvete. Pela Figura 21 observa-se melhor os comportamentos referentes ao grau de oxidação de cada produto em função do período de armazenamento, de acordo com os dados das Tabela 14.

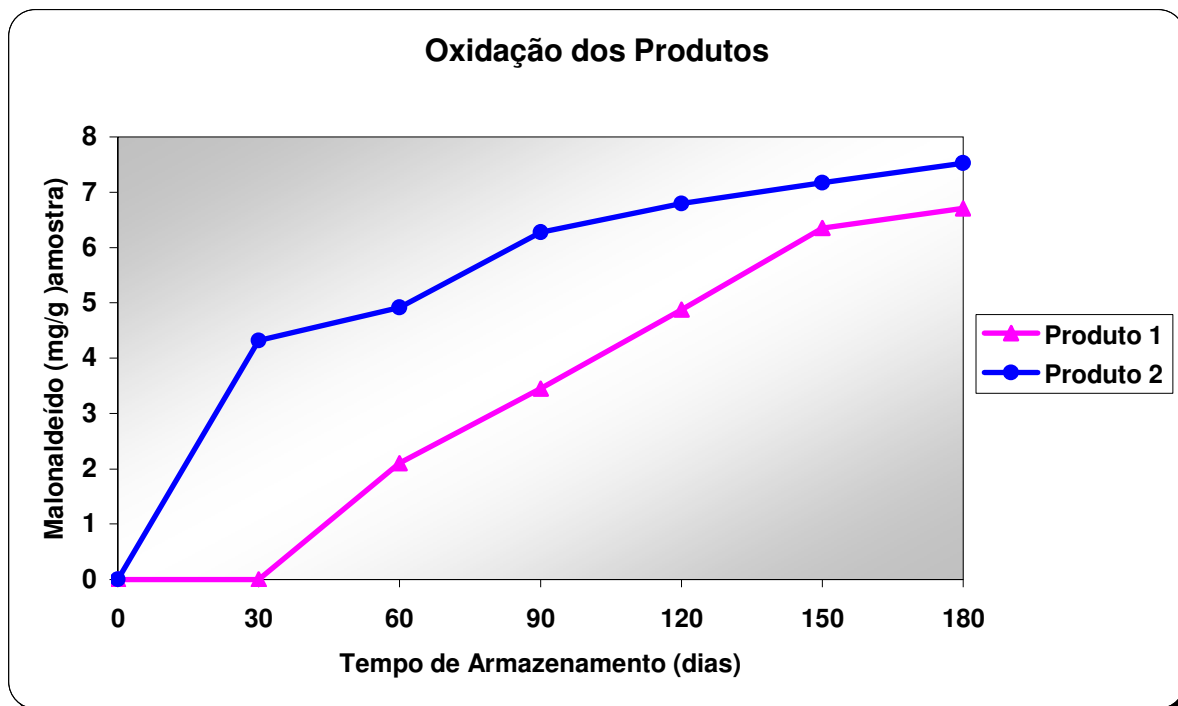


Figura. 21 – Concentrações médias de malonaldeído nos produtos ao longo do período de estocagem

Produto 1: sorvete de “iogurte”: 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon;

Produto 2: sorvete à base de extratos de yacon e soja com os demais ingredientes do iogurte, acidificado com adição de ácido láctico

5.4.4. Determinação da Composição Química

Para a definição da composição química das amostras de sorvete de iogurte, foram determinados os teores de umidade, sólidos totais, proteína, lipídeos, cinzas e carboidratos (Tabela 15).

Nota-se que o produto 1 apresentou maior concentração de sólidos totais em relação ao produto 2. Entretanto, a concentração de ambos não diferiu muito daquelas verificadas para alguns produtos similares descritos na literatura, cujos valores foram de 32,33 a 39,00% (ORDONEZ et al., 2000).

Tabela 15 - Composição centesimal das amostras de sorvete processadas

COMPONENTE (%)	AMOSTRAS	
	1	2
Umidade	57,62*	63,62*
Sólidos Totais	40,75*	35,25*
Proteínas	3,50	3,36
Lipídeos	1,89	1,46
Cinzas	0,44	0,45
Carboidratos	36,54*	31,11*
Valor Energético (Kcal/100g)	178	152

Médias com * na mesma linha diferem significativamente ($p \leq 0,05$) entre si, segundo o teste de *t*.

Formulação 1: sorvete de “iogurte”: 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon;

Formulação 2: sorvete à base de extratos de yacon e soja com os demais ingredientes do iogurte, acidificado com adição de ácido láctico

O teor de proteínas das amostras analisadas variou de 3,3 a 3,5% e não foi verificada diferença significativa entre as mesmas. Tieszen e Baer (1989) processaram algumas amostras de sorvete de iogurte e efetuaram uma comparação destas com amostras disponíveis comercialmente. Os teores de proteínas destes produtos foram bem superiores aos teores verificados nos sorvetes de iogurte regularmente encontrados no mercado, devido à utilização de leite ultrafiltrado como matéria-prima.

O teor de lipídeos não apresentou diferença significativa entre as amostras, variando de 1,46 a 1,8%. No presente trabalho a gordura foi substituída por “Emustab e Selecta Cream Duas Rodas”, aditivos que conferem ótimas textura e cremosidade com o diferencial de se obter no produto um teor de lipídios inferior aos sorvetes já existentes no

mercado, que apresentam em suas formulações a utilização de gordura. Miguel et al.(2004) também obtiveram sorvete de “iogurte” a base de extrato de soja com alto teor de lipídios (6 a 7,92%) pelo fato de não terem utilizado um substituto de gordura na formulação do produto.

Apesar da baixa concentração de lipídios representar um fator benéfico à saúde, alguns estudos destacam que grandes concentrações de gordura melhoram consideravelmente os atributos sensoriais do sorvete, tais como sabor e textura. Ordonez et al. (2000) destacaram que a gordura do leite empregada no processamento de sorvetes contribui para um sabor mais agradável, apresenta um ótimo poder sinergista para componentes flavorizantes adicionados a estes produtos, além de proporcionar também melhorias na qualidade da textura.

Quanto aos resultados do conteúdo mineral encontrado, houve uma variação não significativa de 0,40 a 0,45% entre amostras. Estes valores foram bem similares aos verificados para o leite e alguns fermentados à base de “leite” de soja (TAMINE e ROBINSON, 1985).

No tocante ao teor de carboidratos das amostras de sorvete, foram verificados valores de 31,11% para o produto 1 e 36,54% para o produto 2. Estes valores mostram-se superiores à média dos produtos disponíveis comercialmente devido à alta concentração de sacarose e glicose empregadas na formulação das caldas dos sorvetes, além, dos carboidratos próprios das matérias-primas utilizadas, em especial do extrato de yacon (PATEL et al, 1980; DUTRA de OLIVEIRA, 1982).

5.4.5. Determinação da concentração de frutooligossacarídeos tipo inulina

Considerando que as formulações dos sorvetes apresentam 25% (v/v) de extrato aquoso de yacon (fonte de prebiótico) foi determinada a concentração de FOS do tipo inulina, cujos cromatogramas encontram-se apresentados nas Figuras 22 e 23. Os resultados obtidos foram de 4,94 g/100g e 5,51g/100g de produto no sorvete simbiótico e sorvete controle (sem cultivo probiótico), respectivamente. Esses valores se encontram muito próximo das recomendações de ingestão diária descritas por alguns autores (ROBERFROID, 1999; MANNING e GIBSON, 2004). Rao (2001) verificou que a ingestão de 5g/dia de oligofructose é suficiente para elevar o número de bifidobactérias. De acordo com Reid et al. (2003) doses efetivas de prebióticos parecem estar entre 5 e 15g/dia para adultos.

A pequena diferença de concentração entre os dois produtos pode ser explicada pelo fato do produto 2 não ter passado por processo fermentativo, ao contrário do produto 1, no qual, provavelmente, os FOS foram parcialmente metabolizados pelo cultivo de *L. acidophilus* CRL 1014.

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

Vale ressaltar que ainda não há um consenso entre os vários trabalhos realizados com humanos quanto à concentração mínima de frutanos necessária para a promoção dos efeitos prebióticos. Entretanto, a partir de estudos realizados com humanos, Roberfroid (2007) reportou que a dose diária de prebiótico não correlaciona positivamente com a magnitude da

resposta bifidogênica. Recentemente, o autor revisou o conceito de prebióticos e sugeriu a adoção de um índice prebiótico, definindo-o como “aumento de bifidobactérias (expresso como número absoluto) dividido pela dose diária de prebióticos ingeridos”, sugerindo que a dose diária de prebiótico não é um determinante do efeito bifidogênico, o qual é influenciado principalmente pelo número de bactérias/g de fezes antes do início da suplementação com prebióticos.

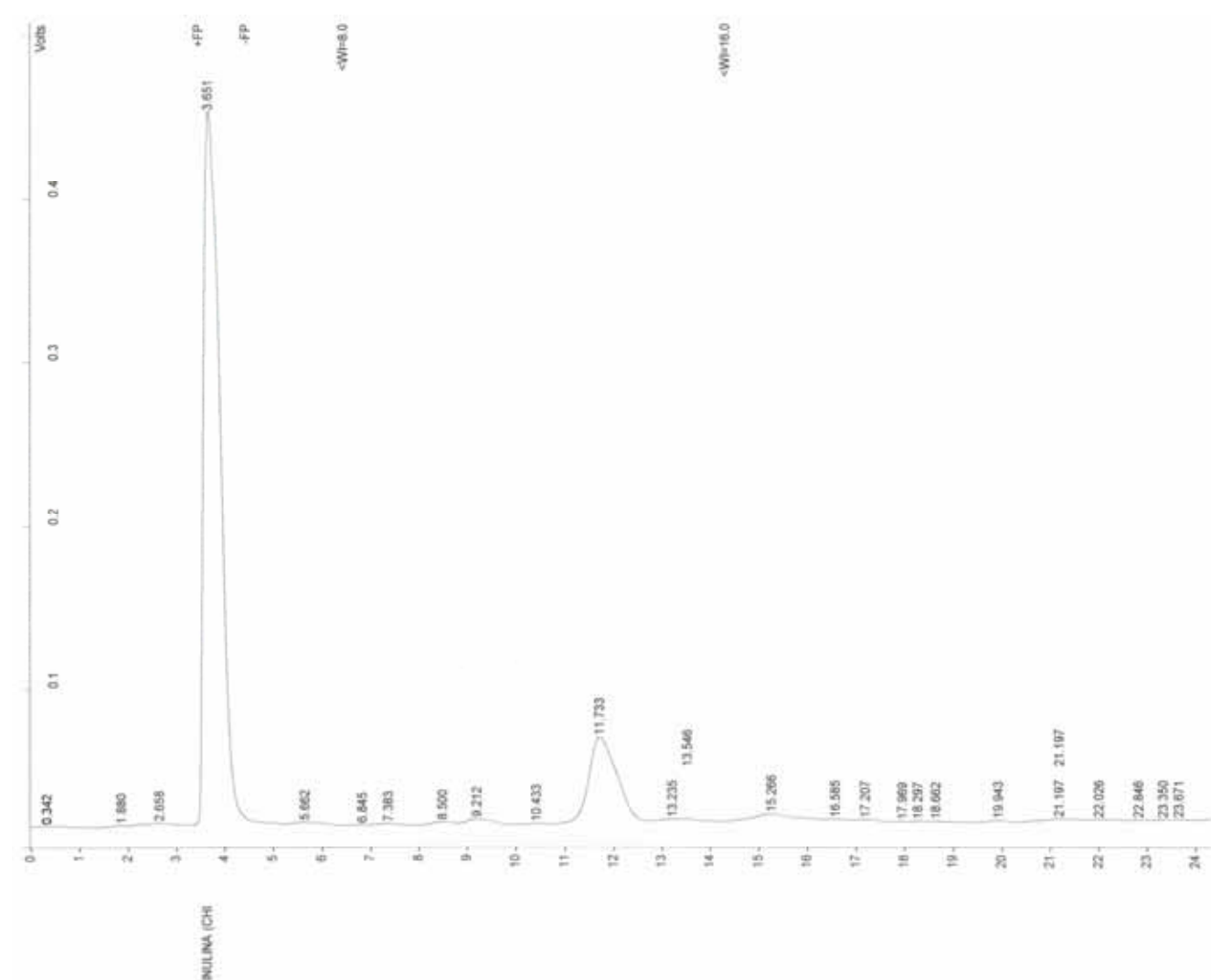


Figura 22. Cromatograma da inulina no sorvete simbiótico.

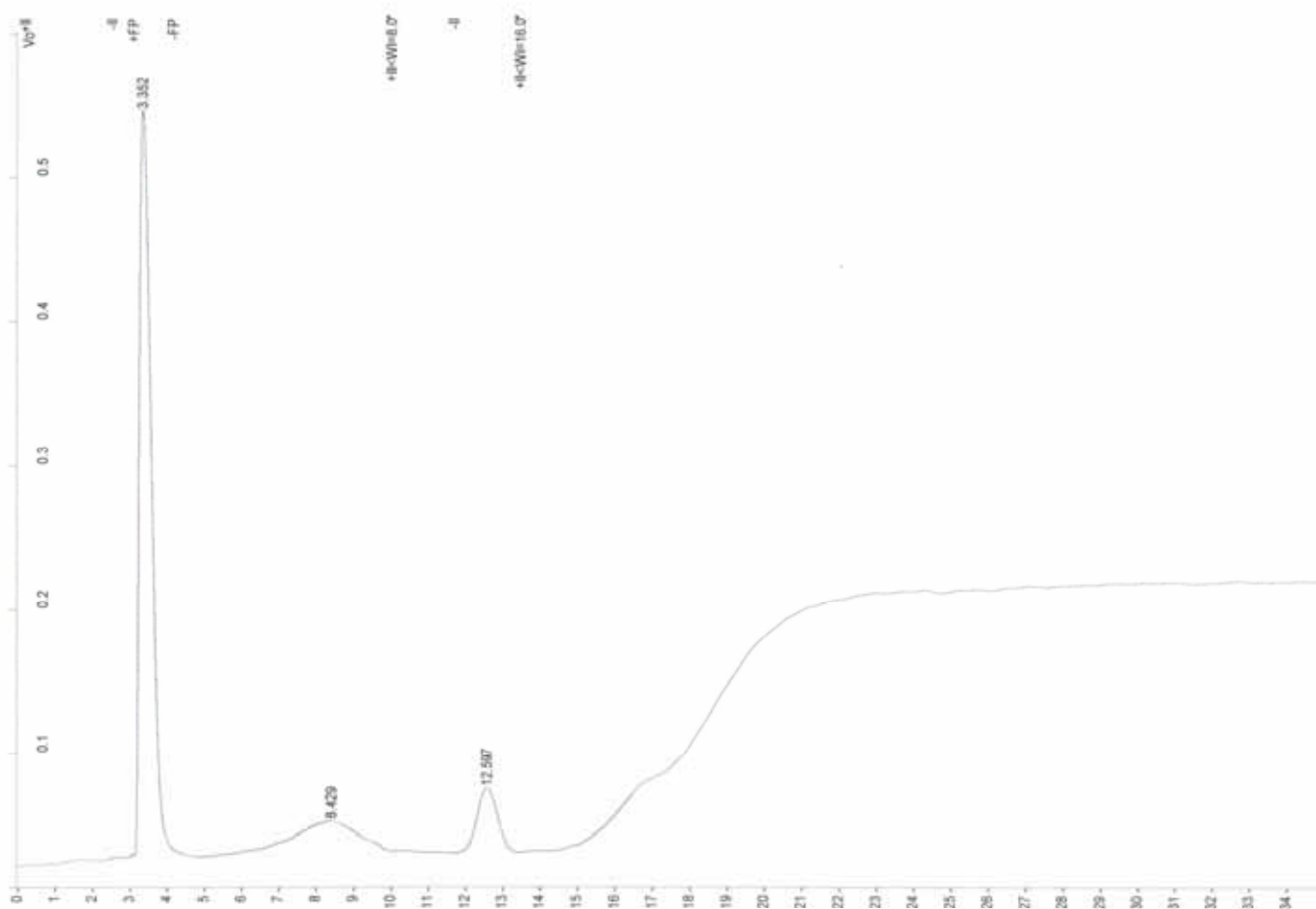


Figura 23. Cromatograma da inulina no sorvete controle (sem cultivo probiótico).

Conclusões

6 – CONCLUSÕES

- O tempo necessário para as amostras de “iogurte” atingirem o pH estipulado, variou de 7,5 a 9,5 horas, exceto, para a formulação constituída somente por extrato de yacon, que ultrapassou o período de 10,5 horas sem ter o seu pH reduzido;
- A formulação de “iogurte” com 100% de extrato de soja obteve as maiores médias em termos absolutos para todos os atributos avaliados não diferindo da formulação com 75% de extrato de soja e 25% de extrato de yacon, a qual foi selecionada para a continuidade deste estudo;
- A contagem de células viáveis de *L. acidophilus* CRL 1014 obtida para o “iogurte” simbiótico esteve acima do nível recomendado de 10^6 a 10^7 UFC/mL, satisfazendo assim o critério estabelecido para alimentos probióticos;
- O *L. acidophilus* CRL 1014 foi capaz de se desenvolver na presença de sais biliares até a concentração máxima de 0,5% de Ovgall e apresentou resistência às condições ácidas similares às do suco gástrico;
- As análises sensoriais das amostras de sorvete não apresentaram grandes variações para os atributos avaliados, ao longo do período de estocagem, o que sugere a possibilidade de armazenamento dos diversos produtos à temperatura de -23°C , sem comprometer, de forma significativa, a qualidade sensorial dos mesmos.

- As características probióticas do sorvete simbiótico foram preservadas, uma vez que apresentaram contagens de células viáveis superiores a 10^6 UFC /ml, ao longo de 180 dias de estocagem a -23°C .
- Foi observada a produção crescente de malonaldeído nos dois sorvetes processados, ao longo do período de estocagem, sendo que o cultivo probiótico, presente no produto 1, foi capaz de conter, em certo grau, o processo oxidativo.
- As análises físico-químicas realizadas nos dois sorvetes processados apresentaram diferença significativa apenas para os teores de carboidratos, umidade e sólidos totais.
- Os sorvetes de “iogurte” apresentaram uma concentração de inulina adequada para um produto prebiótico.

Referências Bibliográficas

7- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

ABIS. **Produção Mundial de Sorvete**. Disponível em: <http://www.abis.com.br/estat.asp>. Acesso em: 20 de abr. de 2008.

ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. **Microbiologia de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 464p. 1997.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. (Brasil). **Alimentos**. Comissões e Grupos de Trabalho. Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/ Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 13 abr. 2008. (Atualizado em agosto/2007. Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas).

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

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

ALAMPRESE, C.; FOSCHINO, R.; ROSSI, M.; POMPEI, C.; CORTI, S. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG addition in ice cream. **Int. J. Dairy Technol.**, v.58, p.200-206, 2005.

ASAMI, T.; KUBOTA, M.; MINAMISAWA, K.; TSUKIHASHI, T. Chemical composition of yacon, a new root crop from the Andean highlands. **Jpn. J. of Soil Sci and Plant Nutr.**, v.66, n.2, p.122-126, 1989.

ASHAYE, O.A.; AKINNAGE, C.A.; FASOYIRO, S.B.; TAIWO, L.B. Compositional and shelf-life properties of soy-yogurt using two starter cultures. **Nutr. Food Sci.**, v.31, p.247 – 250, 2001.

Association Official Analytical Chemistry. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17th ed. Arlington: AOAC., 1995. 1141 p.

AYBAR, M. J.; RIERA, A. N. S.; GRAU, A.; SÁNCHEZ, S. S. Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallantus sonchifollius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. **J. Ethnopharm.** v. 74, p. 125-132, 2001.

BACCARIN, A. Tecnologia da produção de sorvetes. 1982. Dissertação (mestrado em tecnologia bioquímica-farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BERNAL, O.L.M. **Desenvolvimento de uma bebida fermentada a partir de extrato hidrossolúvel de soja, contendo agentes probióticos e prebióticos.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, 2004, 132p.

BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J.P.; GUEGUEN, M. Probiotic properties of two *Lactobacillus* strains in vitro. **Milchwissenschaft**, v. 56, n. 12, p. 663-667, 2001.

BIELECKA, M.; PRZEWOZNA, A.; KOWALCZUK, J. Survival rate of yogurt cultures during production and storage of yogurt ice-cream. **Acta-Alimentaria-Polonica**, v.14, p. 163 – 168, 1990.

BRASIL, 2005. ANVISA/ MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução RDC nº 266, de 22 de setembro de 2005. "REGULAMENTO TÉCNICO PARA GELADOS COMESTÍVEIS E PREPARADOS PARA GELADOS COMESTÍVEIS". Publicada no **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF.

BRASIL. Lista de alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, atualizado em 11 de janeiro de 2005.

CANDIDO, L.M.B. Processamento de bebida funcional á base do yacon (*Polymnia sonchifolia* Poepping e Endlicher). 2004. 98p.. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, 2004.

CASTILHO, C.M.C. Sorvete: a delícia que alimenta. **Leite & Derivados**, v.1, n.6, p42-43, 1992.

CHANDAN, R.C. Considerations in the manufacture of frozen and soft serve yoghurt. **Food Prod. Dev.**, v.7, p.118 - 119, 1997.

CHANDAN, R.C.; SHAHANI, K.M. In: HUI, Y.H.; **Yogurt**. New York: VCH Publ., 1992. p. 1 - 56.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. **Int. J. of Food Microbiol.** v. 35, n. 1, p. 1-27, 1998.

CHOU, L.S; WEIMER, B. Isolation and Characterization of Acid- and Bile-Tolerant Isolates from Strains of *Lactobacillus acidophilus* . **J. Dairy Sci** . vol. 82, n. 1 , p.23-31, 1999.

COUSSEMENT, P. A. Inulin and oligofructose: safe intakes and legal status. **J. Nutr.** v.129, suppl., p.1412- 1417, 1999.

DAHLE, L.K.; HILL, E.G.; HOLMAN, R.T. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.98, p.253-261, 1962.

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Viability of yogurt and probiotic, in yogurt made from commercial starter cultures. **Int. Dairy J.** v. 7, n. 1, p. 31-41, 1997.

DAVIDSON, R.H.; DUNCAN, S. E.; HACKNEY, W.N.; EIGEL, W. N.; BOLING, J.W. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. **J. Dairy Sci.** v. 93, p. 666 – 673, 2000.

DELLO STAFFOLO, M.; BERTOLA, N.; MARTINO, M.; BEVILACQUA, A. Influence of dietary fiber addition on sensory and rheological properties of yogurt. **Int. Dairy J.** v.14, p. 263–268, 2004.

DONKOR, O. N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. **Int. Dairy J.** v. 16, p. 1181-1189, 2006.

DOUGLAS, L.C.; SANDERS, M.E. Probiotics and Prebiotics in Dietetics Practice. **J. Am. Diet. Assoc.** v.108, n. 3, p.510-521, 2008.

DUNKLEY, W.L.; JENNINGS, W.G. A procedure for application of the thiobarbituric acid test to milk. **J. Dairy Sci.** v. 34, p.1064-1069, 1951.

DUTRA de OLIVEIRA, J.E.; SANTOS, A.C.; WILSON, E.D. **Nutrição básica**. São Paulo: Sarvier, 1982. 286p.

EL-NAGAR, G.; CLOWES, G.; TUDORICA, C.M.; KURI, V.; BRENNAN, C.S. Rheological quality and stability of yog-ice cream with added inulin. **Int. J. of Dairy Technol.**, v.55, n.2, may, 2002.

ERKKILA S.; PETAJA E. Screening of commercial meat starter strains at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Sci** v.55, p. 297-300, 2000.

FAVARO-TRINDADE, C.S.; TERZI,S.C.; [TRUGO, L.C](#) et al. Development and sensory evaluation of soy milk based yoghurt. **ALAN.**, v.51, n.1, p.100-104, 2001.

FENAILLE, F.; VISANI, P., FUMEAUX, R., MILO, C; GUY, P.A. Comparison of mass spectrometry-based electronic nose and solid phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry technique to assess infant formula oxidation. **J. of Agr. and Food Chem.** v.51, p.2790-2796, 2003.

FERREIRA, C.L.L.F. Tecnologia para produtos lácteos funcionais: probióticos. In: PORTUGAL, J.A.B., CASTRO, M.C.D., SILVA, P.H.F., SAVINO, A.C., NEVES, B.S., ARCURI, E.F. **O Agronegócio do leite e os alimentos lácteos funcionais**. Juiz de Fora: EPAMIG - Centro Tecnológico - ILCT, p. 183-203, 2001.

FIORITI, J.A.; KANUK, M. J.; SIMS, R.J. Chemical and organoleptic properties of oxidized fats. **J. Am. Oil Chem.**, v.51, p. 219 – 223, 1974.

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

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.

FUCHS, R. H. B.; BORSATO, B.; BONA, E.; HAULY, M.C.O. “Iogurte” de soja suplementado com oligofrutose e inulina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 175-181, 2005.

FULLER, R.. A review: Probiotics in man and animals. **J. of Appl. Bacteriol.** v.66, p.365-378, 1989.

GIBSON, G.R; FULLER, R. Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **J Nutr.** v.130, p.391S-5S, 2000.

GIBSON, G. R.; WILLIS, C. L.; VAN LOO, J. Non-digestible oligosaccharides and bifidobacteria – implications for health. **Int. Sugar J.** v. 96, p. 381- 387, 1994.

GILLILAND, S. E.. Acidophilus milk products:A review of potential benefits to consumers. **J. Dairy Sci.** v. 72, p.2483–2494, 1989.

GILLILAND, S.E. Probiotics and Prebiotics. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L. **Appl. Dairy Microbiol.** 2. ed.New York: Marcel Dekker, p.327 – 343, 2001.

GILLILAND, S.E.; NELSEN, C.R.; MAXWELL, C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.49 n. 277-81, p.2077-2080, 1984.

GILLILAND, S.E., SPECK, M.L. Instability of *L. acidophilus* in yoghurt. **Dairy Sci.** v. 60, p.394-1398, 1987.

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

GOMES, A.M.P., MALCATA, F.X. Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Sci. and Technol.** v. 10, p.139– 157, 1999.

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J.F.; INGLIS, V. A review on the use of microorganisms as probiotics. **Rev. Latinoam. Microbiol.** v.40, p. 166–172, 1998.

GONZÁLEZ, S. Alimentos lácticos probióticos. In: LERAYER, A.L.S., SALVA, T.J.G., coords. **Leites fermentados e bebidas lácteas**. Campinas: ITAL, p. 10.1-10.6., 1997

GRAEFE et al. Effects of post-harvest treatments on the carbohydrate composition of yacon roots in the Peruvian Andes. **Field Crops Res.** Lima, v.86, p.157-165, 2004.

GRAU, A.; REA, J. **Yacon *Smallanthus sonchifolius*. (Poepp. & Endl.)**. Disponível em: <<http://www.cipotato.org>> Acesso em: 12 mai. 2008.

GRAY, J.I. Measurement of lipid oxidation: a review. **J. Am. Oil Chem.**, v. 56, 1055 – 1058, 1978.

GREENE, B.E.; CUMUZE, T.H. Relationship between TBA-numbers and inexperienced panelists assessments of oxidized flavor in cooked beef. **J. Food Sci.**, v. 47, p.52-58, 1981.

GUARNER, F.; PERDIGON, G.; CORTIER, G.; SALMINEN, S.; KOLETZKO, B.; MORELLI, L. Should yoghurt cultures be considered probiotic? Br. **J. Nutr.** v.93, p.783-786, 2005

GUINARD, J.X. Session III: Additives, colours, flavours. In: BUCHHEIM, W. *Ice Cream - Proceedings of the international symposium held in Athens*. **Int. Dairy Fed.** p. 91-103, 1998.

GUPTA, P.K.; MITAL, B.K.; GARG, S.K. Characterization of *Lactobacillus acidophilus* strains for use as dietary adjunct. **International J.Food Microbiol.** v. 29, p. 105–109, 1996.

HARAMI, J.B. **Desenvolvimento de cereal em barra com gelado comestível simbiótico**. 2008.133f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2008.

HAVENAAR, R.; HUIS IN 'T VELD., J.H.J. **Probiotics; a general review**. In: Wood, B. *The Lactic acid bacteria in health and disease.*, p. 151-170, Elsevier, Barking, RU, 1992.

HAULY, M.C.O.; FUCHS, R.H.B.; PRUDENCIO-FERREIRA, S.H. Suplementação de iogurte de soja com frutooligossacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. **Rev. Nutr.** , Campinas, v. 18, n. 5, 2005 .

HEENAN, C.N.; ADAMS, M.C.; HOSKEN, R.W.; FLEET, G.H. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. **LWT – Food Sci. Technol.**, v.37, p.461-466, 2004.

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

HERMANN, M.; FREIRE, I., PAZOS, C, **Compositional diversity of the yacon storage root**. In: *Impact on a changing world*. Program Report. CIP, Lima, p.199- 242, 1997-1998.

HILL, M.J.; DRASER, B.S. Degradation of bile salts by human intestinal bacteria. **Gut.**,v.9, p.22–7, 1968.

HILL, M.J. Factors controlling the microflora of the healthy upper gastrointestinal tract. In *Human Microbial Ecology*, ed. HILL, M.J. & MARSH, P.D., cap. 2, p. 57-85, Boca Raton, Florida: CRC Press. 1990.

HOIER, E.; JANZEN, T.; HENRIKSEN, C.M.; RATTRAY, F.; BROCKMANN, E.; JOHANSEN, E. The production, application and action of lactic cheese starter cultures. In: LAW, B.A., ed. **Technol. of Cheesem.**. Boca Raton: CRC Press, 1999. p.99-131

HOLCOMB, J.E; FRANK, J.F. Viability of *Lactobacillus Acidophilus* and *Bifidobacterium Bifidum* in soft – serve frozen yogurt. **Cult. Dairy Prod. J.**, v.26, p. 4-5, 1991.

HOYLAND, D. V.; TAYLOR, A. J. A review of the methodology of the 2-thiobarbituric acid test. **Food Chem.** n.40, p.271-29, 1991.

HUGHES, D.B. ; HOOVER, D.G. Bifidobacteria: Their potential use in American dairy products. **Food Technol.** v.45, n.4, p. 74-83, 1991.

INOUE, K.; SHIOTA, K.; ITO, T. Preparation and properties of ice cream type frozen yogurt. **J. Dairy Technol.**, v.51, p.44-51, 1998.

KAPULER, A.M.; GURUSIDDIAH, S. The twenty protein aminoacids free in the juices four common vegetables and herbs. *Journal of Home & Consumer Horticulture*, v. 1, n. 1, p. 3-18, 1994. Apud: **Food Sci. and Technol. Abstr.** England, HU105, 1994.

KAUR, N.; GUPTA, A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **J. Biosci., Bangalore**, v.27, p.703-714, 2002.

KIM, H.S. Characterization of Lactobacilli and Bifidobacteria as Applied to Dietary Adjuncts. **Cult. Dairy Prod. J.** v. 23, n.3, p. 2-6, 1998.

KLAENHAMMER, T.R., KULLEN, M.J. Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 50:45-57, 1999.

KNUPP, J.R. Frozen Yogurt. **Cult. Dairy Prod. J.** v.16, p.16-21, 1979.

KOSIKOWSKI, F.V. The evolution and technology of frozen yogurt. **Dairy Ice Cream Field.**, v.160, p.84-84F, 1977.

KOSIKOWSKI, F.V. Properties of commercial flavored frozen yogurts. **J. Food Protect.** v.44, p.853-856, 1981.

KOSUGI, H.I.; KIKUGAWA, K. Thiobarbituric acid-reactive substances in chicken fat and unsaturated fatty acids. **J. Food Sci.**, v. 50, p. 1181 – 1182, 1985.

KURMANN, J.A.; RASIC, J. L.. The health potential of products containing bifidobacteria. *Em Robinson, R. K. (ed.), Therapeutic properties of fermented milks*, p.117-157. Elsevier Applied Science Publishers, Londres, RU. 1991.

LAROIA, S.; MARTIN, J. H. Bifidobacteria as possible dietary adjuncts in cultured dairy products—a review. **Cult. Dairy Prod. J.** v. 25, p.18–22, 1990.

LEE, Y.K; NOMOTO, K., SALMINEN, S., GORBACH, S.L. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, 211p., 1995.

LILLEY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Sci.**, v.147, p.747-748, 1965.

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

LOPEZ, M.C.; MEDINA, L.M.; JORDANO, R. Survival of lactic acid bacteria in comercial frozen yogurt. **J. Food Sci.**, v.63, p.706-708, 1998.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. **Int. Dairy Journal**. v. 11, p. 1-17, 2001.

MAIA, M.J.L. **Qualidade e rendimento do “leite” de soja da Unidade de Produção de Derivados de Soja** – Unisoja – FCF/ Unesp. 2005. 64f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição)- Faculdade de Ciencias Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista. 2005.

MANNING, T.S.; GIBSON, G.R. Prebiotics. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v.18, p.287-298, 2004.

MANZANARES, A. Lácteos de alto consumo en Latinoamérica. **Tecnologia Láctea Latinoamericana.**, v. 5, p.31-39, 1996.

MARCHETTI, G. Inulina e fruttani. **Industrie Alimentari**, v. 32, n. 319, p. 945-949, 1993.

MARSHALL, R. T.; ARBUCKLE, W. S.. **Ice Cream**. 5th ed. Chapman and Hall, New York, 1996.

MARTEAU, P.; POCHART, P.; BOUHNICK, Y.; RAMBAUD, J.C. The fate and effects of transiting, nonpathogenic micro-organisms in the human intestine. In: SIMOPOULOS, A.P.; CORRING, T.; RÉRAT, A. (Ed). Intestinal flora, immunity, nutrition and health. **World Rev. Nutr. Diet**, v.74, p.1–21, 1997.

MATEOS, R.; LECUMBERRI, E.; RAMOS, S.; GOYA, L.; BRAVO, L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress: Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. **J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.**, v.827, n.1, p.76-82, 2005.

MATTILA-SANDHOLM T. ; MYLLARINEN P. ; CRITTENDEN R. ; MOGENSEN G, FONDEN R. ; SAARELA M. Technological challenges for future probiotic foods. **Int. Dairy J.** V.12, p.173-182, 2002.

MENDOZA, E.; GARCÍA, M. L.; CASAS, C.; SELGAS, M. D. Inulin as fat substitute in low fat, dry fermented sausages. **Meat Sci.**, v.57, p.387-393, 2001.

MIGUEL, D.P; ROSSI, E. A.; VALDEZ, Graciela Font de. Sensory and chemical aspects of frozen soy yogurt fermented with *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus jugurti*.. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, p. 197-201, 2004.

MIGUEL, D.P; ROSSI, E. A. Viabilidade de bactérias ácido-láticas em sorvetes de iogurte, durante o período de estocagem. **Alimentos e Nutrição**, v. 14, n. 1, p. 93-96, 2003

MOSCATTO, J.A., BORSATO, D., BONA, E., OLIVEIRA, A.S., HAULY, M.C.O. The optimization of the formulation for a chocolate cake containing inulin and yacon meal. **Int. J. of Food Sci. and Technol.** v. 41, n. 2, p. 181- 188, 2006.

MOSHFEGH, A.J.; FRIDAY, J.E; GOLMAN, J. Presence of inulin and oligofructose in the diet of Americans. **J. Nutr.** v. 129, p.75, 1999.

NIETO, C.C.; Estudios agronómicos y bromatológicos en jicama (*Polymnia sonchifolia* Poep et Endl.). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 41, n.2, p.213-221, 1991.

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

O'BRIEN, C. M. et al. Evaluation of the effects of fat replacers on the quality of wheat bread. **J. of Food Eng.** Oxford, v. 56, n. 2-3, p. 265 267, 2003.

OLIVEIRA, M. N., DAMIN, M. R. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação e na viabilidade de bactérias do iogurte e das probióticas em leite fermentado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**.. Campinas, v.23, n.(supl.), p.172 - 176, 2003.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 38, n. 1, p. 1-21, 2002.

OLSON, D.W.; ARYANA, K.J. An excessively high *Lactobacillus acidophilus* inoculation level in yogurt lower quality during storage. **Lwt Food Sci. Technol.**, v.41, p-911-918, 2008.

OHYAMA, T.; ITO, O.; YASUYOSHI, S.; IKARASHI, T. Composition of storage carbohydrate in tubers of yacón (*Polymnia sonchifolia*) . **Soil Sci. Plant Nutrition**, v. 36, p.167-171, 1990.

ORDONEZ, G.A.; JEON, I.J.; ROBERTS, H.A. Manufacture of frozen yogurt with ultrafiltered milk and probiotic lactic acid bacteria. **J. Food Process. Preserv.**, v.24, p. 163 – 176, 2000.

OSAWA, C.C., FELÍCIO, P.E., GONÇALVES, L.A.G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n.4, p.655-663, 2005.

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

PARK, S.C.; HWANG, M.H. ; KIM2, Y.H.; KIM, J.C.; SONG, J.C.; LEE, K.W.; JEONG, K.S.; RHEE, M.H.; KIM, K.S.; KIM, T.W. Comparison of pH and bile resistance of

Lactobacillus acidophilus strains isolated from rat, pig, chicken, and human sources. **World J. of Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, p. 35–37, 2006

PARKER, R.B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Animal Nutr. and Health**. v. 29, p. 4-8, 1974. Apud **Int. Dairy J.** v. 9, p. 32-61, 1999.

PATTON, S. Malonaldeyde, lipid oxidation and the thiobarbituric acid test. **J. Am. Oil. Chem. Soc.** v.21, p.114, 1974.

PAULY-SILVEIRA, N. D. **O emprego da metodologia de superfície de resposta no desenvolvimento de um novo produto simbiótico, fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* ssp. *jugurti* CRL 416 à base de extratos aquosos de soja e de yacon (*Smallantus sonchifolia*).** 2009. 133f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 2009.

PEREIRA, D.I.A.; GIBSON, G.R. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v.37, n.4, p. 259 – 291, 2002.

PENNACCHIA, C.; ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; PEPE, O.; MAURIELLO, G. ; Villani, F. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. **Meat Sci.**, v. 67, n. 2, p. 309-317, 2004.

PITHONG, R.; MACRAE, R.; DICK, J. The development of a soya based yoghurt; III . Analysis of oligosaccharides. **J. Food Technol.** , v.15, p.661-667, 1980.

QUADROS, M.H. ; BORTOLOZO, E. A. F. Q. . Aplicação de Inulina e Sucralose em iogurte. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. v. 1, p. 37-47, 2007.

RAO, V. “The Prebiotic properties of oligofructose at low intake levels.” **Nutr. Res.** v. 21, p.843-848, 2001.

REDONDO, N.C. **Avaliação *in vitro* de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416.** 2008. 109p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2008.

REID, G.; MCGROARTY, J.A.; ANGOTTI, R.; COOK, R.L. *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. Canadian, **J. Microbiol.**, v.34, p. 344–351, 1988.

RIUS, N.; SOLE, M.; FRANCIS, A.; LOREN, J.G. Buffering capacity and membrane H⁺ conductance of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 120, p. 291-296, 1994.

ROBERFROID, M. Dietary fiber, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects. **Crit. Rev. in Food Sci. and Nutr.** v.33, n.2, p.103-148, 1993.

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

ROBERFROID, M.B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? **Am. J. Clin. Nutr.**, v.71, 1682S-1687S, 2000.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics: the concept revisited. **J. Nutr.** v.137, p.830S-837S, 2007.

ROBINSON, R. K. The potential of inulin as a functional ingredient. **British Food Journal**, Bradford. v. 97, n. 4, p. 30-32, 1995.

ROSMINI, M.R.; PERLO, F.; ÀLVAREZ, J.A.P.; MORENO, M.J.P.; GATO, A.G.; SANTOVENA, F.L.; CATALÁ, V.A. TBA test by na extractive method applied to 'patê'. **Meat Sci.**, v.42, p.103-110, 1996.

ROSSI, E.A.; REDDY, K.V.; SILVA, R.S.S.F. Formulation of soy-whey yogurt using response surface methodology. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 27, p. 387-390, 1984.

ROSSI, E.A.; SILVIA, H.C.; BIANCHI, M.L.P. Redução dos níveis de oligossacárides em "iogurte" de soja pelo uso de culturas lácticas. **Alim. Nutr.**, v.1, p.37-46, 1989.

ROSSI, E.A.; GIORI, G.S.; HOLGADO, A.P.R.; VALDEZ, G.F. *In vitro* effect of *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus* on cholesterol. **Microbiol. Alim. Nutr.**, v. 12, p. 267-270, 1994.

ROSSI, E.A.; VENDRAMINI, R.C.; CARLOS, I.Z.; PEI, Y.C.; VALDEZ, G.F. Development of a novel fermented soymilk product with potencial probiotic properties. **Eur. Food. Res. Technol.**, v. 209, p. 305-307, 1999.

ROSSI, E.A.; VENDRAMINI, R.C.; CARLOS, I.Z.; UEJI, I.S.; SQUINZARI, M.M.; SILVA JUNIOR S.I.; VALDEZ, G.F. Effects of a novel soy product on the serum lipids of hypercholesterolemic rabbits. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 74, p. 213-216, 2000.

ROSSI, E.A.; VENDRAMINI, R.C.; CARLOS, I.Z.; OLIVEIRA, M.G.; VALDEZ, G.F. Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre os lípides séricos de homens adultos normocolesterolêmicos. **Arq. Latin. Nutr.**, v. 53, p. 47-51, 2003.

SALMINEN, S.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. **Antonie van Leeuwenhoek** . v.70, p.347-358, 1996.

SAMONA, A., ROBINSON, R.K. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. **J. of the Soc. of Dairy Technol.** v.44, p.64-66, 1994.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutr. Rev.** v.61, n.3, p.91-99, 2003.

SANDERS, M. E., D. C. WALKER, K. M. WALKER, K. AOYAMA., T. R. KLAENHAMMER. Performance of commercial cultures in fluid milk applications. **J. Dairy Sci.** v. 79, p.943–955, 1996.

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

SHAH, N.P., LANKAPUTHRA, W.E.V., BRITZ, M., KYLE, W.S.A. Survival of *L. acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. **Int. Dairy J.** 5:515-521, 1995.

SHINODA, D.; KUSUDA, Y.; ISHIDA, N.; IKEDA, K.; KANEKO, O.; MASUDA, E.; YAMAMOTO, N. Survival of *Lactobacillus helveticus* strain CP53 in the human gastrointestinal tract **Lett. Appl. Microbiol.**,v.32, p.108-113, 2001.

SIDWELL, C. G.; SALWIN, H.; BENCA, M.; MITCHELL, J. H. The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation. **J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 31, p.603- 606, 1954.

SIM, A.S.; SALONIKAS, C.; NAIDOO, D.; WILCKEN, D.E.L. Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal standard. **J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.**, v.785, p.337-344, 2003.

SILVA, E.B.; et al. Correlação entre peso, área e diâmetro de raízes do yacon (*Polymnia sonchifolia* Poepping & Endlicher). In: ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 8., 2003. **Anais...** Curitiba. CD-ROM.

SOUZA, G.; OLIVEIRA, A.J.; SHIROSE, I. Aceitabilidade do sabor de iogurte de leite de soja adicionado de leite de vaca. [Colet. Inst. Tecnol. Alimentos](#); v. 18, p.69-76, 1988.

SPECK, M.; HANSEN, A. Properties of frozen non-fruit yogurt. **J. Food Prot.**, v.1, p.26-29, 1983.

SPERTY, G.S. **Probiotics**. West point Connecticut: Avi Publishing Col, 1971 apud **Int. Dairy J.** v.9, p.53-61, 1999.

STAFFOLO, M.D. et al. Influence of dietary fiber addition on sensory and reological properties of yogurt. *International Dairy Journal*. v.14, p.263-268, 2003.

STANTON, C.; DESMOND, C.; COAKLEY, M.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Challenges facing development of probiotic- containing functional foods. In: FARNWORTH, E.R., ed. **Handboock of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC Press, p.27 -58, 2003.

STEGHENS, J.P.; KAPPEL, A.L.V.; DENIS, I.; COLLOMBEL, C. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. **Free Radical. Biol. Med.**, v.31, n.2, p.242-249, 2001.

STONE, H.; SIDEL, J.L. **Sensory evaluation practices**. 2nd ed. London: Academic Press, 1993. 338p.

TAMINE, A.Y.; ROBINSON, R.K. **Yoghurt: science and technology**. Oxford: Pergamon, 1985, 431p.

TAMINE, A. Y. ; ROBSON, R. K. **Yogurte: ciência e tecnologia**. Ed. Zaragoza, Acribia, 1991, 367 p.

THUNELL, R. K., SANDINE, E., ; BODYFELT, F. W. Frozen starters from internal-pH-control-grown cultures. **Journal of Dairy Science**. v.67, p. 24–36, 1984.

TIESZEN, K.M.; BAER, R.J. Composition and microbiology quality of frozen yogurts. **Cult. Dairy Prod. J.** v.24, p.11-14, 1989.

TORRES, E. A. F. S.; OKANI, E.T. Teste de TBA: Ranço em alimentos. **Revista Nacional de Carne**. v.243, p. 68-76, 1997.

TRAVI ALIMENTOS. A história do frozen yogurt. Disponível em: <http://www.travialimentos.com.br/historia.htm>. Acesso em: 05 de novembro de 2002.

TUITEMWONG, P. ; RONPAIRIN, C. ; INSORN, S. ; TUITWONG, K. ; TANASUPAWAT, S. Frozen soy yogurt with bifidus and acidophilus bacteria. **IFT annual meeting: book of abstracts**. v. 78, ISSN 1082 – 1236, 1996.

VALERO, E.; VILLAMIEL, M.; MIRALLES, B.; SANZ, J.; MARTINEZ-CASTRO, I. Changes in flavour and volatile components during storage of whole and skimmed UHT milk. **Food Chemistry**. v.72, p.51-58, 2001.

VAN LOO, J. et al. Inulin and oligofructose in the western diet. (in press). **Crit. Rev. Food Sci. Nutri.**, v.35, n.6, p.525- 552, 1995.

VEDAMUTHU, E.R. The yogurt story – past, present and future. Part. VI. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 11, n. 9, p. 513-514, 1991.

VICHI, S.; PIZZALE, L.; CONTE, L.S; BUXADERAS, S.; LÓPEZ-TAMAMES, E. Solidphase microextracion in the analysis of virgin olive oil volatile fraction: modifications induced by oxidation and suitable markers of oxidative status. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v.51, p.6564-6571, 2003.

VIDAL-VALVERDE, C.; FRÍAS, J.; VALVERDE, S. Changes in carbohydrate composition of legumes after soaking and cooking. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 93, n. 5 , may, p. 547-550, 1993.

VILHENA, S.M.C.; CÂMARA, F.L.A.; KAKIHARA, S.T. O cultivo de yacon no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 1, p. 5-8, março 2000.

VINDEROLA, C.G.; BAILO, N.; REINHEIMER, J.A. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. **Food Research International**. v. 33, n. 2, p. 97-102. 2000.

VORAGEN, A. G. J. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. **Trends Food Science & Technology**, v.9, p.328-335, 1998.

VOSNIAKOS, F. et al.. Effect of 131 I on lactic acid microflora of yoghurt. **Dairy Food and Environmental Sanitation**, v. 8, n.11, p. 433-435, 1991.

ZOMMARA, M.; TAKAGI, H.; SAKONO, M.; SUZUKI, Y.; IMAIZUMI, K. Effect of milk whey and its fermentation products by lactic acid bacteria on mitochondrial lipid peroxide and hepatic injury in bile duct - ligated rats. **Biosci., Biotechnol. and Biochem.**, v. 58, p.1213 – 1217, 1994.

WALSTRA, P. e JONKMAN, M. Session I: emulsion and foam stabilization. BUCHHEIM, W. *Ice Cream - Proceedings of the international symposium held in Athens*. International Dairy Federation, p.17-24, 1998.

WANG, X.; GIBSON, G.R. Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. **J Appl Bacteriol**, Cambridge, v.74, n.4, p.373–380, 1993.

WANG, S. H.; ASCHERI, J. L. R. Iogurte de soja: fermentação láctica e avaliação sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 11, n.2, p. 212- 238, 1991.

WARKER, R., KAMAT, A., KAMAT, M. Incidence of pathogenic psychrotrophs in ice cream sold in some retail outlets in Mumbai, Índia. **Food Control** , v.11, p.77-83, 2000.

WHITEHEAD, W.E.; BODYFIELD, F.W.; SNADINE, W.E. Evaluation of the microbial quality of frozen yogurt products. **Cult. Dairy Prod. J.**, v.8, p.22-23, 1993.