

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0905343-3 A2**

(22) Data de Depósito: 14/12/2009
(43) Data da Publicação: 09/08/2011
(RPI 2118)



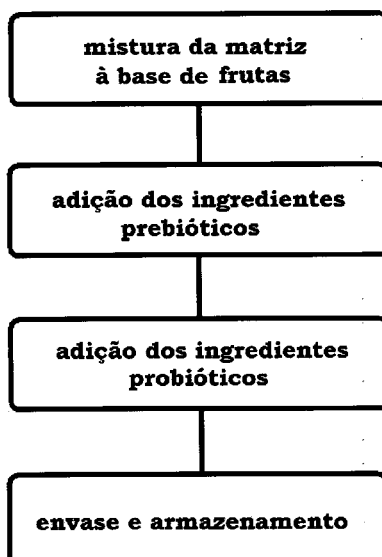
(51) *Int.Cl.:*
A23G 9/04 2006.01
A23G 9/42 2006.01
A23G 9/36 2006.01

(54) Título: **PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE GELADOS COMESTÍVEIS SIMBIÓTICOS, À BASE DE FRUTAS, NÃO-LÁCTEO, PRODUTOS GELADOS COMESTÍVEIS E SEU USO**

(73) Titular(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, Universidade de São Paulo - USP

(72) Inventor(es): Bruno Garcia Vasconcelos, Susana Marta Isay Saad

(57) Resumo: PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE GELADOS COMESTÍVEIS SIMBIÓTICOS, À BASE DE FRUTAS, NÃO-LÁCTEO, PRODUTOS GELADOS COMESTÍVEIS E SEU USO. A presente invenção refere-se ao processo de fabricação de gelados comestíveis contendo culturas probióticas e ingredientes prebióticos (simbiótico), à base de frutas e não-lácteo e o dito produto gelado comestível. Adicionalmente, o presente pedido de patente destina-se ao uso dos produtos comestíveis como alimento funcional.



**“PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE GELADOS COMESTÍVEIS
SIMBIÓTICOS, À BASE DE FRUTAS, NÃO-LÁCTEO, PRODUTOS
GELADOS COMESTÍVEIS E SEU USO”**

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se ao processo de fabricação de
gelados comestíveis contendo culturas probióticas e ingredientes
prebióticos (simbiótico), à base de frutas e não-lácteo e o dito produto
gelado comestível. Adicionalmente, o presente pedido de patente
destina-se ao uso dos produtos comestíveis como alimento funcional.

10 **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

Diversos estudos têm mostrado que alimentos adicionados
de probióticos e prebióticos, em quantidades suficientes, trazem
benefícios à saúde humana. Esses benefícios se devem,
fundamentalmente, ao seu efeito na manutenção da microbiota
15 intestinal benéfica.

Os alimentos consumidos pelo homem definem, em grande
parte, a saúde, o crescimento e o desenvolvimento das pessoas. A dieta
e a nutrição são de extrema importância para promover e manter a boa
saúde ao longo de toda a vida. Está bem estabelecida sua função como
20 fatores determinantes de doenças incluindo, por exemplo, doenças
crônicas não transmissíveis. Dessa forma, a dieta e nutrição são
componentes fundamentais das atividades de prevenção (FOOD AND
AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD
HEALTH ORGANIZATION. *Dieta, nutrición y prevención de enfermedades*
25 *crônicas*, 2003, p.152. Disponível em:
<http://www.fao.org/wairdocs/who/ac911s/ac911s00.htm> . Acesso em:
01 jun. 2009).

Tendo em vista a importância da alimentação relativa ao
seu impacto na saúde, em meados dos anos 80, o Japão esforçou-se

para desenvolver alimentos que possibilitassem a redução dos gastos com saúde pública, considerando a elevada expectativa de vida naquele país. Criou-se o conceito de Alimentos para Uso Específico de Saúde (ou FOSHU, em inglês) (STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, T. T.; GOMES, R. C.; AMARAL, M. P. H.; CARVALHO, A. F.; VILELA, M. A. P. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.43, n.2, p.181-194, 2007). Tais alimentos deram início para o conceito de “alimentos funcionais”.

Um alimento pode ser considerado como “funcional” caso tenha sido demonstrado satisfatoriamente sua influência benéfica em um ou mais funções alvo no organismo, além dos efeitos nutricionais adequados, de forma a ser relevante tanto para melhorar o estado de saúde e bem-estar quanto reduzir o risco de uma doença. Alimentos funcionais devem continuar sendo alimentos e devem apresentar seus efeitos e quantidades normalmente ingeridas (HOWLETT, J. Functional Foods - From Science to Health and Claims. ILSI Europe Concise Monograph Series 2008:1-1-36. Disponível em: <http://europe.ilsil.org/NR/rdonlyres/97C50D2F-8DDB-415F-AC6C-E20ED1B5E7D1/0/FunctionalFoods2008.pdf> . Acesso em: 01 jun. 2009).

Entretanto, cada país aborda o assunto a sua maneira. No Brasil, é definido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (1999) “alegação de propriedade funcional”, ao invés de “alimentos funcionais” em si, sendo a alegação “relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano”.

Atualmente, a venda de produtos “saudáveis” para outros que não “pessoas saudáveis” alcançou sucesso sem precedentes. Muitos consumidores optam por versões mais saudáveis de produtos dos quais eles já consomem, sendo incapazes ou relutantes em adaptar a sua
5 dieta aos guias dietéticos sugeridos (ARVANITOYANNIS, I.; HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, M. Functional Foods: A Survey of Health Claims, Pros and Cons, and Current Legislation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.45, p.385-404, 2005). Tendo em vista esse desafio, cientistas e indústrias têm desenvolvido produtos voltados
10 aos consumidores supracitados, a fim de combinar o sabor e a conveniência com os benefícios de curto ou longo prazo (KATAN, M. B.; ROOS, N. M. Promises and problems of functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.44, p.369-377, 2004).

Alguns exemplos de produtos já comercializados ao redor do
15 mundo encontram-se descritos por ARAI, ARVANITOYANNIS e HOUWELINGEN e SIRÓ e seus colaboradores (ARAI, S. Global view on functional foods: Asian perspectives. *British Journal of Nutrition*, v.88, suppl.2, p.S139-S143, 2002., ARVANITOYANNIS, I.; HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, M. Functional Foods: A Survey of Health Claims,
20 Pros and Cons, and Current Legislation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.45, p.385-404, 2005 e SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite*, v.51, n.3, p.456-467, 2008, os quais possuiriam alegações funcionais permitidas
25 sob a ótica da presente legislação brasileira com respeito às suas substâncias bioativas e probióticos, tais como, açúcar, almôndegas, arroz cozido, cereais, coalhada (inclusive de soja), galantina (*aspic*, em inglês), iogurte, leite e leite fermentado, macarrão, margarina, molho, ovos, pães, salsicha e sopas (inclusive tipo misô). Tal mercado tende a

aumentar à medida que os consumidores forem se sensibilizando com seus benefícios.

Segundo Guarner e Malagelada (GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. *Lancet*, v.360, p.512-518, 2003), a colonização do trato gastrointestinal (TGI) de recém-nascidos tem início imediatamente após o nascimento e ocorre em poucos dias. Inicialmente, o tipo de parto (natural *versus* cesárea) e o tipo de alimentação (leite materno *versus* fórmulas infantis) podem afetar o perfil de colonização. Outros fatores ambientais também desempenham um papel importante e vão desde diferenças existentes entre crianças nascidas em países desenvolvidos e os nascidos em países em desenvolvimento, a crianças de diferentes alas hospitalares. A colonização inicial é muito importante para a composição da microbiota permanente em adultos.

Os gêneros *Bacterioides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Ruminococcus* são predominantes nos seres humanos, enquanto os aeróbios (anaeróbios facultativos) como *Escherichia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Proteus*, entre outros, estão entre os gêneros subdominantes. Tais bactérias anaeróbias superam em número as aeróbias na razão 100-1000:1. Cada indivíduo possui várias centenas de espécies pertencentes a tais gêneros, com uma combinação particular de espécies predominantes diferentes de outros indivíduos (GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. *Lancet*, v.360, p.512-518, 2003).

A composição da microbiota de um indivíduo pode flutuar sob algumas circunstâncias, como, por exemplo, em diarreias agudas, antibioticoterapia ou, em menor grau, induzidas pelas intervenções alimentares. Contudo, a composição do perfil da microbiota

normalmente permanece constante (GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. *Lancet*, v.360, p.512-518, 2003).

A microbiota humana tem um papel importante na nutrição e saúde humanas, ao promover suprimentos de nutrientes, prevenindo a colonização de patógenos e modulando e fazendo a manutenção da nossa imunidade normal de mucosa (KELLY, D.; CONWAY, S.; AMINOV, R. Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation. *Trends in Immunology*, v.26, n.6, p.326-333, 2005). A microbiota desempenha um papel chave no sistema imunológico humano. Ela atua induzindo tolerância aos epítomos microbianos e, conseqüentemente, reduzindo as respostas produzidas por alimentos e outros antígenos do ambiente. Dessa maneira, há uma manipulação da expressão de genes do hospedeiro, de forma a estabilizar e manter a vantagem da parceria.

Estudos com ratos gnotobióticos colonizados por componentes da microbiota intestinal humana revelaram outras funções das bactérias autóctones, incluindo fortificação da barreira da mucosa e angiogênese. Esta pode ser responsável por aumentar a capacidade do hospedeiro em absorver nutrientes. Adicionalmente, o gênero *Bacteroides* é conhecido por lisar polissacarídeos alimentares provenientes de plantas que de outra forma não seriam aproveitados por nosso organismo, contribuindo para nossa ingestão calórica diária. Contudo, o *Bacteroides thetaiotaomicron* (microrganismo mais abundante do intestino delgado distal) possui um proteoma dedicado a capturar polissacarídeos alimentares e metabolizar seus açúcares liberados, consistindo, dessa forma, em uma característica que confere vantagem frente a outros membros da microbiota menos dotados, reduzindo, assim, a probabilidade destes fermentarem tais açúcares (XU, J.; BJURSELL, M. K.; HIMROD, J.; DENG, S.; CARMICHAEL, L. K.; CHIANG, H.C.; HOOPER, L.V.; GORDON, J.I. A genomic view of the

human - *Bacterioides thetaiotaomicron* symbiosis. *Science*, v.299, n.5615, p.2074-2076, 2003).

A definição de probióticos tem evoluído com o passar dos anos (SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. *Nutrition Reviews*, v.61, n.3, p.91-99, 2003). Atualmente, é aceito que probióticos são microorganismos vivos que, ao serem ingeridos em quantidade suficiente, trazem benefícios à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*, 2001. p.34. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/y6398e.pdf> . Acesso em: 01 jun. 2009. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation of a Joint FAO/WHO Expert Consultation]). Segundo a ANVISA (Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002), a quantidade mínima viável para probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC por porção diária do produto pronto para o consumo.

Segundo Saarela e seus colaboradores (SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, n.84, p.197-215, 2000), para que um probiótico seja utilizado, deve possuir algumas características, incluindo segurança, além de aspectos funcionais e tecnológicos. Entre as especificações de segurança, estão incluídos os seguintes critérios: cepas para uso em humanos devem ser preferencialmente de origem humana, sendo isoladas de tratos gastrintestinais (TGI) de humanos saudáveis; devem possuir um histórico de não-patogenicidade, incluindo histórico de associação à endocardite bacteriana ou distúrbios do TGI; não desconjugar sais biliares (a desconjugação ou desidrogenação de

sais biliares pode ter consequências deletérias no intestino delgado); e não portar genes transmissíveis de resistência a antibióticos.

De modo a se selecionar uma melhor cepa probiótica, alguns aspectos funcionais se destacam: resistir a baixos valores de pH e resistir ao suco gástrico; possuir resistência a bile (propriedade importante para a sobrevivência no intestino delgado); apresentar aderência à superfície epitelial e persistência no TGI humano; ser imunoestimulante, mas não possuir efeito proinflamatório; possuir atividade antagonica contra patógenos, como *Helicobacter pylori*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e *Clostridium difficile*; e propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas. Mesmo possuindo histórico de segurança e funcionalidade, alguns aspectos são de extrema importância para sua produção e processamento. São características tecnológicas desejadas: apresentar boas propriedades sensoriais; possuir resistência a bacteriófagos (conhecidos também como fagos); viabilidade durante o processamento; e estabilidade no produto e durante o seu armazenamento (SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, n.84, p.197-215, 2000).

Complementarmente às características de segurança, deseja-se que as culturas probióticas, os ingredientes prebióticos e produtos que os contenham sejam reconhecidos como GRAS (*Generally Recognized As Safe* - reconhecido como seguro de forma geral). Para serem aprovados como tal, deve haver um reconhecimento de sua segurança geral, através da experiência baseada no uso comum em alimentos. Seu reconhecimento é proveniente do histórico considerável de consumo para o uso alimentar por um número significativo de consumidores. Caso não haja um consumo anterior o reconhecimento

de sua segurança geral pode ser decorrente de estudos científicos, os quais requerem quantidade e qualidade de evidência científica. Esse rigor é equivalente àquele para obtenção da aprovação de uma substância como um aditivo alimentar e comumente é baseado em estudos publicados, os quais devem ser comprovados por estudos ainda não publicados e outros dados e informações (FDA. U.S. Food and Drug Administration. *Guidance for Industry. Frequently Asked Questions About GRAS*, 2004. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/grasguid.html>. Acesso em: 01 jun. 2009).

Existem três mecanismos, que possivelmente, representam o mecanismo de atuação de uma cultura probiótica, a saber: efeitos bioquímicos, competição (nutrientes e sítios de adesão) e efeitos relacionados à imunidade do hospedeiro. Como exemplos de efeitos bioquímicos, são citados a produção de bacteriocinas e o efeito destrutivo de produtos do metabolismo dos probióticos sobre as bactérias patogênicas e a redução do pH intestinal. Esses mecanismos dificultam a multiplicação de microrganismos patogênicos. Na competição por nutrientes, há uma disputa entre os microrganismos probióticos e os patogênicos por nutrientes. Já a colonização está relacionada à ocupação de locais onde patógenos poderiam se alojar. Também, são exemplos de efeitos relacionados à imunidade do hospedeiro: o aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade de macrófagos (FOOKS, L. J.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal*, v.9, p.53-61, 1999; SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.42, n.1, p.1-16, 2006).

Diversos benefícios têm sido atribuídos aos probióticos, entre eles: controle da microbiota intestinal; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antimicrobianos; promoção da resistência gastrintestinal à colonização por patógenos; diminuição da população de patógenos, consequente à produção de ácidos acético e lático, de bacteriocinas e outros compostos antimicrobianos; digestão da lactose em indivíduos com deficiência da produção de lactase; estimulação do sistema imune; alívio da constipação; aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas (FULLER, R. Probiotics in man and animals. *The Journal of Applied Bacteriology*, v.66, p.365-378, 1989; LEVRI, K. M.; KETVERTIS, K.; DERAMO, M.; MERESTEIN, J. H.; D'AMICO, F. Do probiotics reduce adult lactose intolerance? A systematic review. *The Journal of Family Practice*, v.54, n.7, p.613-620, 2005; SULLIVAN, Å.; NORD, C. E. Probiotics and gastrointestinal diseases. *Journal of Internal Medicine*, v.257, p.78-92, 2005).

Há estudos que atribuem outros efeitos aos probióticos, ainda que não comprovadas, como: diminuição do risco de doenças cardiovasculares e câncer de cólon, diminuição da concentração plasmática de colesterol, atividade anti-hipertensiva, redução da atividade ulcerativa do *Helicobacter pylori*, controle da colite induzida por rotavírus e *Clostridium difficile*, prevenção de infecções urogenitais e, ainda, efeitos inibitórios sobre a mutagenicidade (CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *International Journal of Dairy Technology*, v.51, n.4, p.123-136, 1998; KLAENHAMMER, T. R. Probiotics and prebiotics. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. 2.ed. Washington: ASM, 2001. p.797-811; KAUR, N.; GUPTA, A. K. Applications of inulin and oligofructose in health and

nutrition. *Journal of Biosciences*, v.27, p.703-714, 2002; KAUR, I. P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Science*, v.15, p.1-9, 2002; TUOHY, K. M.; PROBERT, H. M.; SMEJKAL, C. W.; GIBSON, G.

5 R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today*, Haywards Heath, v.8, n.15, p.692-700, 2003; GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. *Lancet*, v.360, p.512-518, 2003; SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.42, n.1, p.1-16,

10 2006).

A viabilidade dos probióticos na matriz alimentícia é dependente de fatores, como pH, temperatura de armazenamento, presença de microrganismos competidores e inibidores (SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM.

15 Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, n.84, p.197-215, 2000). A presença de oxigênio também é um fator deletério às células: de forma direta, como toxicidade; e de forma indireta, onde certas culturas, particularmente *Lb. delbrueckii*, na presença de oxigênio excretam peróxido de

20 hidrogênio no meio (CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.45, p.61-84, 2005). Alimentos lácteos, como, por exemplo, queijos e, principalmente, leites fermentados, podem apresentar decréscimo na viabilidade das culturas

25 adicionadas. Contudo, estudos indicam que há queijos onde houve aumento na viabilidade dos probióticos (CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.45, p.61-84, 2005; KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I.

Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. Revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.44, n.3, p.329-347, 2008), como, por exemplo, queijo minas frescal, durante a sua vida de prateleira (SOUZA, C. H. B.; BURITI, F. C. A.; BEHRENS, J. H.; SAAD, S. M. I. Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in co-culture with a thermophilic starter culture. *International Journal of Food Science and Technology*, v.43, p.871-877, 2008). Como exemplo, o queijo probiótico (com *Lactobacillus acidophilus*) sem a cultura iniciadora termofílica, apresentou 6,22 e 7,04 log UFC/g, respectivamente, após 7 e 14 dias de armazenamento. Adicionalmente, o conteúdo de gordura do leite oferece proteção durante a digestão do alimento (STANTON, C., GARDINER, G., LYNCH, P. B., COLLINS, J. K., FITZGERALD, G., ROSS, R. P. Probiotic cheese. *International Dairy Journal*, v.8, p.491-496, 1998).

Alimentos do tipo gelados comestíveis apresentam a vantagem frente a outros, por permanecerem a baixas temperaturas durante o armazenamento. Desta forma, é verificada pouca ou nenhuma mobilidade dos diversos componentes presentes no alimento, reduzindo-se, dessa forma, a sua interação, resultando em um fator de proteção dos probióticos empregados.

Paralelamente, segundo Alamprese e seus colaboradores (ALAMPRESE C.; FOSCHINO R.; ROSSI M.; POMPEI C.; CORTI S. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG addition in ice cream. *International Journal of Dairy Technology*, v.58, n.4, p.200-206, 2005), diversos estudos mostram que temperaturas mais baixas podem assegurar uma maior taxa de sobrevivência e que a mortalidade aumenta com o tempo de armazenamento do produto.

A primeira fórmula desenvolvida para administrar deliberadamente bactérias ácido lácticas foi um iogurte fermentado a partir de uma cultura chamada *la Lactobacilline*, isolada por Ilja (ou Eli, em francês) Metjnikov. O produto foi lançado em Paris, no início do século 20. Tal cultura consistia da associação de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (MOLIN, G. Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v. *The American Journal Of Clinical Nutrition*, v.73, suppl.2, 380S–385S, 2001). Desde então, tem sido extensamente estudado o uso de probióticos em alimentos, como leites fermentados e iogurtes, sendo estes os principais produtos comercializados no mundo, contendo culturas probióticas.

A suplementação de outros produtos lácteos com probióticos é freqüente, destacando-se os iogurtes congelados, sorvetes e algumas variedades de queijo, a saber: queijo fresco tipo Minas (BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; ASSIS, E. G.; SAAD, S. M. I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. *LWT – Food Science and Technology*, v.38, n.2, p.173-180, 2005a; BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; SAAD, S. M. I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *International Dairy Journal*, v.15, n.12, p.1279-1288, 2005b; BURITI, F. C. A.; OKAZAKI, T. Y; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh cheese in comparison with the traditional products. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v.57, n.2, p.179-185, 2007d; SOUZA, C. H. B.; BURITI, F. C. A.; BEHRENS, J. H.; SAAD, S. M. I. Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in co-culture with a thermophilic starter

culture. *International Journal of Food Science and Technology*, v.43, p.871-877, 2008; SOUZA, C. H. B.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-chemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. *LWT - Food Science and Technology*, v.42, n.2, p.633-640, 2009), *petit-suisse* (MARUYAMA, L. Y.; CARDARELLI, H. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Textura instrumental de queijo *petit-suisse* potencialmente probiótico: influência de diferentes combinações de gomas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.2, p.386-393, 2006; CARDARELLI, H. R.; BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic *petit-suisse* cheese. *LWT – Food Science and Technology*, v.41, n.6, p.1037-1046, 2008b) e queijo fresco cremoso (BURITI, F. C. A.; CARDARELLI, H. R.; FILISETTI, T. M. C. C.; SAAD, S. M. I. Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. *Food Chemistry*, v.104, p.1605-1610, 2007a; BURITI, F. C. A.; CARDARELLI, H. R.; SAAD, S. M. I. Biopreservation by *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus* in potentially probiotic and synbiotic fresh cream-cheeses. *Journal of Food Protection*, v.70, n.1, p.228-235, 2007b), entre outros. Adicionalmente, a viabilidade desses microrganismos em alimentos como: doces (“confectionary”) (MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, v.12, p.173-182, 2002), manjar branco (CORRÊA, S. B. M.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Probiotic potential and sensory properties of coconut flan supplemented with *Lactobacillus paracasei* and

Bifidobacterium lactis, during shelf life of the product. *International Journal of Food Science and Technology*, v.43, n.9, p.1560-1568, 2008),
 musse de chocolate (ARAGON-ALEGRO, L.C.; ALEGRO, J. H. A.;
 CARDARELLI, H. R.; CHIU, M. C.; SAAD, S. M. I. Potentially probiotic
 5 and synbiotic chocolate mousse. *LWT- Food Science and Technology*,
 v.40, n.4, p.669-75, 2007; CARDARELLI, H. R.; ARAGON-ALEGRO, L.
 C.; ALEGRO, J. H. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Effect of inulin and
Lactobacillus paracasei on sensory and instrumental texture properties
 of functional chocolate mousse. *Journal of the Science of Food and*
 10 *Agriculture*, v.88, n.8, p.1318-1324, 2008a) e musse de maracujá
 (BURITI, F. C. A.; KOMATSU, T. R.; SAAD, S. M. I. Activity of passion
 fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*) pulps on
Lactobacillus acidophilus in refrigerated mousses. "Short
 Communication". *Brazilian Journal of Microbiology*, v.38, n.2, p.315-
 15 317, 2007c) tem sido pesquisadas.

O uso de probióticos em produtos alimentícios não lácteos é
 um desafio (MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLÄRINEN, P.; CRITTENDEN,
 R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological
 challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, v.12,
 20 p.173-182, 2002). A pesquisa no campo dos probióticos até o presente
 momento tem focado em produtos lácteos. Entretanto, diversas outras
 culturas presentes em alimentos e bebidas não lácteos que possuem
 microrganismos podem, em alguns casos, serem considerados
 probióticos (BROWN, A. C.; SHOVIC, A.; IBRAHIM, S.; HOLCK, P.;
 25 HUANG, A. A non-dairy probiotic's (poi) influence on changing the
 gastrointestinal tract's microflora environment. *Alternative Therapies In*
Health And Medicine, v.11, n.1, p.58-64, 2005). Sua maioria está
 concentrada nos continentes africano e asiático, tendo como base
 cereais e legumes, de forma a complementar a qualidade protéica do

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

Outros exemplos de alimentos tradicionais não-lácteos que
 5 contém elevada concentração de lactobacilos são azeitonas em
 salmoura (*brined olives*), pepinos salgados e chucrute. Entretanto, há
 alimentos de origem vegetal nos quais não são encontrados
 microrganismos vivos no momento do consumo, uma vez que não
 resistem a alguma etapa de produção como, por exemplo, massas-
 10 azedas (*sourdough*). Tais produtos são fermentados, entre outros, por
 bactérias ácido-láticas (BAL), as quais são mortas durante a etapa de
 assamento do produto, não sendo, dessa forma, considerados como
 probióticos (MOLIN, G. Probiotics in foods not containing milk or milk
 constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v.
 15 *The American Journal Of Clinical Nutrition*, v.73, suppl.2, 380S–385S,
 2001). Somente em 1994, foi produzido industrialmente, na Suécia, o
 primeiro produto probiótico isento de leite ou seus derivados,
 denominado Proviva®. Foi utilizada uma cepa de *Lb. plantarum* para
 fermentar o mingau de farinha de aveia adicionado de bebida à base de
 20 fruta (PRADO, F. C.; PARADA, J. L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.
 Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*,
 v.41, p.111-123, 2008).

Segundo Gomes e Malcata (GOMES, A. M. P.; MALCATA, F.
 X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological,
 25 biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use
 as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, v.10, p.139-157,
 1999), Moro foi o primeiro pesquisador a isolar bastonetes anaeróbios
 estritos de fezes de lactentes alimentados com leite humano, nomeando-
 os de *Bacillus acidophilus*, um nome genérico para lactobacilos

intestinais. Os lactobacilos são caracterizados como sendo bastonetes Gram-positivos, não esporulados e sem flagelos. São tanto aerotolerantes quanto anaeróbios e fermentadores estritos. Lactobacilos podem fermentar a glicose, produzindo, o ácido láctico, no caso de cepas

5 homofermentativas, ou quantidades equimolares de ácido láctico, gás carbônico e etanol (e/ou ácido acético), no caso daquelas heterofermentativas. A maioria das cepas de *L. acidophilus* fermentam também: amigdalina, celobiose, esculina, frutose, galactose, lactose, maltose, manose, sacarose, salicilina e trealose. Seu pH e temperatura

10 ótimos para multiplicação encontram-se nas faixas de 5,5-6,0 e de 35-40°C, respectivamente.

As bifidobactérias foram inicialmente isoladas e descritas por Tissier, por volta de 1900, a partir de fezes de lactentes alimentados com leite humano. Tais microrganismos são caracterizados como sendo

15 Gram-positivos, catalase negativos, anaeróbios, não sendo esporulados e não possuindo mobilidade. Podem apresentar-se na forma de bastonetes pequenos e curvos, claviformes ou em forma de “Y”. Além disso, as bifidobactérias fermentam açúcares e produzem ácido acético e láctico, não produzindo CO₂, exceto na degradação do gluconato. Todas

20 as bifidobactérias de origem humana fermentam, além da glicose, a galactose, lactose e, frequentemente, a frutose, também sendo capazes de usar carboidratos complexos como fonte de carbono. Seu pH e temperatura ótimos para multiplicação estão nas faixas de 6-7 e de 37-41°C, respectivamente (GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X.

25 *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, v.10, p.139-157, 1999).

Prebióticos são ingredientes fermentados seletivamente que permitem mudanças específicas, na composição e/ou na atividade da microbiota gastrointestinal. Eles conferem, dessa forma, benefícios ao hospedeiro, como bem-estar e saúde (ROBERFROID, M. B. Prebiotics: the concept revisited. *Journal of Nutrition*, v.137, p-830S-837S, 2007). Em outras palavras, são três as suas características fundamentais: não serem digeríveis, serem fermentados e serem seletivos.

Segundo Antunes (ANTUNES, A. E. C. Bebidas lácteas probióticas: benefícios à saúde. In: Seminário de Produtos Lácteos Funcionais. Campinas: ITAL, 2007. CD-ROM), os prebióticos empregados atualmente são: inulina, lactulose, lactiol, rafinose, fruto-oligosacarídeos, galacto-oligosacarídeos e amido resistente, sendo os principais utilizados a inulina e a oligofrutose. A publicação de Roberfroid (ROBERFROID, M. B. Prebiotics: the concept revisited. *Journal of Nutrition*, v.137, p-830S-837S, 2007) defende que estes ingredientes (além dos trans-galactoolisacarídeos) são os únicos que atualmente preenchem os critérios de classificação para prebióticos. Tais compostos são denominados frutanos, termo genérico utilizado para descrever oligo ou polissacarídeos de origem vegetal e refere-se a qualquer carboidrato que contenha uma ou mais ligações frutossil-frutose predominando entre as ligações glicosídicas. Os frutanos são encontrados amplamente no reino vegetal, constituindo-se no segundo polissacarídeo não-estrutural mais abundante, sendo o amido o mais encontrado (SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.42, n.1, p.1-16, 2006).

Aos prebióticos são atribuídos os efeitos de modulação da composição da microbiota intestinal em suas diversas porções (ROBERFROID, M. B. Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease*, v.34, suppl.2, p.S105-S110,

2002). Há estudos *in vitro* e *in vivo* que comprovam existir relação entre a ingestão de inulina e oligofrutose e o aumento de bactérias bifidogênicas, dessa forma sendo denominados como compostos bifidogênicos, uma vez que estimulam a multiplicação de tais bactérias (KAUR, N.; GUPTA, A. K. Applications of inulin and oligofrutose in health and nutrition. *Journal of Biosciences*, v.27, p.703-714, 2002).

Estudos *in vivo* realizados em animais mostraram que o consumo de inulina está relacionado à redução do pH do ceco e o aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta, predominando o acetato, seguido do butirato e propionato. A redução do pH está associada ao estímulo da produção de células do cólon (CARABIN, I. G.; FLAMM, W. G. Evaluation of safety of inulin and oligofrutose as dietary fiber. *Regulatory toxicology and pharmacology*, v.30, p.268-282, 1999). Outros estudos relacionam os oligossacarídeos não digeríveis em geral com: o alívio da constipação, consequente ao aumento da motilidade intestinal e do aumento do bolo fecal; aumento da absorção de minerais, como cálcio, o ferro e o magnésio; efeitos hipocolesterolêmico e hipotrigliceridêmico; tratamento de encefalopatia hepática (redução da produção de amônia e outras neurotoxinas ou de bactérias produtoras quando há excessivo consumo de proteínas); e influência na glicemia e insulinemia via retardo do esvaziamento gástrico e/ou diminuição do transito intestinal no intestino grosso (SWENNEN, K.; COURTIN, C. M.; DELCOUR, J. A. Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.46, p.459-471, 2006).

Inulina é um termo genérico que compreende todos os frutanos lineares com ligações glicosídicas frutossil-frutose β (2-1). Caso haja necessidade de identificar os oligômeros *versus* os polímeros, os termos oligofrutose ou inulina podem ser usados, respectivamente

(ROBERFROID, M. B. Prebiotics: the concept revisited. *Journal of Nutrition*, v.137, p-830S-837S, 2007). Devido à configuração β das ligações entre os monômeros de frutose, os frutanos do tipo inulina não são hidrolisados enzimaticamente por enzimas humanas salivares ou

5 intestinais – específicas para ligações α -glicosídicas. Como resultado, os frutanos do tipo inulina não são digeríveis e são fermentados no cólon (KELLY, G. Inulin-type prebiotics--a review: part I. *Alternative Medicine Review*, v.13, n.4, p.315-330, 2008), assim como ocorre no caso de outras fibras na dieta. Eles exercem um efeito de aumento de volume,

10 como consequência do aumento da biomassa microbiana que resulta de sua fermentação, bem como promovem um aumento na frequência de evacuações, efeitos estes que confirmam a sua classificação no conceito atual de fibras da dieta. Quando adicionados como ingredientes funcionais a produtos alimentícios normais, prebióticos típicos, como a

15 inulina e a oligofrutose, modulam a composição da microbiota intestinal, a qual exerce um papel primordial na fisiologia gastrintestinal (SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.42, n.1, p.1-16, 2006).

20 A inulina utilizada na indústria de alimentos é extraída principalmente de chicória (*Chicorium intybus*) e da alcachofra de Jerusalém (*Heliantus tuberosis*) (CARABIN, I. G.; FLAMM, W. G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. *Regulatory toxicology and pharmacology*, v.30, p.268-282, 1999; KAUR,

25 N.; GUPTA, A. K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences*, v.27, p.703-714, 2002). Contudo, também é encontrada em cebolas (*Allium cepa* Lineu), aspargos (*Asparagus officinallis*), trigo (*Triticum spp.*), banana (*Musa paradisiaca* Lineu), bardana (*Arctium lappa*), alho (*Allium sativum*), mel, aveia (*Avena*

sativa) e centeio (*Secale cereale*) (BERGMARK, S.; LORENZO, A.G.; CULEBRAS, J. M. Use of pro-, pre and synbiotics in the ICU: Future options. *Nutrición Hospitalaria*, v.16, n.6, p.239-256, 2001).

5 Ao associarmos probióticos e prebióticos em um mesmo alimento, este é denominado como simbiótico. Dessa forma, o probiótico ingerido tem maior probabilidade de se fixar e multiplicar no intestino, por conta da prévia adaptação do probiótico ao substrato (SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.42, n.1, p.1-16, 2006). Sabe-se que eles
10 comprovadamente trazem benefícios à saúde.

O açaizeiro, uma palmácea (*Euterpe oleracea* Mart.), é nativo da Amazônia brasileira, sendo o estado do Pará o seu centro de dispersão natural. Populações espontâneas também são encontradas nos estados do Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Tocantins e em países
15 da América do Sul (Colômbia, Equador, Guiana, Suriname e Venezuela) e na América Central (Panamá). No entanto, é na região do estuário do Rio Amazonas que se encontram as maiores e mais densas populações naturais dessa palmeira, adaptada às condições elevadas de temperatura, precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar. Tais
20 concentrações ocorrem em solos de várzeas e igapós, compondo ecossistemas de floresta natural ou em forma de maciços conhecidos como açaizais, mas também podem ser encontradas em terra firme, próximo às várzeas e iguapós (NOGUEIRA, O. L. Sistema de produção do açaí. Embrapa Amazônia Oriental. Sistemas de Produção, v.4, 2006.
25 Disponível em:
http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed/paginas/intro.htm. Acesso: em 01 jun. 2009).

Seu fruto, o açaí, se assemelha a um coco, porém é pequeno, possui de 1,0 a 1,5 cm de diâmetro e tem peso médio de 0,5 a

1,0 g. Segundo Tinoco (TINOCO, A. C. Açaí amazônico: novas perspectivas de negócio. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2005.

1 CD-ROM. Trabalho apresentado no Workshop Regional do Açaizeiro: pesquisa, produção e comercialização, Belém, PA, 2005), o açaí é
5 basicamente composto de polpa (15%) e caroço (85%). Sua coloração roxo-escura é devida à alta concentração de antocianinas (flavonóides) (PEREIRA, H. A.; MONTEIRO, P. L.; LEMOS, J. L. S. Produção de vinho de açaí. *Monografia de conclusão de curso de graduação em Engenharia de Alimentos*. Universidade Estácio de Sá. p.67. 2003).

10 A população de origem ribeirinha consome o açaí com farinha de mandioca, podendo também ter peixe, camarão ou carne associado a esse consumo, sendo o açaí um de seus alimentos básicos. Também é muito conhecida na região sua polpa ou o vinho de açaí, sendo este obtido da adição de água à polpa. Adicionalmente, são feitos
15 doces, geléias, licores, néctares e sorvetes a partir da fruta. Contudo, a forma na qual ele é mais conhecido fora de sua região de origem, é o *mix* de açaí. Este é um gelado comestível, constituído essencialmente de polpa de açaí e xarope de guaraná, podendo ser adicionado de outros ingredientes, como frutas, picadas ou batidas junto ao *mix*; e granola,
20 entre outros. Nesta forma, o *mix* por ser consumido com o auxílio de colher. Caso seja desejada uma consistência mais fluida, adiciona-se água e bate-se em liquidificador antes de ser servido. Assim, ele pode ser consumido em copos, sendo chamado popularmente como “suco de açaí”.

25 O consumo de açaí também apresenta crescimento expressivo nos últimos anos. O produto tem, também, boa receptividade entre esportistas e o público em geral, principalmente entre jovens e adultos jovens, em virtude do apelo energético e alto teor de anti-

oxidantes presentes no fruto, sendo, desta forma, considerado um alimento com grande potencial funcional.

Algumas citações avaliam os potenciais efeitos benéficos à saúde do açaí. Entretanto, esses benefícios foram testados somente *in vitro*, sendo que a comprovação *in vivo* com estudos controlados ainda seria necessária.

Entre os fitoquímicos encontrados no açaí, destacam-se as antocianinas, as proantocianidinas e outros flavonóides (SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D; KABABICK, J. P. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Açaí). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.54, p.8598-8603, 2006). Em frutos manualmente descascados foram encontradas 50 mg/100 g de antocianinas, sendo que na casca foi revelada uma quantidade superior, cerca de cinco vezes (263 mg/100 g de casca), comparado ao encontrado no fruto descascado (BOBBIO, F. O. DRUZIAN, J. I.; ABRÃO, P. A.; BOBBIO, P. A.; FADELLI, S. I. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaizeiro (*Euterpe oleracea*) Mart. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.20, n.3, p.388-390, 2000).

Segundo a publicação de Mojzisoová e Kuchta (MOJZISOVÁ, G.; KUCHTA, M. Dietary flavonoids and risk of coronary heart disease. *Physiological Research*, v.50, n.6, p529-35, 2001), os flavonóides apresentam uma vasta gama de atividades benéficas, tais como: anti-agregante plaquetário, anti-alérgico, anti-inflamatório, antilipoperoxidante, antineoplásico ou protetor gástrico.

Demonstrou-se que o açaí inibe a produção de óxido nítrico (NO), através de mecanismo de inibição da atividade da óxido nítrico sintetase induzível. O NO tem efeitos benéficos como agente essencial na homeostase vascular, sendo o principal mediador citotóxico (destrói

patógenos e células tumorais, entre outros mecanismos). Contudo, ele tem potencial tóxico. Essa toxicidade se faz presente, particularmente, em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante (DUSSE, L. M. S.;
5 VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.39, n.4, p.343-350, 2003).

À medida que os consumidores percebem na alimentação uma alternativa para uma melhor qualidade de vida, estudos são
10 dirigidos com a finalidade de buscar alternativas à demanda de alimentos mais saudáveis. Paralelamente, o reconhecimento do papel dos pro- e prebióticos como agentes benéficos por parte da população, intensifica a pesquisa e, assim, o interesse na indústria alimentícia em trazer produtos que satisfaçam as necessidades dos consumidores.

15 Alimentos funcionais são encontrados em diversas categorias de alimentos. Contudo, produtos não são homogeneamente dispersos sobre tais segmentos deste mercado em expansão. O desenvolvimento e comércio de tais produtos são de alta complexidade, caros e arriscados, à medida que requisitos especiais devem ser
20 respondidos.

Além dos obstáculos tecnológicos em potencial, aspectos legislativos, assim como as demandas dos consumidores, devem ser levados em consideração ao se desenvolver novos alimentos funcionais.

É estimado que, em 2005, tenham sido lançados 379
25 produtos ao redor do mundo destinados à saúde intestinal, em particular os probióticos, desempenhando estes um papel importante dentre os alimentos funcionais.

A publicação internacional WO 2007/095425 refere-se a composições para melhorar os sintomas associados com a deficiência de

lactose, onde a composição inclui um produto lácteo redutor de lactose (fluido de leite, smoothie, sorvetes, yogurt e bebidas) uma quantidade eficaz de um probiótico, um prebiótico, ou uma mistura destes. A invenção também trata de métodos para tratar a intolerância à lactose em um paciente.

O pedido de patente americano US 2006141097 destina-se a bebidas lácteas ou à base de soja, produtos alimentares frozen e do tipo yogurts simbióticos. Preferencialmente, a invenção é preparada através da integração de probióticos (culturas microbianas alimentares) e prebiótico (carboidratos não-digeríveis).

O pedido de patente americano US 2003147857 revela uma composição simbiótica compreendendo uma composição contendo um probiótico e prebiótico e um método de liberação diretamente para o trato intestinal de um mamífero (tudo de alimentação enteral).

A patente brasileira PI 9711705 provê a utilização de bactérias lácticas na preparação de um creme destinado a cobrir na totalidade ou parte de um sorvete, sendo esta cobertura probiótica não-aerada.

A patente européia EP 994.656 apresenta uma sobremesa congelada compreendendo uma parte de sorvete (probiótica) e uma base comestível de fibras comestíveis (não probiótica).

Embora ainda pouco explorado, há um crescente mercado para probióticos não-lácteos. Sucos de frutas também têm sido sugeridos como meios apropriados para a adição de culturas, por já serem posicionados como produtos saudáveis e serem consumidos frequentemente e lealmente por grande percentagem de consumidores (SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite*, v.51, n.3, p.456-467, 2008). Adicionalmente, microrganismos

probióticos como *Lactobacillus* GG (LUCKOW e DELAHUNTY, 2004b) e *Lactobacillus plantarum* (LUCKOW e DELAHUNTY, 2004a) possuem viabilidade durante o processamento em determinados alimentos à base de frutas e são estáveis durante o seu armazenamento. Essas características tecnológicas são de extrema importância, uma vez que não há proteção conferida pelo leite ou seus constituintes nessa classe de alimentos probióticos.

Dados globais, ou mesmo locais, contendo informações a respeito do mercado de probióticos não-lácteos são escassos, mas acredita-se que este esteja em plena expansão.

Assim, o desenvolvimento de um produto que aliasse os benefícios atribuídos ao açaí àqueles, os atribuídos aos ingredientes probióticos e prebióticos seria de grande importância, para atender as demandas do mercado consumidor com relação à disponibilidade de alimentos mais saudáveis e funcionais, além de impulsionar a pesquisa brasileira no campo dos alimentos probióticos e prebióticos não-lácteos.

Assim, de forma inesperada, a Depositante desenvolveu um produto gelado comestível contendo culturas probióticas e ingredientes prebióticos (simbiótico), à base de frutas, e não-lácteo.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1 apresenta o fluxograma geral do processo de fabricação do produto gelado comestível simbiótico, à base de frutas e não-lácteo.

A figura 2 ilustra as etapas particulares de fabricação das formulações (M1-M4) desenvolvidas.

A figura 3 mostra a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* (a) e *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* (b) na formulação de *mix* de açaí (■) ou na formulação de *mix* de açaí suplementada com inulina (□),

onde, os valores são representados em média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). * ($n = 2$).

A figura 4 mostra o efeito significativo ($p = 0,036$) da interação entre os probióticos e a inulina quanto à aceitabilidade média dos produtos.

A figura 5 apresenta o número de características apontadas como mais apreciadas (acima da abscissa) e menos apreciadas (abaixo da abscissa). ■, formulações não suplementadas com inulina; □, formulações suplementadas com inulina.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao processo de fabricação de gelados comestíveis contendo culturas probióticas e ingredientes prebióticos (simbiótico), à base de frutas e não-lácteo e o dito produto gelado comestível. Adicionalmente, o presente pedido de patente destina-se ao uso dos produtos comestíveis como alimento funcional.

Em uma primeira realização o presente pedido de patente trata do processo de fabricação de um gelado comestível através das etapas (a) mistura da matriz à base de frutas, opcionalmente, com adição de água, (b) adição dos ingredientes prebióticos, opcionalmente, inserção de aditivos alimentares, (c) adição de pelo menos uma cultura probiótica e (d) envase e armazenamento.

Em particular, a matriz à base de frutas pode conter pelo menos uma fruta em seu estado *in natura*, polpa, resfriadas, desidratadas, congeladas, naturais, na forma de compota, concentrado, geléia, néctar, purê, suco, em calda, em pasta e/ou em pó. Ainda, as concentrações da matriz de fruta pode ser de cerca de 10 a 90% em peso total da formulação.

Já os ingredientes prebióticos pode apresentar quantidades de 5 a 20% em peso total da formulação.

Os aditivos alimentares que podem ser utilizados na presente invenção podem ser agentes antiespuma (antiespumantes); agentes de volume; antiaglomerantes, antiulectantes; antioxidantes; aromatizantes (flavorizantes); conservantes; corantes; edulcorantes (adoçantes); emulsificantes; estabilizantes, espessantes, gelificantes; fixadores de cor; umidificantes (umectantes); intensificadores de sabor; e/ou reguladores de acidez. Adicionalmente, os aditivos podem se apresentar em quantidades de 0 a 30% em peso total da composição.

As quantidades de culturas probióticas incorporadas no presente processo podem ser de 0,001% a 2% do total da formulação.

A etapa (d) de envase e armazenamento, ainda, pode ocorrer entre as etapas (a) e (b) ou entre as etapas (b) e (c).

Os equipamentos para congelamento utilizados no processo de fabricação, quando necessários, podem variar entre sorveteira; congeladores com ventilação forçada; congeladores de contato ou de placa; e/ou congeladores criogênicos.

Em uma segunda realização, a presente invenção provê o produto gelado comestível contendo culturas probióticas e ingredientes prebióticos (simbiótico), à base de frutas e não-lácteo.

As culturas probióticas que podem ser empregados no gelado comestível, da presente invenção, pertencem ao gênero *Lactobacillus*, mais especificamente *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. reuteri*, *L. brevis*, *L. cellobiosus*, *L. curvatus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. rhamnosus*, *L. helveticus*, *L. sobrius*, *L. sakei*. Também podem ser incluídos cocos Gram-positivos como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*, *S. diacetylactis*, *S.*

intermedius, entre outros. O gênero *Bifidobacterium* poderá ser empregado, preferencialmente, espécies *B. lactis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. angulatum*, *B. thermophilum*, entre outros. Algumas

5 leveduras também são consideradas como potenciais probióticos e podem ser adicionadas, tais como, *Saccharomyces bulgaricus*, *S. boulardii*, *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis* e *Torula*. As combinações desses microrganismos também podem ser utilizadas no produto.

10 As quantidades mínimas dos microrganismos probióticos, a serem empregadas devem ser de 10^6 ufc/g ou ml do produto, considerando um consumo mínimo de 10^8 ufc a 10^9 do microrganismo por dia.

Vários ingredientes prebióticos podem ser utilizados, na

15 presente invenção, como por exemplo, a inulina, os frutooligossacarídeos, a lactulose, a lacto-sacarose, o lactitol, os galactooligossacarídeos, os oligossacarídeos da soja, os isomaltooligossacarídeos, os xilooligossacarídeos, os oligossacarídeos do mel, o gentiooligossacarídeo, entre outros, e/ou suas combinações.

20 Os ingredientes utilizados no presente pedido de patente podem apresentar diferentes graus de polimerização, tais como, de 2 até 60 unidades. As quantidades dos ingredientes prebióticos podem variar de 5% a 20% p/p de produto, considerando um consumo mínimo de 5g e um máximo de 15 a 20g do ingrediente prebiótico por dia.

25 Os produtos gelados comestíveis também podem ser desenvolvidos com a redução total ou parcial do teor de gordura empregando-se diferentes substâncias substitutas e/ou miméticas de gordura. As substâncias miméticas de gordura compreendem substâncias que interagem com a água e promovem alguma

substituição da funcionalidade atribuída à gordura, por exemplo, os carboidratos como maltodextrina, amidos, fibras, inulina, gomas e polidextrose; e as proteínas como as proteínas do ovo, extrato hidrossolúvel de soja e do glúten de trigo. Já as substâncias substitutas de gordura compreendem substâncias que interagem com a água e promovem total substituição da funcionalidade atribuída à gordura, por exemplo, salatrim e olestra.

Ainda, os produtos gelados comestíveis também podem apresentar uma redução no teor calórico (neste caso, advindo principalmente dos açúcares utilizados nas formulações com flavorização doce), com o emprego de edulcorantes não calóricos, naturais ou sintéticos, como por exemplo, os açúcares-álcoois, os hidrolisados hidrogenados de amido, o aspartame, a sacarina, a sucralose, o acessulfame de potássio e os esteviosídeos, entre outros.

Em particular, a presente invenção destina-se a um produto gelado comestível, particularmente, um mix gelado à base de uma matriz de fruta mixada ao xarope de guaraná, não-lácteo contendo culturas probióticas, por exemplo, *L. acidophilus* La-5 combinado com *B. animalis* spp. *lactis* Bb-12 e ingredientes prebiótico, preferencialmente, inulina.

Os produtos gelados comestíveis a que se referem a presente invenção podem ser cassata napolitana, *frozen yogurt*, gelados de frutas ou *sorbets*, *mellorine*, *milk shake*, picolé, produtos especiais gelados, raspadinha, *sherbets*, *smoothie*, sorvetes e sorvete *soft* e preferencialmente, mixes.

Em uma última realização, o presente pedido destina-se ao uso desses produtos gelados comestíveis como alimentos funcionais indicados a melhorar o estado de saúde e bem-estar reduzindo o risco de doença e/ou disfunção. Particularmente, a presente invenção indica-

se à manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal e que exerçam um efeito benéfico sobre a composição e atividade da microbiota intestinal, auxiliando na manutenção de um organismo saudável.

EXEMPLOS

5 Um *mix* de açaí, não-lácteo, com propriedade funcional suplementar, por se tratar de um alimento simbiótico foi desenvolvido.

O delineamento experimental conduzido foi inteiramente aleatorizado, utilizando um planejamento fatorial 2², constituído de 2 fatores (culturas probióticas e ingrediente prebiótico inulina), em 2
10 níveis (presença ou ausência), para o qual foram realizados experimentos para todas as possíveis combinações nos níveis dos fatores (BARROS NETO, B.; SCARMINO, I. S.; BRUNS, R. E. *Planejamento e otimização de experimentos*. Campinas: Editora da UNICAMP, 2007. 480p; LAWLESS, H. T.; HEYMANN, H. *Sensory
15 evaluation of foods: principles and practices*. Gaithersburg: Aspen, 1999. 827p), com 3 ou mais repetições. Assim, foram realizadas 4 combinações em termos de adição ou não de probióticos e/ou de inulina (prebiótico) durante a elaboração dos novos produtos a base de açaí, conforme descrito na tabela 1, onde, (+) refere-se a adição, (-) a
20 não adição, ^a cultura de *Lactobacillus acidophilus* La-5 (Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca); ^b cultura de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Christian Hansen); e ^c Inulina (Beneo HSI™, Orafti, Oreya, Bélgica).

Quatro tratamentos foram produzidos (três vezes cada),
25 todos contendo *mix* de açaí industrializado congelado: M1 (controle), M2 (com *L. acidophilus* La-5 + *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12), M3 (com inulina) e M4 (com *L. acidophilus* La-5 + *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 + inulina). Durante o armazenamento dos produtos a -18 °C por até 3 meses, foram avaliados a sobrevivência dos microrganismos probióticos,

a aceitabilidade sensorial, o pH e a cor dos produtos. O teor de umidade foi determinado após a fabricação dos produtos (dia 0). As demais características físico-químicas (composição centesimal) do produto foram determinadas a partir de amostras liofilizadas dos produtos previamente congelados.

TABELA 1

VARIÁVEIS ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DOS TRATAMENTOS DO MIX DE AÇAÍ

Formulação	<i>L. acidophilus</i> ^a e <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> ^b	Inulina ^c
M1	-	-
M2	+	-
M3	-	+
M4	+	+

Os *mixes* de açaí das diversas formulações (controle, probiótico, prebiótico e simbiótico) foram produzidos conforme fluxograma mostrado na figura 2, respeitando as boas práticas de processamento (*GMP*).

A figura 2 ilustra as etapas gerais de fabricação para as quatro formulações (M1-M4) desenvolvidas como exemplo da presente invenção. Ao final de cada lote produzido, foram obtidos 2,2 kg a 3 kg, em função da formulação e das análises correspondentes. Os novos produtos foram preparados, utilizando-se como matéria-prima polpa de açaí industrializado congelado a -18 °C (Icefruit Maisa, Tatuí, Brasil) e xarope de guaraná (Iú-mirin, Rio de Janeiro, Brasil), de acordo com a tabela 2, sendo, ¹ Polpa de açaí (Icefruit Maisa, Tatuí, Brasil), ² xarope de guaraná (Iú-mirin, Rio de Janeiro, Brasil), ³ açúcar refinado (Nova América S.A., Tarumã, Brasil), ⁴ emulsionantes e espessantes (Sherex® IC9516R, Kerry, Rochester, EUA), ⁵ (Beneo® HSI, Orafiti, Tienen, Bélgica), ⁶ cultura de *Lactobacillus acidophilus* La-5 (Christian Hansen,

Hoersholm, Dinamarca), ⁷ cultura de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Christian Hansen).

A polpa de açaí teve a sua temperatura de congelamento elevada (temperamento), através da sua manutenção em cabine refrigerada a 4 ± 1 °C (Metalfrio, mod. VB43R, São Paulo, Brasil) por cerca de 1 hora. Em seguida, foi adicionado xarope de guaraná, com posterior mistura em triturador industrial (mod. 48, Lucre Ltda, Catanduva, Brasil) por 40 segundos, resultando em um primeiro *mix* de açaí.

TABELA 2

PROPORÇÃO DOS INGREDIENTES UTILIZADOS NO PREPARO DOS *MIXES* DE AÇAÍ

Ingredientes (%)	Tratamentos			
	M1	M2	M3	M4
Polpa de açaí ¹	65,79	65,70	61,94	61,85
Xarope de guaraná ²	16,45	16,42	15,48	15,46
Água	14,04	14,02	13,22	13,20
Açúcar refinado ³	3,19	3,19	3,00	3,00
Emulsionantes e espessantes ⁴	0,53	0,53	0,50	0,50
Inulina ⁵	-	-	5,85	5,85
<i>L. acidophilus</i> ⁶	-	0,07	-	0,07
<i>B. animalis</i> subsp. <i>Lactis</i> ⁷	-	0,07	-	0,07
Total	100,00	100,00	100,00	100,00

Paralelamente, em béquer de vidro, os sólidos foram solubilizados ou suspensos em água aquecida em banho de água (80 °C a 85 °C). Para tal, foi adicionado, ou não, o ingrediente prebiótico (Beneo® HSI, Orafiti, Tienen, Bélgica - M3 e M4) e misturado por 20 segundos, quando o caso. Em seguida, foram adicionados o sistema emulsificante/estabilizante (Sherex® IC9516R, Kerry, Rochester, EUA) e

o açúcar (Nova América S.A., Tarumã, Brasil) ao béquer, sendo, então, misturados vigorosamente por 30 segundos. A mistura de sólidos em água quente foi vertida no liquidificador industrial, contendo o *mix* de açaí inicialmente preparado, sendo, em seguida, misturada por 20 segundos.

As culturas liofilizadas do tipo DVS (*direct vat set* – para a adição direta aos produtos alimentícios, durante a sua elaboração) de *Lactobacillus acidophilus* La-5 e de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca) (M2 e M4) foram adicionadas, ou não, diretamente ao *mix* de açaí, quando misturou-se por 20 segundos. Os produtos foram transferidos para a produtora de sorvetes Skymssen (mod. BSK-16, Metalúrgica Siemens, Brusque, Brasil), para serem congelados rapidamente a -15 °C por 15 minutos, a fim de se evitar a formação de cristais de gelo grandes e incorporar-se grande quantidade de ar, mas não totalmente, para que a sua transferência para a embalagem final fosse facilitada (consistência ainda macia).

Posteriormente, foram acondicionados em embalagens plásticas com capacidade de 50 ml, próprias para alimentos (polipropileno branco), seladas com selo aluminizado (seladora Delgo nº 1968, Cotia, Brasil) e armazenadas em congelador a -18 °C (Metalfrio, mod. VF50R/C, São Paulo, Brasil) por até 3 meses, para simular as condições usuais de comercialização e preparo do produto.

RESULTADOS

Do ponto de vista tecnológico, constatou-se um aprimoramento no processo de fabricação quanto a redução do tempo de mistura em duas etapas: *premix* (mistura entre polpa de açaí e xarope de guaraná), quando ocorreu a redução de 5 minutos para 40 segundos; e na mistura final, anterior ao congelamento rápido em

sorveteira, quando houve redução de 20 minutos para cerca de 20 segundos a 30 segundos. O longo tempo de exposição da mistura acarretava na inviabilidade dos microrganismos probióticos, fazendo com que eles não fossem mais detectados. A redução desse tempo manteve a viabilidade dos probióticos, bem como a homogeneidade no produto.

Já a redução do tempo de mistura do pré-*mix* mostrou ser tão efetiva quanto o tempo inicialmente idealizado (5 minutos), do ponto de vista da homogeneidade da mistura, além da redução de fornecimento de calor à mistura e redução do tempo de exposição ao oxigênio.

Sob o ponto de vista sensorial, verificou-se a necessidade de incorporar à formulação açúcar e mistura de espessantes e estabilizantes, sendo esta mistura também importante do ponto de vista tecnológico.

A adição de açúcar conferiu dulçor satisfatório nas avaliações preliminares. Já a adição da mistura de espessantes e estabilizantes, além de aprimorar a palatabilidade do produto (maciez), resultou na emulsificação das gorduras da polpa, de forma que estas não aderiam às superfícies em contato com o produto, além de reduzir o sabor de gordura nas amostras. Dessa forma, o produto apresentou propriedades sensoriais superiores ao tradicional.

Houve, ainda, outras modificações quanto ao processo de produção. Estas objetivaram uma melhor incorporação dos ingredientes ao produto.

VIABILIDADE DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

A figura 3 mostra a evolução na viabilidade dos probióticos nos *mixes* de açaí M2 e M4 durante o armazenamento dos produtos a -18 °C, pelo período de 84 dias.

Não houve diferença significativa entre os fatores tratamento, tempo e sua interação ($p > 0,05$). Ambos os *mixes* apresentaram populações iniciais superiores a $1,3 \times 10^6$ ufc/g (ou 6,11 log UFC/g) de ambos os microrganismos probióticos.

5 As populações de *L. acidophilus* e *B. animalis* subsp. *lactis* decresceram durante o armazenamento, embora com diferença nunca superior a 0,78 log ufc/g durante o período avaliado. As contagens de *L. acidophilus* no M4 apresentaram a menor variação (0,18 log ufc/g). Mesmo não havendo diferenças significativas entre os fatores
10 tratamento, tempo e sua interação, durante todo o período de armazenamento estudado ($p < 0,05$), foram observadas contagens numericamente superiores no M4 (simbiótico), quando comparado ao M2 (probiótico) nos mesmos dias de armazenamento para o mesmo microrganismo, sendo mais expressiva a diferença entre as populações
15 do *B. animalis* subsp. *lactis*. Essa diferença pode ser decorrente de uma proteção conferida pela inulina na matriz alimentar.

De acordo com a legislação brasileira vigente (ANVISA, 2008), para o alimento ser considerado probiótico, deve apresentar quantidade superior a 10^8 UFC em sua porção diária.

20 No caso específico do *mix* de açaí, a porção diária é de 60 g do produto. Logo, deve haver contagem superior a 6,22 log de ufc/g do produto até o final do período do seu armazenamento.

ENSAIOS

PERÍODOS DE AMOSTRAGEM

25 O teor de umidade foi determinado após a fabricação dos produtos (dia 0). As demais características físico-químicas dos produtos foram determinadas a partir de amostras liofilizadas dos produtos previamente congelados. As análises microbiológicas, determinação da cor e medidas de pH foram realizadas no dia seguinte à sua fabricação e

durante sua vida de prateleira, a saber: semanalmente, durante o primeiro mês e mensalmente, 2 e 3 meses após sua produção, de forma a se obter um efetivo acompanhamento da viabilidade dos probióticos. As análises sensoriais das diversas formulações foram realizadas 7, 42 e 84 dias após a sua produção. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Decorridos os tempos de armazenamento, porções de 25 gramas dos produtos (retiradas em condições de assepsia) foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}), utilizando-se um “Bag Mixer” 400 (Interscience, St. Nom, França). Diluições decimais subsequentes foram preparadas, utilizando o mesmo diluente.

Nas formulações M2 (probiótico) e M4 (simbiótico) foram realizadas as contagens das bactérias probióticas, a fim de estabelecer a sua viabilidade. A contagem de *L. acidophilus* foi realizada, utilizando o ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS) modificado, preparado como meio basal e adicionado de maltose, em substituição à glicose, conforme descrito pela International Dairy Federation (IDF Standard 306, 1995), fundido e resfriado a cerca de 45 °C e a semeadura realizada em profundidade (*pour plate*). Para este fim, alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas de Petri estéreis e adicionadas de ágar. Após homogeneização e endurecimento do ágar, as placas foram incubadas em aerobiose a 37 °C por 48 horas.

A contagem de *Bifidobacterium* spp. foi realizada utilizando também a técnica de semeadura em profundidade de 1mL de cada diluição em ágar MRS (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), adicionado de propionato de sódio (Sigma-Aldrich) (0,3% m/v) e cloreto de lítio (Merck) (0,2% m/v) – ágar MRS-LP, após 72 horas de incubação em anaerobiose

(Sistema de Anaerobiose Anaerogen, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) a 37 °C, conforme descrito por LAPIERRE e seus colaboradores (LAPIERRE, L.; UNDELAND, P.; COX, L. J. Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*, v.75, n.5, p.1192-1196, 1992) e por VINDEROLA e REINHEIMER (VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. *International Dairy Journal*, v.9, n.8, p.497-505, 1999).

ANÁLISE FÍSICA

Foi determinada a cor de amostras de todas as formulações. Com o auxílio de espectrofotômetro Color Quest XE (Hunter Laboratory Associates Inc., Reston, EUA) equipado de lâmpada de D⁶⁵ (padrão de luz solar). As amostras foram acomodadas na cubeta de quartzo, de modo que todo seu conteúdo fosse preenchido. Foram feitas leitura de ambos os lados da cubeta, para determinar os valores de CIE: L* (medição do escuro ao claro, luminosidade), a* (medição do vermelho), b* (medição do amarelo), ΔE* (diferenças totais da coloração), C* (saturação, tonalidade) e h° (coloração); conforme recomendado pela fabricante.

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

A determinação do teor de sólidos totais foi realizada conforme o IAL (2005). Adicionalmente, foram realizadas medidas de pH em medidor de pH Orion Modelo *Three Stars* (Analyser Comércio e Indústria Ltda., São Paulo, Brasil), empregando-se um Eletrodo tipo Penetração modelo 2AO4 GF (Analyser).

ANÁLISE SENSORIAL

Foram realizadas 12 análises sensoriais (quatro formulações em três períodos de armazenamento), tendo participado,

em cada uma, 50 voluntários adultos (provadores), metade destes no período matutino e a outra metade no período vespertino. Provadores de ambos os sexos participaram da avaliação, sendo estes voluntários saudáveis. Todos os provadores aceitaram consumir as amostras previamente às análises, atestando: gostar do produto a ser testado, serem consumidores de *mix* de açaí e não possuírem algum problema de alergia ou intolerância relacionado a algum ingrediente na presente invenção.

A aceitabilidade de todas as formulações foi comparada após 7, 42 e 84 dias de armazenamento, em cabines individuais. Amostras de aproximadamente 20 g foram batidas em liquidificador (Magic Bullet®, modelo MB1001, Homeland Housewares, Los Angeles, EUA) imediatamente antes de seu oferecimento a cada provador. As amostras foram servidas nas próprias embalagens plásticas em que foram previamente armazenadas, com uma colher descartável. Foi empregada uma escala hedônica de 9 pontos, onde “um” representava “desgostei muitíssimo” e “nove” “gostei muitíssimo”, baseado em aparência, textura e sabor (LAWLESS, H. T.; HEYMANN, H. *Sensory evaluation of foods: principles and practices*. Gaithersburg: Aspen, 1999. 827p). Adicionalmente, o atributo mais e menos apreciado foram também questionados.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises microbiológicas e sensoriais, a homogeneidade das variâncias foi conferida pelo teste de Bartlett, com a posterior utilização de ANOVA para medidas repetidas, seguidas pelo teste de Tukey HSD.

EVOLUÇÃO DOS PARÂMETROS DE COLORAÇÃO INSTRUMENTAL

Os parâmetros CIE a^* , b^* , C^* e h° mostram uma leve tendência ao decréscimo ao longo do armazenamento dos produtos

A tabela 3 apresenta a evolução dos parâmetros de coloração das diferentes formulações de *mixes* de açaí analisados durante o armazenamento a -18 °C por até 84 dias, sendo, os valores representados em média $\pm$ desvio padrão (n = 3) e ** (n=2).

Armazenamento		Parâmetros CIE de cor											
(dias)		L*		a*		b*		ΔE^*		C*		h°	
1		17, ±	2,	12, ±	0,	13, ±	2,			18, ±	1,	45, ±	4,
		69	99	97	66	14	17			51	78	03	44
7		15, ±	1,	12, ±	0,	13, ±	1,	3, ±	1,	18, ±	1,	47, ±	1,
		21	99	80	91	95	68	45	49	94	82	32	74
14		15, ±	1,	13, ±	0,	14, ±	1,	3, ±	1,	19, ±	2,	47, ±	2,
		00	45	03	94	35	96	61	53	40	04	56	21
T 21		16, ±	0,	12, ±	0,	12, ±	1,	2, ±	0,	17, ±	1,	46, ±	1,
	1	06	66	21	88	92	72	63	56	78	85	46	71
28		15, ±	1,	12, ±	0,	13, ±	1,	2, ±	0,	18, ±	1,	46, ±	2,
		79	18	36	67	15	76	84	79	06	72	58	39
56**		16, ±	0,	12, ±	0,	12, ±	0,	1, ±	0,	17, ±	0,	46, ±	0,
		22	65	14	41	75	61	94	30	61	70	39	70
84		18, ±	1,	12, ±	0,	11, ±	0,	2, ±	0,	16, ±	0,	43, ±	2,
		32	23	01	93	51	69	46	81	66	76	84	97
T 1		15, ±	0,	13, ±	0,	14, ±	2,	3, ±	1,	19, ±	2,	48, ±	2,
	2	86	93	03	79	86	04	05	57	77	04	54	32
7		16, ±	0,	13, ±	0,	15, ±	2,	3, ±	1,	20, ±	1,	48, ±	2,

	10	91	19	74	17	00	12	46	11	97	78	40
14	16,	0,	12,	0,	14,	2,	3,	1,	19,	2,	48,	2,
	±		±		±		±		±		±	
	26	73	98	81	83	19	00	29	73	16	54	60
21	15,	0,	12,	0,	14,	1,	2,	0,	19,	1,	47,	2,
	±		±		±		±		±		±	
	97	80	91	77	35	75	76	94	31	79	86	06
28	16,	0,	12,	0,	13,	1,	2,	0,	17,	1,	47,	1,
	±		±		±		±		±		±	
	35	79	19	83	21	69	37	86	98	80	14	72
56	19,	1,	12,	0,	12,	0,	1,	1,	17,	0,	45,	2,
	±		±		±		±		±		±	
	04	53	33	37	43	93	99	43	52	50	17	84
84	17,	1,	11,	0,	12,	0,	1,	0,	17,	0,	47,	0,
	±		±		±		±		±		±	
	74	05	57	34	51	56	80	76	04	61	22	73
1	14,	2,	13,	0,	13,	0,	3,	2,	19,	0,	46,	2,
	±		±		±		±		±		±	
	22	64	15	57	74	80	86	30	04	59	23	39
7	15,	1,	12,	1,	13,	3,	4,	1,	18,	3,	46,	3,
	±		±		±		±		±		±	
	08	41	43	45	21	12	13	80	17	25	19	54
14	14,	2,	12,	0,	12,	1,	3,	2,	18,	1,	45,	3,
	±		±		±		±		±		±	
	77	66	84	68	99	99	89	14	29	82	06	23
T	14,	1,	12,	0,	13,	1,	3,	1,	18,	1,	46,	2,
21	±		±		±		±		±		±	
3	86	70	62	74	37	98	69	27	40	94	41	59
28	15,	0,	12,	0,	12,	1,	3,	0,	17,	1,	45,	2,
	±		±		±		±		±		±	
	27	96	28	57	67	53	00	98	66	49	74	15
56	16,	2,	12,	1,	11,	2,	3,	0,	16,	1,	43,	4,
	±		±		±		±		±		±	
	49	17	15	10	59	06	65	93	84	90	38	57
84**	18,	1,	12,	0,	11,	1,	2,	1,	17,	0,	42,	4,
	±		±		±		±		±		±	
	10	40	69	68	71	22	19	09	31	52	62	31
1	14,	0,	13,	0,	15,	2,	4,	1,	20,	2,	48,	2,
	±		±		±		±		±		±	
T	94	88	48	74	34	04	02	33	44	01	49	23
4	14,	1,	13,	1,	15,	2,	4,	2,	21,	2,	48,	2,
7	±		±		±		±		±		±	
—	66	28	76	18	86	64	74	12	02	72	78	65

14	16,06	0,76	12,18	0,60	12,92	1,33	2,29	0,81	17,76	1,37	46,58	1,53
21	15,41	1,73	12,70	0,70	13,45	1,42	2,86	1,57	18,50	1,45	46,53	1,87
28	15,24	1,08	12,51	0,65	13,53	1,30	2,95	0,89	18,43	1,39	47,14	1,34
56	16,32	0,54	11,94	0,59	12,58	1,28	2,27	0,55	17,35	1,33	46,39	1,47
84**	17,71	0,33	12,69	0,88	11,56	0,84	1,92	0,59	17,20	0,28	42,36	3,94

Tais alterações observadas nos parâmetros CIE de cor provavelmente não acarretaram em mudanças expressivas na aceitação dos produtos, por conta da sua pequena magnitude e baixa luminosidade (14,66 a 19,04).

5

EVOLUÇÃO DO pH

No Brasil, é preconizado pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento (1999) que a polpa de fruta de açaí deve apresentar pH mínimo de 4,0 e máximo de 6,2. Sendo a polpa de açaí o principal constituinte dos produtos desenvolvidos, seu pH é fortemente influenciado pela mesma, conforme verificado na Tabela 3. Os outros constituintes implicam fracamente no pH final.

A tabela 4 mostra a evolução do pH das diferentes formulações de *mixes* de açaí estudados durante o armazenamento a - 18 °C por até 84 dias, sendo, os valores representados em média $\pm$ desvio padrão (n = 3) e * (n=2).

TABELA 4

Armazenamento (dias)	pH			
	M1	M2	M3	M4
1	3,97 ± 0,08	3,96 ± 0,08	3,93 ± 0,08	4,09 ± 0,26
7	3,95 ± 0,05	4,02 ± 0,15	3,94 ± 0,10	4,08 ± 0,04
14	3,97 ± 0,07	4,24 ± 0,24	3,96 ± 0,07	3,96 ± 0,10
21	3,97 ± 0,09	4,00 ± 0,07	4,06 ± 0,14	4,04 ± 0,10
28	3,97 ± 0,09	4,01 ± 0,04	3,97 ± 0,14	4,12 ± 0,09
56	4,19* ± 0,34	3,95* ± 0,08	3,97 ± 0,12	4,11 ± 0,15
84	4,09 ± 0,16	4,00 ± 0,04	4,06 ± 0,19	4,13* ± 0,10

Não houve alterações expressivas no pH durante o armazenamento a -18 °C por 84 dias.

TEOR DE SÓLIDOS

Os tratamentos M1 e M2 apresentaram teor de sólidos totais inferior aos tratamentos M3 e M4, conforme ilustrado na tabela 5. Apesar desses possuírem uma quantidade ligeiramente inferior de polpa de açaí e xarope de guaraná (componentes em maior quantidade), a inulina adicionada é responsável pelo maior teor de sólidos totais, uma vez que seu teor de umidade é pequeno.

A tabela 5 demonstra o teor de sólidos das diferentes formulações de *mixes* de açaí analisados.

TABELA 5

	Formulação			
	M1	M2	M3	M4
Teor de sólidos	21,24±0,45	21,22±0,49	26,25±0,60	26,01±0,74

AValiação Sensorial dos Mixes

Primeiramente, foi conferida a homogeneidade das variâncias de todas as formulações e das respostas dos 50 provadores pelo teste Bartlett ($p = 0,424$) e foram comparados com o resíduo

usando MANOVA (análise de variância multivariada). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as respostas dos provadores ($p = 0,126$). Isto significa que as respostas foram consensuais. Em seguida, os resultados observados nos três intervalos de tempo (após 7, 42 e 84 dias) foram submetidos à ANOVA para medidas repetidas. Nesse caso, não foi verificada homogeneidade das variâncias ($p < 0,001$) dos resultados ao 84º dia e, portanto, os resultados da ANOVA foram convertidos em valores transformados ($\cos x$).

O teste de Tukey HSD foi utilizado para identificar diferenças na interação (formulações x tempo). A média dos resultados de cada tratamento foi submetida à ANOVA fatorial (2^2), onde foi analisada a interação entre o fator 1 (presença de cultura probiótica) e o fator 2 (adição do ingrediente prebiótico) na aceitabilidade sensorial dos produtos. Nesse caso, a homogeneidade das variâncias também foi verificada pelo teste de Bartlett ($p = 0,944$) e as diferenças foram identificadas pelo teste de Tukey HSD.

Os resultados de aceitabilidade sensorial dos *mixes* de açaí encontram-se na tabela 6. Valores médios iguais ou superiores a 7 (gostei regularmente) indicam uma aceitação satisfatória para o produto, onde, os valores são em média $\pm$ desvio padrão, ^{a,b} sobrescritas distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes formulações. Não houve diferença significativa ao longo do tempo para cada formulação.

TABELA 6

RESULTADOS DE ACEITABILIDADE SENSORIAL DAS DIFERENTES FORMULAÇÕES

EM TRÊS PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO

	Tratamento			
Armazenamento (dias)	M1	M2	M3	M4
7	7,0 ^{ab} ± 1,4	7,2 ^{ab} ± 1,4	7,6 ^{ab} ± 1,2	7,7 ^a ± 1,5
42	7,2 ^{ab} ± 1,6	7,1 ^{ab} ± 1,2	7,4 ^{ab} ± 1,4	7,4 ^{ab} ± 1,5
84	7,6 ^{ab} ± 1,0	6,8 ^b ± 1,6	7,3 ^{ab} ± 1,1	7,8 ^a ± 0,9

A aceitabilidade dos produtos não diferiu significativamente ao longo do tempo ($p > 0,05$). Diferentemente, foram percebidas 5 diferenças entre as formulações ($p < 0,001$). A maior aceitação foi observada para o M4, aos 7 e 84 dias de armazenamento, e a menor para o M2, aos 84 dias de armazenamento.

Conforme ilustrado na figura 4, o efeito da interação da combinação probióticos e prebiótico na aceitabilidade dos *mixes* de açaí 10 foi significativo ($p < 0,05$). Os resultados das quatro formulações foram confrontados, tendo sido a maior aceitação média o M4 (7,6). Na presente invenção, observou-se que a adição de fibras resultou na diferenciação vantajosa dos produtos analisados. Tais produtos tiveram aceitação superior em sua presença.

15 É provável que a adição de probióticos não resulte em alteração da aceitação por ser a quantidade adicionada de inóculo pequena, quando comparada ao total da formulação e por se tratar de um produto congelado (-18 °C). A atividade metabólica dos probióticos em temperaturas inferiores a zero é muito pequena e certamente não 20 resultaria em produtos de metabolismo em quantidades suficientes para acarretar uma diferença sensorial.

As características sabor e textura foram as que mais influenciaram as avaliações sensoriais (figura 5), totalizando

aproximadamente 85% das respostas referentes aos atributos positivos e atributos negativos. Ressalta-se que, em alguns casos, mais de uma característica foi informada como preferida ou não. Entretanto, somente a primeira característica descrita foi utilizada para uniformizar as respostas, de modo a atingir a proposta inicial de se obter somente uma característica positiva e uma negativa. Adicionalmente, aproximadamente 10% das avaliações sensoriais não reportaram atributo negativo, sendo superior ao número de avaliações sensoriais sem relato de atributo positivo (2%).

No entanto, deve ser ressaltado o fato das características positivas possuírem menos informações quanto ao seu componente responsável pela tomada de decisão, quando comparadas às negativas, tanto para o sabor quanto para a textura. De modo geral, os provadores sentiram-se mais inclinados a fornecer informações de componentes que não foram de seu agrado. A razão entre o número de componentes referenciados e não referenciados para os aspectos positivos das características sabor e textura não foi superior a 0,68. Essa razão não foi inferior a 1,04 para os aspectos negativos, tendo alcançado o valor 9,25 a razão entre os componentes referenciados e não referenciados para os aspectos negativos da característica sabor.

A característica sabor foi apontada com maior frequência como atributo positivo e com menor frequência como atributo negativo nas formulações suplementadas com inulina, quando comparado àqueles sem o ingrediente prebiótico. O componente mais referenciado para a característica sabor foi o dulçor. Nas formulações não suplementadas de inulina, a característica positiva dulçor, referida como dulçor ideal, totalizou 7,84% das avaliações desse grupo, enquanto nas formulações suplementadas com o ingrediente prebiótico esse valor subiu para 13,71%. Da mesma maneira, o componente

negativo mais referenciado foi a falta de dulçor, tendo sido mais expressivo no grupo das formulações não suplementadas com o ingrediente prebiótico, quando comparado àqueles suplementados (38,46% e 32,93%, respectivamente).

- 5 Diferentemente, a característica textura foi apontada, com menor frequência, como atributo positivo e, com maior frequência, como atributo negativo nas formulações adicionadas de inulina, quando comparado às formulações sem o ingrediente prebiótico. Entretanto, nas formulações não adicionadas de inulina houve 32,20% de
- 10 referências positivas relativas aos atributos cremosidade e consistência. Já nas formulações suplementadas com inulina, elas subiram para 35,11% das referências positivas. Tal fato pode ser explicado pela propriedade da inulina de aumentar o volume do alimento, contribuindo para seu corpo e sensação na boca, oferecendo uma
- 15 estrutura mais cremosa.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE GELADOS COMESTÍVEIS CONTENDO CULTURAS PROBIÓTICAS E INGREDIENTES PREBIÓTICOS, caracterizado pelo fato de compreender
5 as etapas (a) mistura da matriz à base de frutas, opcionalmente, com adição de água, opcionalmente, envase e armazenamento, (b) adição dos ingredientes prebióticos, opcionalmente, inserção de aditivos alimentares, opcionalmente, envase e armazenamento, (c) adição de pelo menos uma cultura probiótica e (d) envase e armazenamento.

10 2. PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE GELADOS COMESTÍVEIS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da matriz à base de frutas compreender pelo menos uma fruta em seu estado *in natura*, polpa, resfriadas, desidratadas, congeladas, naturais, na forma de compota, concentrado, geléia, néctar, purê, suco, em calda,
15 em pasta e/ou em pó.

3. PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE GELADOS COMESTÍVEIS, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato da matriz à base de frutas compreender concentrações de cerca de 10 a 90% em peso total da formulação.

20 4. PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE GELADOS COMESTÍVEIS, de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato dos ingredientes prebióticos compreenderem quantidades de 5 a 20% em peso total da formulação.

25 5. PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE GELADOS COMESTÍVEIS, de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato dos aditivos alimentares compreenderem, opcionalmente, agentes antiespuma (antiespumantes); agentes de volume; antiaglomerantes, antiumectantes; antioxidantes; aromatizantes (flavorizantes); conservantes; corantes; edulcorantes (adoçantes);

emulsificantes; estabilizantes, espessantes, gelificantes; fixadores de cor; umidificantes (umectantes); intensificadores de sabor; e/ou reguladores de acidez.

5 6. PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE GELADOS COMESTÍVEIS, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato dos aditivos alimentares compreenderem concentrações de 0 a 30% em peso total da composição.

10 7. PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE GELADOS COMESTÍVEIS, de acordo com as reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato das quantidades de culturas probióticas compreenderem cerca de 0,001% a 2% do total da formulação.

15 8. PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE GELADOS COMESTÍVEIS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato dos equipamentos para congelamento da etapa (d) de envase e armazenamento compreenderem equipamentos do tipo sorveteira; congeladores com ventilação forçada; congeladores de contato ou de placa e/ou congeladores criogênicos.

20 9. PRODUTOS GELADOS COMESTÍVEIS, de acordo com as reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de compreender um culturas probióticas e ingredientes prebióticos, à base de frutas e não-lácteo.

25 10. PRODUTOS GELADOS COMESTÍVEIS, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato das culturas probióticas compreenderem culturas do gênero *Lactobacillus*, mais especificamente *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. reuteri*, *L. brevis*, *L. cellobiosus*, *L. curvatus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. rhamnosus*, *L. helveticus*, *L. sobrius*, *L. sakei* e/ou suas combinações.

11. PRODUTOS GELADOS COMESTÍVEIS, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato das culturas probióticas também compreenderem cocos Gram-positivos como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*, *S. diacetylactis*, *S. intermedius* e/ou suas combinações.

12. PRODUTOS GELADOS COMESTÍVEIS, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato das culturas probióticas ainda compreenderem o gênero *Bifidobacterium*, preferencialmente, espécies *B. lactis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. angulatum*, *B. thermophilum*, e/ou suas combinações.

13. PRODUTOS GELADOS COMESTÍVEIS, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato das culturas probióticas também compreenderem leveduras, tais como, *Saccharomyces bulgaricus*, *S. boulardii*, *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis* e *Torula* e/ou suas combinações.

14. PRODUTOS GELADOS COMESTÍVEIS, de acordo com as reivindicações 9 a 13, caracterizado pelo fato das culturas probióticas compreenderem quantidades mínimas dos microorganismos probióticos, de cerca de 10^6 ufc/g ou ml do produto, considerando um consumo mínimo de 10^8 ufc a 10^9 do microrganismo por dia.

15. PRODUTOS GELADOS COMESTÍVEIS, de acordo com as reivindicações 9 a 14, caracterizado pelo fato dos ingredientes prebióticos compreenderem inulina, frutooligossacarídeos, lactulose, lacto-sacarose, lactitol, galactooligossacarídeos, oligossacarídeos da soja, isomaltoligossacarídeos, xilooligossacarídeos, oligossacarídeos do mel, gentiooligossacarídeo, e/ou suas combinações.

16. PRODUTOS GELADOS COMESTÍVEIS, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato dos ingredientes prebióticos compreenderem graus de polimerização de 2 até 60 unidades.

5 17. PRODUTOS GELADOS COMESTÍVEIS, de acordo com as reivindicações 15 e 16, caracterizado pelo fato dos ingredientes prebióticos compreenderem quantidades de 5% a 20% p/p de produto, considerando um consumo mínimo de 5g e um máximo de 15 a 20g do ingrediente prebiótico por dia.

10 18. PRODUTOS GELADOS COMESTÍVEIS, de acordo com as reivindicações 9 a 17, caracterizado pelo fato dos gelados comestíveis compreenderem, opcionalmente, substâncias substitutas e/ou miméticas de gordura.

15 19. PRODUTOS GELADOS COMESTÍVEIS, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato das substâncias miméticas de gordura compreenderem carboidratos, tais como, maltodextrina, amidos, fibras, inulina, gomas e polidextrose; e proteínas, como as proteínas do ovo, extrato hidrossolúvel de soja e/ou do glúten de trigo.

20 20. PRODUTOS GELADOS COMESTÍVEIS, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato das substitutas de gordura compreenderem salatrim e olestra.

25 21. PRODUTOS GELADOS COMESTÍVEIS, de acordo com as reivindicações 9 a 20, caracterizado pelo fato dos gelados comestíveis compreenderem, opcionalmente, edulcorantes não calóricos, naturais ou sintéticos, como açúcares-álcoois, hidrolisados hidrogenados de amido, aspartame, sacarina, sucralose, acessulfame de potássio e esteviosídeos e/ou suas combinações.

22. PRODUTOS GELADOS COMESTÍVEIS, de acordo com as reivindicações 9 a 21, caracterizado pelo fato dos gelados comestíveis compreenderem cassata napolitana, *frozen yogurt*, gelados de frutas ou

sorbets, mellorine, milk shake, picolé, produtos especiais gelados, raspadinha, *sherbets, smoothie*, sorvetes e sorvete *soft* e preferencialmente, mixes.

23. PRODUTOS GELADOS COMESTÍVEIS, de acordo com
5 as reivindicações 9 a 22, caracterizado pelo fato dos gelados comestíveis compreenderem, particularmente, um mix gelado à base de uma matriz de fruta misturada com xarope de guaraná, não-lácteo contendo culturas probióticas, por exemplo, *L. acidophilus* La-5 combinado com *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e ingredientes prebiótico,
10 preferencialmente, inulina.

24. USO DOS PRODUTOS, de acordo com as reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato dos produtos gelados comestíveis compreenderem alimentos funcionais indicados a melhorar o estado de saúde e bem-estar reduzindo o risco de doença e/ou
15 disfunção.

25. USO, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato dos produtos gelados comestíveis compreenderem, particularmente, indicação à manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal e que exerçam um efeito benéfico sobre a composição e
20 atividade da microbiota intestinal, auxiliando na manutenção de um organismo saudável.

FIGURA 1

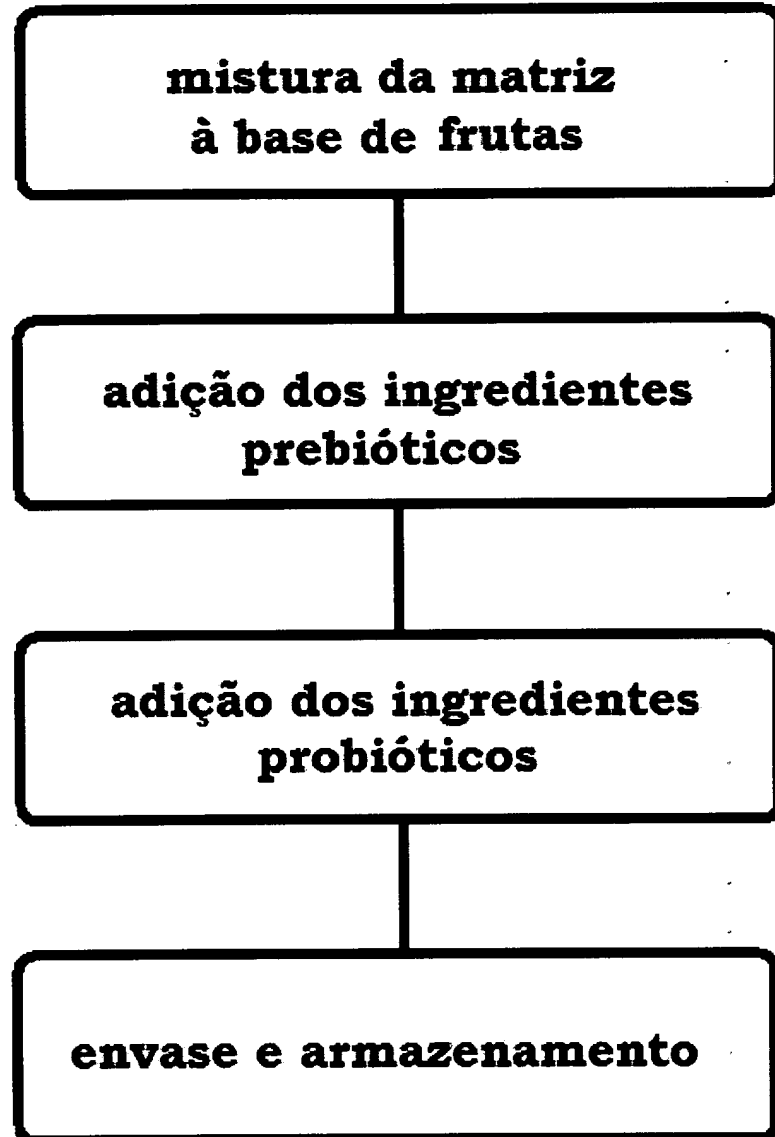


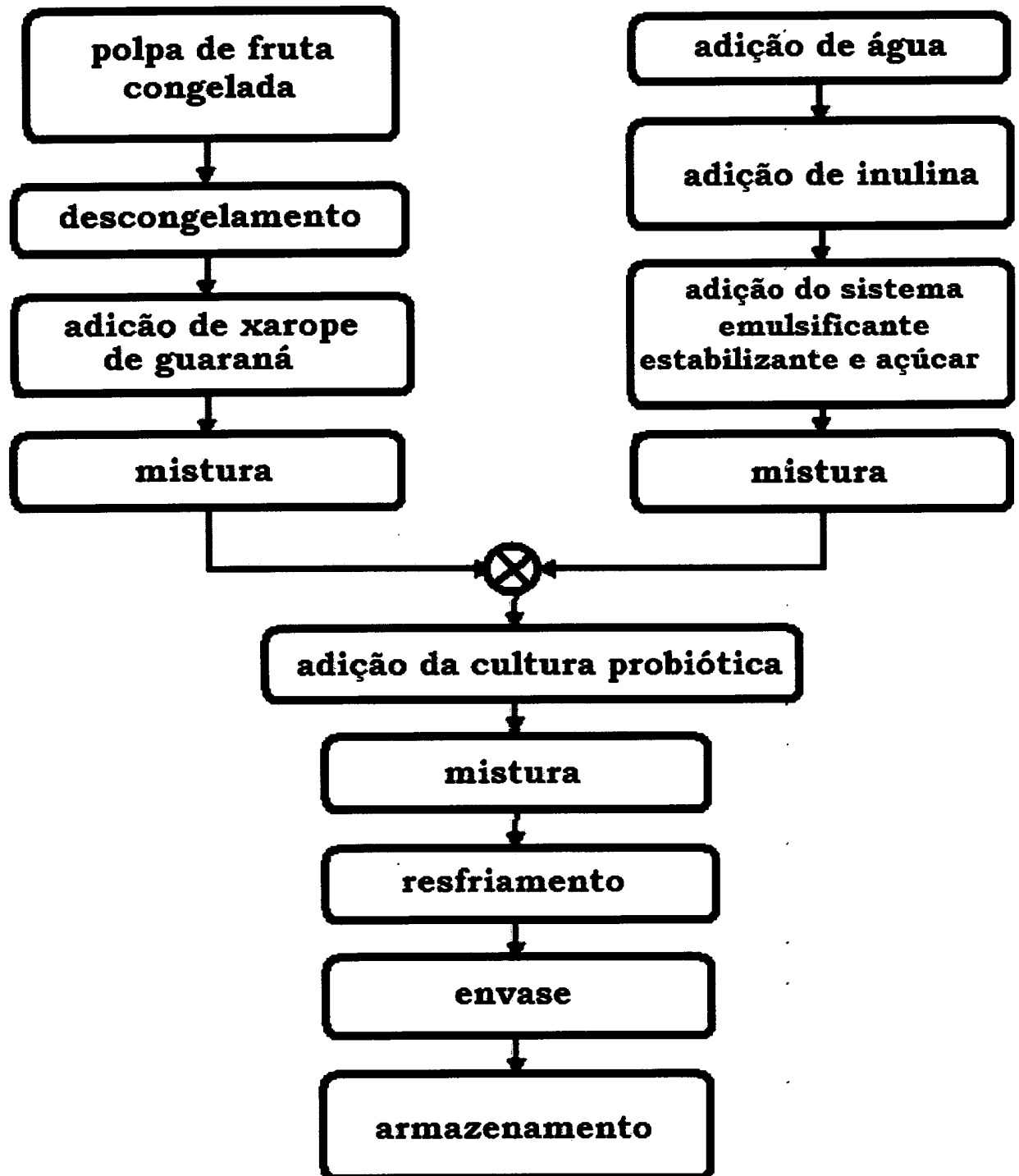
FIGURA 2

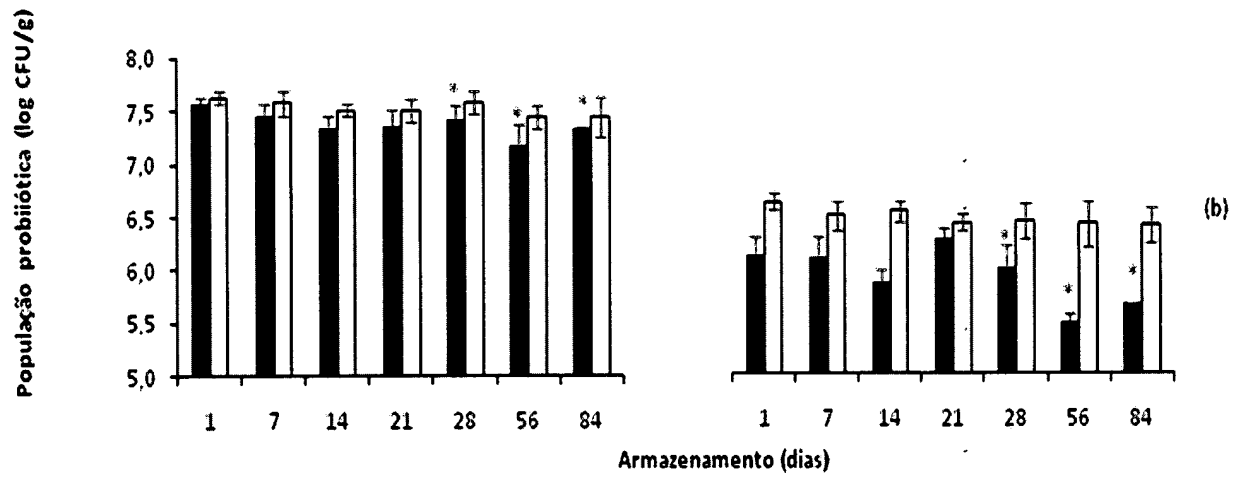
FIGURA 3

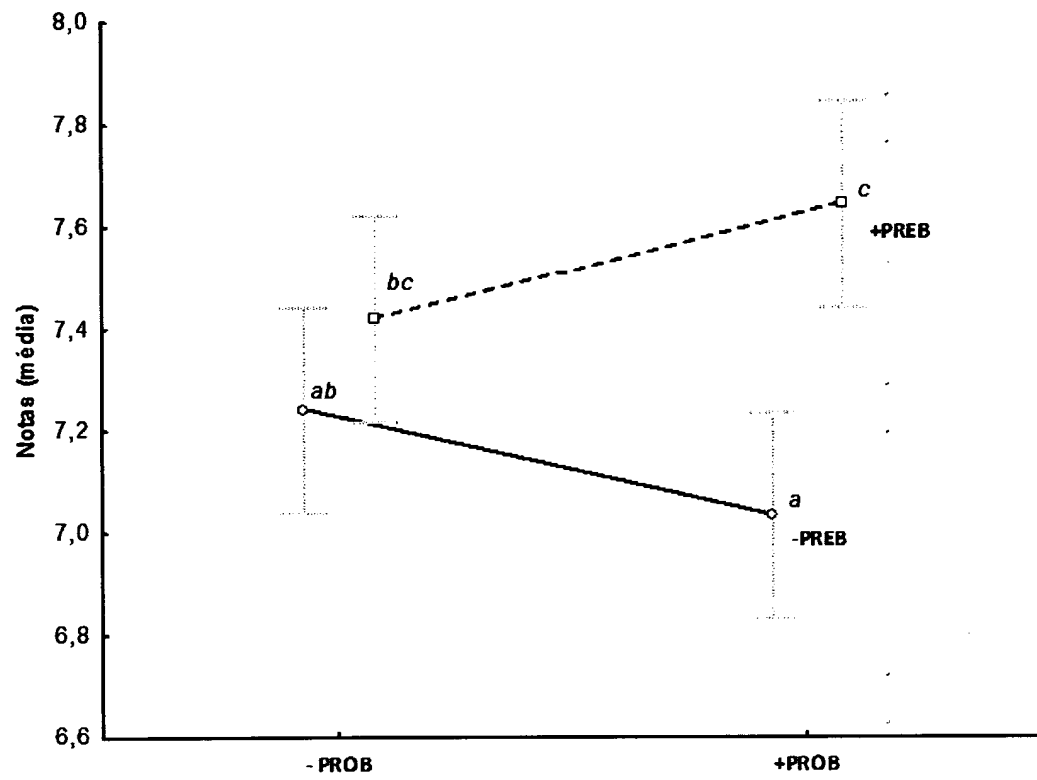
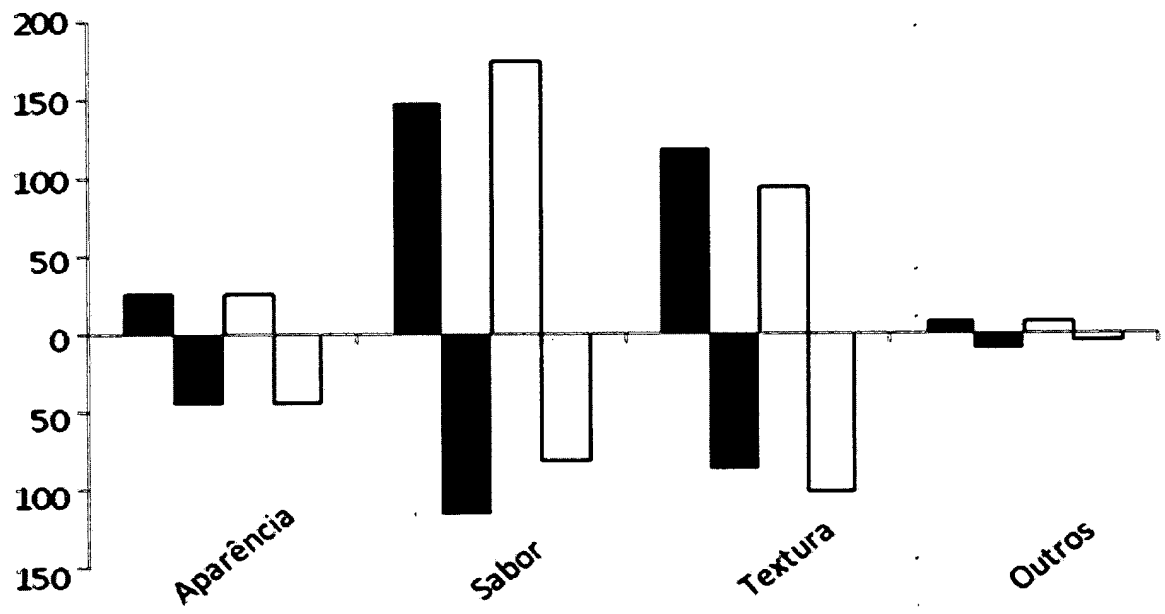
FIGURA 4

FIGURA 5

R 0905343-3

RESUMO**“PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE GELADOS COMESTÍVEIS SIMBIÓTICOS, À BASE DE FRUTAS, NÃO-LÁCTEO, PRODUTOS GELADOS COMESTÍVEIS E SEU USO”**

5 A presente invenção refere-se ao processo de fabricação de gelados comestíveis contendo culturas probióticas e ingredientes prebióticos (simbiótico), à base de frutas e não-lácteo e o dito produto gelado comestível. Adicionalmente, o presente pedido de patente destina-se ao uso dos produtos comestíveis como alimento funcional.