

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE TECNOLOGIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CÂMPUS CAMPO MOURÃO - PARANÁ

LETICIA MISTURINI RODRIGUES

**APLICAÇÃO DA VITAMINA C ENCAPSULADA EM MICROESFERAS
DE ALBUMINA E COLÁGENO EM *FROZEN YOGURT* FUNCIONAL**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2014

LETICIA MISTURINI RODRIGUES

**APLICAÇÃO DA VITAMINA C ENCAPSULADA EM MICROESFERAS
DE ALBUMINA E COLÁGENO EM *FROZEN YOGURT* FUNCIONAL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso Superior de Engenharia de Alimentos da Coordenação dos Cursos de Tecnologia e Engenharia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Campo Mourão, como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro de Alimentos.

Orientadoras: Prof^a. Dr^a. Regiane da Silva Gonzalez

Prof^a. Dr^a Maria Josiane Sereia

CAMPO MOURÃO
2014



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Campo Mourão

Coordenação dos Cursos de Tecnologia e Engenharia de Alimentos
Engenharia de Alimentos



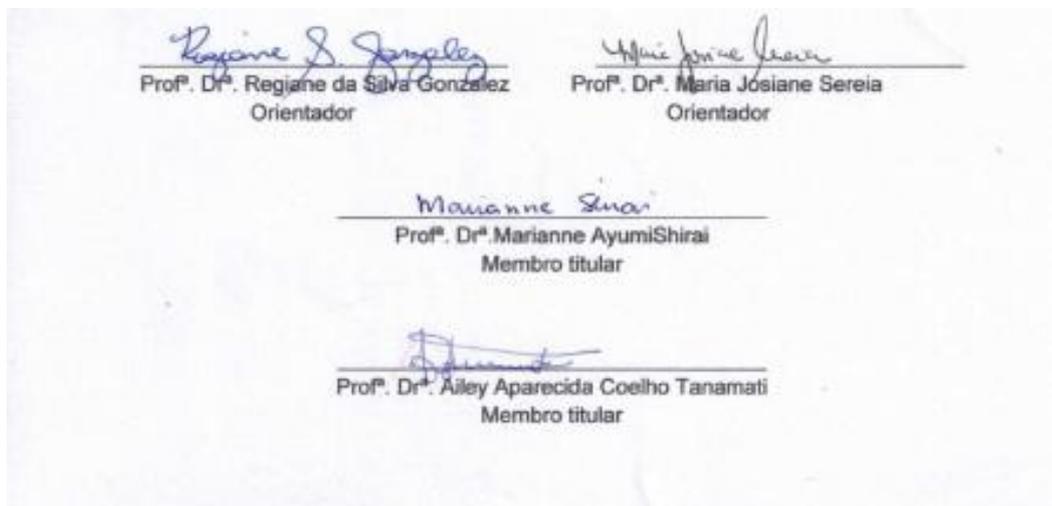
TERMO DE APROVAÇÃO

APLICAÇÃO DA VITAMINA C ENCAPSULADA EM MICROESFERAS DE ALBUMINA E COLÁGENO EM *FROZEN YOGURT* FUNCIONAL

por

LETICIA MISTURINI RODRIGUES

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 27 de Fevereiro de 2014 como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.



AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo, pois nada seria sem sua graça, por me iluminar e abençoar minha trajetória.

Aos meus pais José Augusto Rodrigues e Iliete Misturini Rodrigues, pessoas de bom caráter que se dedicaram para que eu sempre tivesse as oportunidades que eles não tiveram e por constituírem minha força e meu apoio.

Às minhas orientadoras Prof^a. Dr^a. Maria Josiane Sereia e Prof^a. Dr^a. Regiane Gonzales da Silva pela atenção, profissionalismo, dedicação e confiança demonstrados durante o acompanhamento deste trabalho.

A todos os meus amigos a minha gratidão, em especial ao Renan Luiz R. Gon que não mediu esforços para me incentivar e ajudar a realizar este projeto acima de tudo pela atenção e amizade, e as alunas Thaise Pascoato, Glória Maria Rossi e Bárbara Martins.

Aos professores da banca examinadora, pela atenção e contribuição dedicadas a este estudo.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

RODRIGUES, L. M. **Aplicação da vitamina C encapsulada em microesferas de albumina e colágeno em *frozen yogurt* funcional.** 2014. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Engenharia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

Hidrogéis podem ser utilizados na forma de microesferas e podem atuar na indústria alimentícia com finalidade de oferecer estabilidade e liberação controlada do princípio ativo. Neste trabalho foi produzido microesferas de albumina e colágeno reticuladas com íons de cálcio que atuaram como matrizes para a incorporação de vitamina C. As microesferas obtidas apresentaram tamanho médio de 15 a 60 μm , com grande capacidade de dispersão na matriz, baixa taxa de liberação da vitamina C e grande capacidade de conservação da mesma. A adição de microesferas não modificou as características físicas, químicas e sensoriais do *frozen yogurt* mostrando que esta técnica de encapsulação pode ser considerada uma boa oportunidade de negócio para a indústria de alimentos.

Palavras-Chave: Hidrogéis; Ácido Ascórbico; Fortificação; Gelados comestíveis.

ABSTRACT

RODRIGUES, L. M. **Application of vitamin C encapsulated in microspheres of albumin and collagen in functional *frozen yogurt***. 2014. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Engenharia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

Hydrogels can be used in the form of microspheres and can act in the food industry in order to provide stability and controlled release of the active principle. This work was produced albumin and collagen microspheres crosslinked with calcium ions that acted as templates for the incorporation of vitamin C. The microspheres obtained showed average size of 15-60 microns with high dispersion capacity in the matrix, low release rate of vitamin C and high capacity for storage of the same. The addition of microspheres did not change the physical, chemical and sensory characteristics of frozen yogurt showing that this encapsulation technique can be considered a good business opportunity for the food industry.

Key words: Hydrogels, Ascorbic Acid; Fortification; Ices.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Congelamento do <i>frozen yogurt</i> com incorporação de microesferas de albumina e colágeno, contendo vitamina C.....	23
Figura 2. Esquema ilustrativo do teste de derretimento.	24
Figura 3. Micela de albumina e colágeno contendo vitamina C.	28
Figura 4. (A) curva de calibração da vitamina C obtida em 261 nm e, (B) Banda espectral da vitamina C.....	29
Figura 5. Curva de liberação da vitamina C obtida em 261 nm.....	30
Figura 6. Gráfico de derretimento em função do volume pelo tempo.....	32

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO POR MICROCÁPSULAS E MICROESFERAS	13
3.2 VITAMINA C.....	15
3.3 <i>FROZEN YOGURT</i>	16
3.4 ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO	19
4.2 SÍNTESE E PREPARO DAS MICELAS COM VITAMINA C	19
4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MICELAS	20
4.3.1 Análise Microscópica.....	20
4.3.2 Intumescimento	20
4.3.3 Análise das Curvas de Calibração para Vitamina C	20
4.3.4 Cinética de Liberação da Vitamina C	21
4.3.5 Análise da Estabilidade da Vitamina C em pH ácido.....	21
4.4 ELABORAÇÃO DO <i>FROZEN YOGURT</i> FUNCIONAL.....	22
4.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	23
4.5.1 <i>Overrun</i>	23
4.6 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	25
4.7 ANÁLISE SENSORIAL.....	25
4.7.1 Análises Estatísticas dos Dados	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 SÍNTESE E PREPARO DAS MICELAS	27
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MICELAS	27
5.2.1 Análise Microscópica.....	27
5.2.2 Intumescimento	28
5.2.3 Análise das Curvas de Calibração para Vitamina C	29
5.2.4 Cinética de liberação da vitamina C	29

5.2.5 Análise da estabilidade da vitamina C em pH ácido.....	30
5.3 ELABORAÇÃO DO <i>FROZEN YOGURT</i> FUNCIONAL.....	31
5.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	31
5.4.1 <i>Overrun</i>	31
5.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	33
5.6 ANÁLISE SENSORIAL.....	33
6 CONCLUSÃO	34
7 REFERÊNCIAS.....	35
ANEXO	42

1 INTRODUÇÃO

Hidrogéis são redes poliméricas altamente hidrofílicas, que têm chamado bastante atenção para algumas aplicações como em sistemas de liberação de fármacos ou princípios ativos onde se destacam os hidrogéis sensíveis a estímulo externos. Estes são capazes de responder a alterações do meio em que estão através de modificações em sua estrutura, que pode ser observada através da alteração no intumescimento, resultando na liberação do fármaco contido na matriz do hidrogel (GUPTA, 2002; PEPPAS, 2002; RUIZ, 2001; MIYATA, 2001).

Os hidrogéis podem ser utilizados na forma de sistemas constituídos por micropartículas, contendo o fármaco de interesse, cuja liberação deve ser controlada (ARSHADY, 1991; BURGESS, HICKEY, 1994). Na indústria de alimentos uma das finalidades da incorporação de princípios ativos em micropartículas é a proteção contra oxidação química ou contra fatores ambientais, como no caso de algumas vitaminas, polipeptídios, pigmentos e compostos bioativos como a luteína e o licopeno. Outro objetivo é o retardamento da evaporação de núcleos voláteis como alguns óleos essenciais. Em algumas técnicas, a cápsula também pode ser planejada para liberar vagarosamente o produto com o passar do tempo ou até que determinada condição físico-química seja alcançada (THIES, 1994).

Uma vez que a qualidade de vida da população vem sofrendo um progresso, cada vez mais cresce o interesse da indústria alimentícia em desenvolver novos produtos com características físico-químicas e sensoriais diferenciadas e, que apresentem efeitos potencialmente favoráveis aos consumidores, nutrindo, prevenindo de doenças e proporcionando saúde e bem estar (CORTE, 2008). Neste sentido o uso de materiais capazes de atuar como substratos liberadores de princípios ativos também tem se tornado de grande interesse pelas indústrias alimentícias para a produção de alimentos funcionais.

Segundo Prasad (1980), a vitamina C atua estimulando o sistema imunológico podendo, por esse mecanismo, atuar benéficamente tanto na prevenção do câncer como dos processos viróticos, como gripes e resfriados. Estudos recentes concluíram que a vitamina C tem o maior poder antioxidante de todos os

antioxidantes naturais. Da mesma forma que a vitamina E, a vitamina C é particularmente efetiva na prevenção da peroxidação de lipídios e da lipoproteína de baixa densidade (LDL) no plasma sanguíneo, devido à sua propriedade de inativar radicais peroxil em meios aquosos (FREI, 1991).

Atualmente, diferentes tipos de produtos à base de leite de vaca, estão sendo lançados no mercado, com modificações na composição, garantindo por meio do enriquecimento com alguns tipos de minerais e vitaminas como: cálcio, ferro, vitaminas C, A, D, E seu apelo funcional. Sendo assim a fortificação de gelados comestíveis com de Vitamina C poderia melhorar o consumo deste alimento no Brasil que atualmente é 1.209 bilhões de litros por ano (ABIS, 2013).

O *frozen yogurt* é um produto desenvolvido pela indústria de laticínios que vem se destacando. Ele pode ser definido como um produto obtido basicamente com leite, submetido à fermentação láctica através da ação do *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, ou a partir de iogurte com ou sem a adição de outras substâncias alimentícias, sendo posteriormente aerado e congelado (BRASIL, 2001). O *frozen yogurt* é um produto diferenciado dos outros sorvetes já que há uma fermentação prévia de tal forma que pela ação dos microrganismos, parte dos açúcares são transformados em ácido láctico. Uma vez terminada esta fermentação, se procede à adição do restante dos ingredientes, o batimento, e o congelamento e com isso, o produto adquire consistência cremosa, suave e agradável ao paladar (GONÇALVES, 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um *frozen yogurt* funcional por meio da incorporação de microesferas de albumina e colágeno contendo vitamina C.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter microesferas de albumina e colágeno com vitamina C;
- Caracterizar o tamanho das microesferas de albumina e colágeno;
- Obter as curvas de calibração da vitamina C;
- Realizar a cinética de liberação da vitamina C;
- Verificar a estabilidade da vitamina C em meio ácido;
- Desenvolver *frozen yogurt* funcional contendo vitamina C encapsulada em microesferas de albumina e colágeno;
- Determinar a porcentagem de *overrun* e o tempo inicial de derretimento do produto;
- Quantificar a liberação de vitamina C no *Frozen* elaborado;
- Realizar análises microbiológicas;
- Realizar a análise sensorial do *frozen yogurt* e analisar estatisticamente os resultados;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO POR MICROCÁPSULAS E MICROESFERAS

Sistemas de liberação controlada de princípios ativos podem ser formados por micropartículas, as quais por definição, são pequenas partículas sólidas e esféricas com tamanho que varia entre 1 e 1000 μm (ARSHADY, 1991; BURGESS, HICKEY, 1994), sendo classificadas em microcápsulas e microesferas. As microcápsulas são sistemas reservatórios que contêm uma substância ativa revestida por polímeros de espessuras variáveis, que formam a membrana da cápsula. Neste caso, a microcápsula é constituída por uma camada de um agente encapsulante, normalmente um material polimérico que age como um filme protetor, isolando a substância ativa (gotículas líquidas, partículas sólidas ou material gasoso) e evitando o efeito de sua exposição inadequada. Essa membrana sob estímulo específico se desfaz, liberando a substância no local ou momento ideais (FIB, 2013). O material a ser encapsulado é chamado de recheio ou núcleo, e o material que forma a cápsula, de encapsulante, cobertura ou parede (FIB, 2013).

Nas microesferas, o fármaco se encontra uniformemente disperso e/ou dissolvido numa rede polimérica (GIUNCHEDI, CONTE, 1999; KAS, ONER, 2000). A diferença das microesferas para as microcápsulas é que esta constitui um sistema matricial, no qual o polímero forma uma rede tridimensional onde o material a ser microencapsulado pode estar adsorvido, incorporado ou ligado covalentemente a matriz polimérica, formando sistemas de dissolução, dispersão ou sistemas porosos (JÚNIOR, 2005).

Em resumo a função da incorporação de princípios ativos em micropartículas é proteger o ingrediente que possa estar apresentando comportamento instável na presença de outros ingredientes alimentícios. As formulações contidas neste sistema de liberação podem ter sua liberação controlada, adiantada ou adiada, além de serem protegidas contra os agentes ativos sensíveis ao oxigênio durante o processo e a fase de estocagem (FIB, 2013). Sendo assim, pode-se dizer que o processo de formação de sistemas de liberação controlada pode melhorar o produto acabado

como um todo, visto que pode ser capaz de prolongar a estabilidade e, conseqüentemente, o *shelf life* do produto, permitindo que seu valor nutricional ou aroma não seja significativamente diminuído entre as datas de produção e de consumo. Em alguns produtos a encapsulação pode ser usada como meio para mascarar o aroma e aspecto visual do produto os quais são geralmente componentes primordiais na decisão de compra do alimento (FIB, 2013). Além disso, pode, ainda, ser usada em casos onde é desejável a adição de um novo ingrediente em um determinado momento do processo de produção, sem a necessidade de novas linhas de alimentação e fases de incorporação (FIB, 2013).

A formação de microesferas a partir de polímeros hidrofílicos como albumina e colágeno pode se dar pela técnica de emulsificação seguida de reticulação. Neste caso, preparação destas micropartículas permite a incorporação de substâncias hidrofílicas, como a vitamina C somente através da escolha de solventes, emulsificantes e velocidade de agitação adequada (WATTS et al., 1990). No final do processo as propriedades como tamanho de partícula bem como velocidade de liberação do princípio ativo contido na mesma será dependente das propriedades físico químicas do polímero (concentração, solubilidade, massa molecular, entre outras propriedades) e do princípio ativo, bem como do solvente e emulsificantes empregados, e da temperatura do processo (WISE, 2000; O'DONNELL e MCGINITY, 1997). O processo de reticulação pode se dar de diversas maneiras e utilizando diferentes polímeros como celulose, alginatos, quitosanas (ROKHADE et al, 2006; BAZZO et al. 2009). Dentre estes podemos destacar a obtenção de microesferas biocompatíveis de alginato e proteína do soro para a administração oral de compostos bioativos sensíveis como a riboflavina, as quais foram capazes de retardar a liberação da riboflavina no estômago, porém permitindo a completa liberação no intestino delgado (CHEN et al. 2006).

Ao produzir microesferas a partir de polímeros hidrofílicos como a gelatina, alginato e outros polissacarídeos, pelo método de emulsificação seguido de reticulação, obtém-se redes poliméricas denominadas hidrogéis, as quais possuem a capacidade de absorver água sem se dissolver, através do processo chamado de intumescimento (ZHANG et al.,1998; MUNIZ e GEUSKENS, 2000; PEPPAS et al., 2000). Dentre os polímeros mais conhecidos estão a gelatina (colágeno) o qual já vem sendo utilizado na indústria de alimentos como espessante e gelificante e na

indústria farmacêutica (RANADE; HOLLINGER, 2004) para produção de cápsulas e formação de sistemas experimentais de liberação controlada de fármacos como antibióticos , minerais e vitaminas (CHANGEZ et al. 2005).

3.2 VITAMINA C

A vitamina C, nome genérico dado ao ácido ascórbico, é um antioxidante natural, e pode atuar de diversas formas, evitando a formação de radicais livres, apresentando ação sinérgica com a vitamina E (POLLONIO, 2000).

A vitamina C, é usado extensivamente na indústria de alimentos, não só devido ao seu valor nutricional, mas devido às suas contribuições funcionais na qualidade do produto (TORALLES et al., 2008).

Essa vitamina é usualmente consumida em grandes doses pelos seres humanos, sendo acrescentada a muitos produtos alimentares para inibir o desenvolvimento de metabólitos nitrosos carcinogênicos. Na utilização terapêutica, os benefícios resultantes da vitamina C em ensaios biológicos com animais abrangem o efeito protetor contra os danos originados pela exposição às radiações e medicamentos. Para a saúde dos idosos os benefícios se relacionam com sua ação como antioxidante, originando resistência contra infecções, diminuindo o risco ou a incidência de alguns tipos de carcinoma, entre outros (BIANCHI; ANTUNES, 1999; MAHAN; SCOTT-STUMP, 2005)

Contudo, para cada caso a recomendação de suplementação dessa vitamina deve ser avaliada especificamente, pois existem muitos componentes orgânicos e inorgânicos nas células que podem modular a atividade da vitamina C, comprometendo sua ação (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Pela Resolução - CNNPA nº 12, de 1978 o teor de vitamina C deve ser de 15mg/100g do produto pra ser considerado enriquecido.

3.3 FROZEN YOGURT

Segundo a revista Sorvetes & Casquinhas (2012), *frozen yogurt* é um termo da língua inglesa, que significa “iogurte congelado”, que simplificando nos lembra o nosso tradicional sorvete. O *frozen* surgiu como uma ótima opção, pelo fato de combinar ingredientes de alto valor nutricional, como as proteínas lácteas, fibras solúveis e insolúveis, probióticos, e grande parte de nutrientes que normalmente não estão inclusos nas dietas. Esse é o verdadeiro conceito de um *frozen yogurt*, oferta do prazer, relacionada com a promoção da qualidade de vida.

A definição aceita atualmente é de que os probióticos são microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (SAAD, 2006), e que podem ser acrescentados como suplementos na dieta, afetando de forma benéfica o desenvolvimento da flora microbiana no intestino. São também conhecidos como bioterapêuticos, bioprotetores e bioprofiláticos e são utilizados para prevenir as infecções entéricas e gastrointestinais (REIG & ANESTO, 2002).

Produtos lácteos enriquecidos com probióticos necessitam essencialmente de um sabor agradável e uma textura atrativa o que torna o sorvete tipo *frozen yogurt* uma opção conveniente para o fornecimento destes na dieta. Desse modo, associa o valor nutricional do iogurte com o sabor refrescante do sorvete, além de proporcionar uma *shelf-life* maior que sua matéria-prima. Outra característica importante do *frozen yogurt* é seu sabor leve, devido o baixo teor de gordura quando comparado ao sorvete (ALVES, 2009).

Os benefícios para manutenção da saúde através do uso das bactérias ácido-lácticas *Streptococcus salivarius ssp. termophilus* e *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* na alimentação humana já é reconhecido quando se ingere regularmente alimentos fermentados como o iogurte ou outros produto dotados de propriedades terapêuticas (INOUE et al., 1998). Com a intenção de ampliar o apelo de alimento funcional, tem-se utilizado também outras culturas como bactérias probióticas, tais como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, para incorporar ao iogurte.

3.4 ALIMENTOS FUNCIONAIS

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária define como um alimento com propriedade funcional: “aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente e/ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e/outras funções normais do organismo humano”. Entretanto, alimentos funcionais devem fazer parte da alimentação habitual proporcionando efeitos benéficos sem a necessidade de acompanhamento médico, não serem tóxicas, mesmo após a interrupção da ingestão continue promovendo efeito e que não se destinem a tratar ou curar doenças, estando seu papel ligado à redução do risco de adquirir doenças (BRASIL, 1999).

Segundo Landström et al., (2007), o consumo de determinados alimentos funcionais é influenciado pelas enfermidades apresentadas, tais como Diabetes, hipertensão arterial, entre outras, e também pela procura pessoal por uma melhoria da saúde no geral.

Os alimentos funcionais vêm colaborando significativamente na prevenção de degenerações causadas por doenças como o Diabetes que, devido à constante elevação glicêmica plasmática, leva a um comprometimento das artérias e outros órgãos. Na redução de riscos de doenças crônicas não transmissíveis, o uso de alimentos vem motivando o desenvolvimento de novas pesquisas que esclareçam os efeitos benéficos dos elementos fitoquímicos ou compostos bioativos das dietas (GAMARANO; FRAIGE FILHO, 2004).

Esses alimentos funcionais são os que provêm a oportunidade de combinar produtos comestíveis de alta flexibilidade com moléculas biologicamente ativas, como tática para consistentemente corrigir distúrbios metabólicos (WALZEM, 2004), resultando em redução dos riscos de doenças e também na manutenção da saúde (ANJO, 2004).

Dentre os alimentos funcionais destacam-se alguns alimentos como sucos a base de soja, biscoitos feitos com cereais e grãos integrais entre outros. Vale ressaltar ainda que os benefícios à saúde com a suplementação de alguns nutrientes já são reconhecidos como alimentos funcionais. Destacam-se também

como alimentos funcionais os lipídios da classe dos terpenos e o ácido ascórbico (vitamina C) em frutas cítricas; os isoflavonóides da soja; os tocotrienóis (vitamina E) de grãos de cereais e vegetais; os polifenólicos do gengibre e dos chás (verde e preto); o licopeno do tomate, melancia e goiaba; as antocianinas do feijão, cereja, amora, uva e morango; a quercetina na cebola, brócolis, uva vermelha (vinho), cereja, maçã e certos cereais; o resveratrol das cascas das uvas, além da atividade antioxidante do alecrim, da sálvia, do tomilho e do orégano (CRAIG & BECK, 1999; WEISBURGER, 1999; FERRARI, 2005)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO

Este trabalho foi realizado nos laboratórios de Processamento e de Análise de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) *Campus* Campo Mourão.

4.2 SÍNTESE PREPARO DAS MICROESFERAS COM VITAMINA C

A obtenção das microesferas ocorreu seguindo a metodologia proposta por Zheng et al., (2004) com algumas adaptações.

A síntese das microesferas deu-se a partir da mistura de duas soluções: 200 mL de solução de colágeno 20% (m/v) e 200 mL de solução de albumina 10% (m/v) ambas em água destilada. A solução de albumina foi preparada em temperatura ambiente, para evitar alterações das características funcionais. A solução de colágeno foi preparada em temperaturas de 80 °C em banho Maria até dissolução completa. Utilizando um béquer, misturou-se a solução de colágeno 20%, em temperatura ambiente, e a solução de albumina 10%, sob agitação magnética (Fisatom, Mod. 713D) com uma velocidade de 450rpm, por aproximadamente três minutos até completa dissolução. Em seguida foram adicionados 0,075 g de Tween 80 dissolvidos em 30 mL de água destilada, agitou-se por mais três minutos. Após foi adicionado 1,2 g de vitamina C e homogeneizou-se. Foram adicionados 800 mL de água destilada a 1°C, para formação da emulsão de albumina e colágeno dispersa em meio aquoso. Agitou-se a mistura por mais 3 minutos, e então foram adicionados 320 mL de solução de cloreto de cálcio 8% (m/v), para reticulação do colágeno e albumina, mantendo agitação constante. Em seguida, o pH da solução foi ajustado para 4,5 com HCl. Ao término da agitação adicionou-se a solução 400 mL de isopropanol e, em seguida a solução foi centrifugada para retirada do álcool e separação das microesferas de albumina e colágeno. Após, as microesferas já

reticuladas, foram lavadas com água destilada, e foram armazenadas em geladeira à temperatura de 5°C.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS

4.3.1 Análise Microscópica

Foi realizada com o microscópio óptico (BIOVAL, modelo L2000A), com câmera acoplada ao computador (DCM130E), com o intuito de verificar a estrutura polimérica. As medidas dos diâmetros das microesferas foram obtidas através do programa Image Tool, com objetivo de averiguar se realmente ocorreu a formação das microesferas.

4.3.2 Intumescimento

Análise de intumescimento consistiu pesagem de uma amostra, e secagem em estufa à temperatura de 100°C até peso constante. A análise foi realizada em triplicata.

O grau de intumescimento foi calculado por meio da diferença de peso entre a massa das microesferas hidratadas, obtida durante o processo de síntese, pela massa seca destes materiais (PEPPAS, 2000).

4.3.3 Análise das Curvas de Calibração para Vitamina C

Foram preparadas soluções aquosas de vitamina C, a partir da diluição de uma solução $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, as quais foram utilizadas para preparar uma curva de

calibração através da leitura da absorção máxima da substância em 260nm, utilizando-se o espectrofotômetro.

4.3.4 Cinética de Liberação da Vitamina C

A cinética de liberação da vitamina C foi realizada adicionando-se 0,5 g de microesferas contendo ácido ascórbico em um frasco contendo 3 mL de água deionizada. Alíquotas de 1 ml foram retiradas em 5, 10, 20, 30 e 40 min e então levadas ao espectrofotômetro para detecção da absorção máxima da vitamina C. O valor de máxima absorção foi convertido em concentração utilizando uma curva de calibração obtida previamente. A cinética foi realizada em duplicata.

4.3.5 Análise da Estabilidade da Vitamina C em pH ácido

A determinação da estabilidade da vitamina C foi realizada de acordo com a metodologia descrita por AOAC (1990) com modificações, conhecida como método de Tillmans. Uma amostra de 1 g de microesfera foi deixada em repouso em 6 mL solução ácida (pH=2) em seguida titulou-se a amostra na presença de um indicador 2,6 diclorofenolidofenol. A estabilidade vitamina C foi realizada em duplicata.

Para o cálculo de padronização, foi calculado o fator (F) da solução de Tillmans conforme a equação (1) :

$$F = \frac{\text{mg de vitamina C usados na titulação}}{\text{mL da solução de Tillmans gastos}} \quad (1)$$

Para a determinação da vitamina C, utilizou-se a equação (2):

$$\text{ácido ascórbico} \frac{\text{mg}}{100} \text{ mL} = \frac{\text{v.F.100}}{A} \quad (2)$$

Sendo:

V = volume da solução de Tillmans gasto na titulação

F = fator da solução de Tillmans

A = mL da amostra utilizada

4.4 ELABORAÇÃO DO *FROZEN YOGURT* FUNCIONAL

As formulações foram elaboradas em triplicatas de acordo com o método proposto por Oliveira, Sereia, Oliveira (2012), com modificações. Na formulação estudo aplicou-se as microesferas e, na formulação convencional ou controle não ocorreu adição de microesferas.

Para a pré-ativação da cultura probiótica mista de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei*, pesou-se uma alíquota de cinco gramas da cultura e dissolveu-se em 1 Litro de leite UHT desnatado em fraco asséptico. A incubação se deu em estufa à temperatura de 40°C por um período de 12 horas.

A formulação do *frozen yogurt* foi realizada em duas etapas sendo elas o preparo da base e o da calda. Preparou-se a base com a homogeneização de 1% de goma guar, 1% de amido de milho modificado (Gemacon), 10% de açúcar e 2 Litros leite desnatado (Líder) por meio de um liquidificador industrial. Após a homogeneização, a mistura sofreu um tratamento térmico até atingir a temperatura de 90°C por 10 minutos. Em seguida, a base foi resfriada à temperatura de 36°C, momento no qual foi adicionada cultura probiótica na forma de “inoculo pré-ativado”, sendo incuba em estufa a 37 °C por um período de 10 horas.

Para elaboração da calda homogeneizou-se em liquidificador industrial 2 Litros da base com 5% de leite de em pó, 1% de soro em pó, 5% de glicose e 1,3%

de emulsificante. A calda foi congelada em sorveteira vertical da marca Fort Frio à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, (Figura 1). As microesferas de vitamina C foram incorporadas e homogeneizadas na massa no final do processo de congelamento.

Após a elaboração do *frozen yogurt* avaliou-se o produto por meio de análises físico-químicas, microbiológicas e sensorial.



Figura 1. Congelamento do *frozen yogurt* com incorporação de microesferas de albumina e colágeno, contendo vitamina C.

4.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

4.5.1 *Overrun*

O *Overrun* foi definido como o aumento do volume do sorvete obtido a partir de um volume inicial de calda.

Durante o processo de congelamento ocorreu incorporação de ar à calda do *frozen*, que resultou em um aumento do volume da calda inicial. Para determinar o *overrun*, porcentagem de incorporação de ar na amostra foi calculado segundo a Equação 3 descrita por Mosquim (1999):

$$\% \text{ overrun} = \frac{[\text{volume fina do frozen} - \text{volume inicial da calda}]}{[\text{volume inicial da calda}]} \times 100 \quad (3)$$

4.5.2 Análise de derretimento

O teste foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Correia et al., (2008). Amostras de *frozen* de aproximadamente 60 mL foram congeladas por aproximadamente 60 minutos em freezer vertical, em seguida, transferiu-se este volume para uma tela de malha metálica de abertura 0,5 cm (Figura 2). Registrou-se o volume de *frozen* drenado a cada cinco minutos com a temperatura ambiente do laboratório entre $32 \pm 1^\circ\text{C}$, sem circulação de ar. A partir dos dados obtidos foram construídos gráficos do volume derretido em função do tempo, no qual pode-se obter por meio de regressão linear o tempo inicial de derretimento. O teste foi realizado em duplicata.



Figura 2. Esquema ilustrativo do teste de derretimento.

4.5.3 Análise da Quantidade de Vitamina C

A quantidade de vitamina C foi determinada seguindo a metodologia descrita por AOAC (1990), conhecida como método de Tillmans, fundamenta-se na titulação de uma amostra de 10 mL na presença de um indicador 2,6 diclorofenolidofenol

Para o cálculo de padronização, foi calculado o fator (F) da solução de Tillmans conforme descrito anteriormente.

4.6 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

4.6.1 Pesquisa de coliformes a 35°C e a 45°C

A partir de 25 gramas de *frozen*, realizou-se a primeira diluição em 225 mL de água peptonada tamponada 0,1%. As preparações das diluições decimais subsequentes foram realizadas em tubos contendo 9 mL do mesmo diluente até 1/1000. Para cada diluição, foram feitas três repetições para o teste do número mais provável de coliformes (NMP) em caldo lauril sulfato triptose (LST). A incubação deu-se em estufa bacteriológica a 35-37°C por 48 horas.

A presença de coliformes foi evidenciada pela formação de gás nos tubos de Durhan, produzido pela fermentação da lactose contida no meio.

A prova confirmativa para coliformes a 35°C ocorreu por meio da inoculação dos tubos positivos, da prova presuntiva, para tubos contendo caldo verde brilhante bile lactose 2% e posterior incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

A prova confirmativa para coliformes a 45°C foi realizada pela inoculação dos tubos positivos da prova presuntiva para tubos contendo o caldo EC e posterior incubação em temperatura seletiva de $45 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

4.7 ANÁLISE SENSORIAL

Para análise sensorial do produto, o projeto foi submetido ao Conselho Nacional de Saúde e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, titulado como: Desenvolvimento de *Frozens* Funcionais Linha Clean Label, e com o número do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE): 02027012.3.0000.0092 (ANEXO B).

A avaliação sensorial foi realizada no quarto dia após a fabricação dos *frozens*, no Laboratório de Análise Sensorial de Alimentos pela aplicação do teste duo-trio com 60 provadores não treinados e recrutados no próprio campus da universidade para verificar existência ou não de diferença significativa entre as amostras estudadas (DUTCOSKI, 2011).

Os provadores receberam individualmente 20g de cada amostra em copos plásticos descartáveis codificados com números aleatórios de três dígitos, acompanhados de uma colher descartável, um copo com água potável e das fichas de respostas (ANEXO A).

4.7.1 Análises Estatísticas dos Dados

Os dados obtidos das análises foram submetidos a análises de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os resultados foram analisados por meio do programa *Statistica (Statsoft)* versão 8.0 (GRANATO, 2010).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE E PREPARO DAS MICELAS

O método de síntese de microesferas de albumina e colágeno utilizado mostrou-se eficiente para a incorporação de vitamina C nos hidrogéis

Este processo utiliza tween80, seguido de reticulação com íons cálcios e origina hidrogéis de albumina e colágeno reticuladas. Segundo Brash et al., (1996) ocorre pela formação de interações do tipo íon dipolo, entre os íons cálcio e os grupos ácidos carboxílicos carregados negativamente da albumina e do colágeno, cuja força atrativa é suficiente para constituir pontos de reticulação.

Neste caso, as substâncias dispersas na matriz polimérica estão protegidas pela mesma, podendo a matriz ser utilizada como um sistema de liberação controlada de substâncias ativas, no caso em questão da vitamina C (JÚNIOR, 2005).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MICELAS

5.2.1 Análise Microscópica

As microesferas de albumina e colágeno obtidas por microemulsificação seguida de reticulação por íons cálcio foram comprovadas através de imagens obtidas por microscopia óptica.

Foi possível observar que o tamanho médio das microesferas variou entre 15,4 a 65 μm . A variação de tamanhos pode estar associada a baixa velocidade de agitação empregada que, por qual por ser de baixa rotação foi insuficiente para evitar agregação das microesferas (SHAW,1975) . A figura 3 apresenta microscopia das microesferas analisadas.

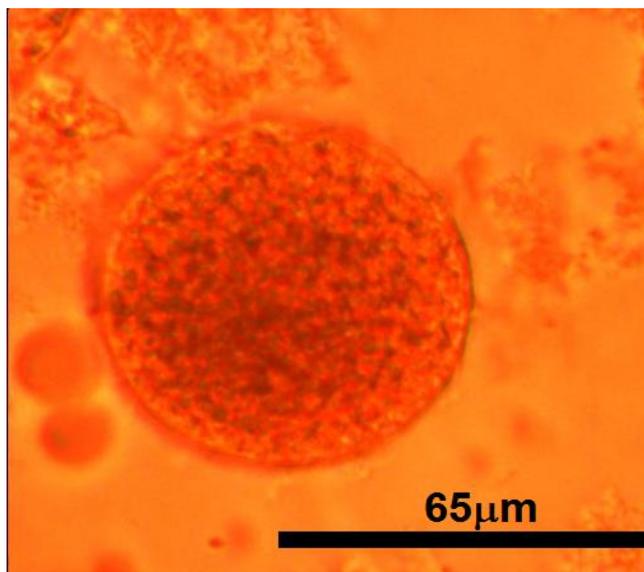


Figura 3. Micela de albumina e colágeno contendo vitamina C que foi obtida em microscopia óptica com objetiva de 40X.

O fato das microesferas apresentarem tamanhos pequenos, menores que 100 μm são desejáveis, ou seja, de grande importância para aprovação do *frozen yogurt* elaborado, uma vez que as mesmas não foram perceptíveis na análise sensorial.

5.2.2 Intumescimento

O teor de água absorvido pelas amostras analisadas foi em média $13,61 \pm 1,22\%$, podendo ser caracterizado através da determinação do grau de intumescimento. Quanto mais hidrofílica for a rede polimérica maior é o teor de água absorvido. A água contida dentro desses sistemas poliméricos pode ser utilizada como forma de incorporar princípios ativos hidrossolúveis, como a vitamina C (PEPPAS, 2000).

5.2.3 Análise das Curvas de Calibração para Vitamina C

A Figura 4A apresenta a curva de calibração da vitamina C medida em espectrofotometro a 261 nm tendo como padrão a própria vitamina C. A curva de calibração foi obtida a partir das curvas de absorção máxima da vitamina C em 261nm (Figura 4B), como pode ser observado na figura 4.

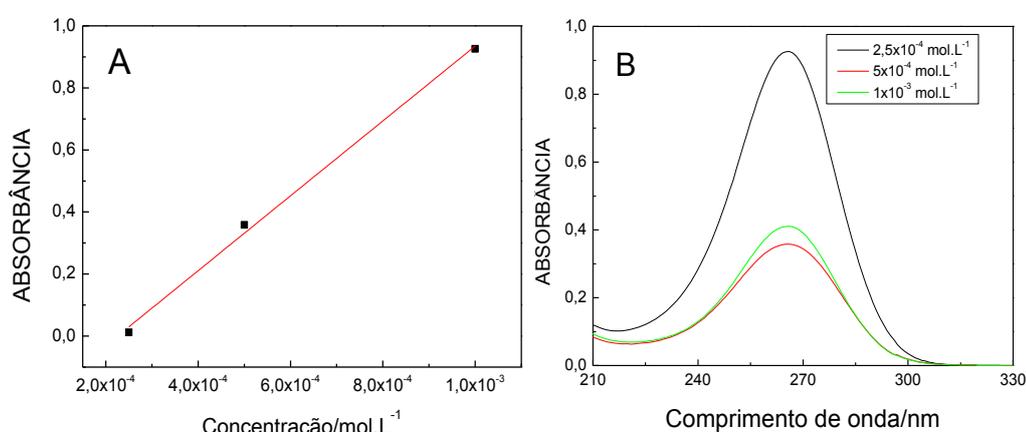


Figura 4. (A) curva de calibração da vitamina C obtida em 261 nm e, (B) Banda espectral da vitamina C.

5.2.4 Cinética de liberação da vitamina C

A análise da curva cinética de liberação do princípio ativo (Figuras 5) mostrou que as microesferas contendo vitamina C foram capazes de liberar $1,3 \times 10^{-4}$ mg/ 100 mL vitamina C em 30 minutos de imersão em solução aquosa.

Verificou-se ainda, através da cinética de liberação, que após seis semanas de armazenamento foi possível observar que houve baixa taxa de liberação do princípio ativo, o que mostra a característica das microesferas de garantir a conservação dos mesmos.

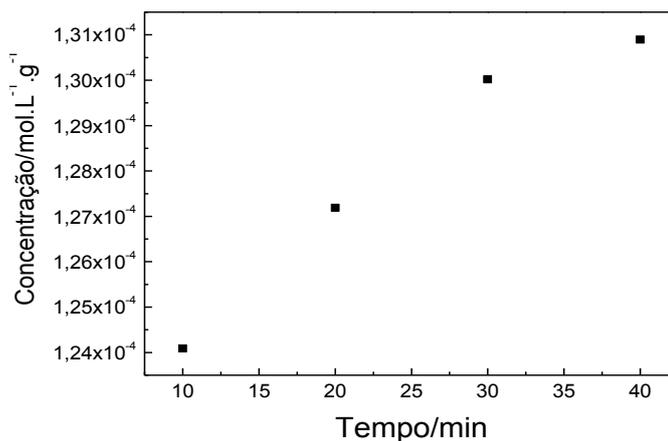


Figura 5. Curva de liberação da vitamina C obtida em 261 nm.

5.2.5 Análise da estabilidade da vitamina C em pH ácido

Após a titulação com solução de Tillmans, foi observado que a quantidade de vitamina C quantificada não sofreu alteração após 40 minutos de imersão em solução ácida tendo pH = 1,85. A quantidade de vitamina C determinada foi de: 13,6 mg/ 100 mL cujo valor foi obtido utilizando volume de 1,0 mL da solução de Tillmans durante a titulação, tanto para a solução titulada imediatamente após a imersão em solução ácida, quanto após 40 minutos de imersão. Esse resultado indica que o teor de vitamina C contido na microesfera não sofrerá alterações durante o processo de digestão no estomago, o que provavelmente pode ser associado a proteção da vitamina C pelo colágeno e albumina da microesfera.

5.3 ELABORAÇÃO DO *FROZEN YOGURT* FUNCIONAL

5.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

5.4.1 *Overrun*

O *overrun* das formulações adicionadas com microesferas foi de 16,4% e a formulação sem microesferas 12,1%, apresentando diferença significativa ao nível de 5%. A adição de microesferas observada por Luquet (1993), que estabelece valor mínimo de 20% para sorvetes.

A formulação sem adição de microesferas apresentou valor de *overrun* inferior.

Segundo Oliveira (2012) a composição da calda que abrange o conteúdo de sólidos totais influencia na aeração, sendo assim, a incorporação das microesferas proporcionou aumento do *overrun*. Por se tratar de produto sem adição de gordura, ambas as amostras estudadas apresentaram baixo *overrun*.

5.4.2 Análise de Derretimento

A Figura 5 apresenta o gráfico de derretimento que relaciona o volume derretido pelo tempo das duas amostras analisadas. Foi observado pequeno incremento na velocidade de derretimento na formulação elaborada sem microesferas nos primeiros 20 minutos do teste. Nos 15 minutos subsequentes as duas formulações se igualaram, terminando o derretimento dos 60 mL aos 35 minutos.

O tempo inicial de derretimento das amostras de frozen com microesferas e sem microesferas, foi respectivamente 7,05 e 7,37 minutos, não havendo diferença significativa ao nível de 5% entre os tratamentos.

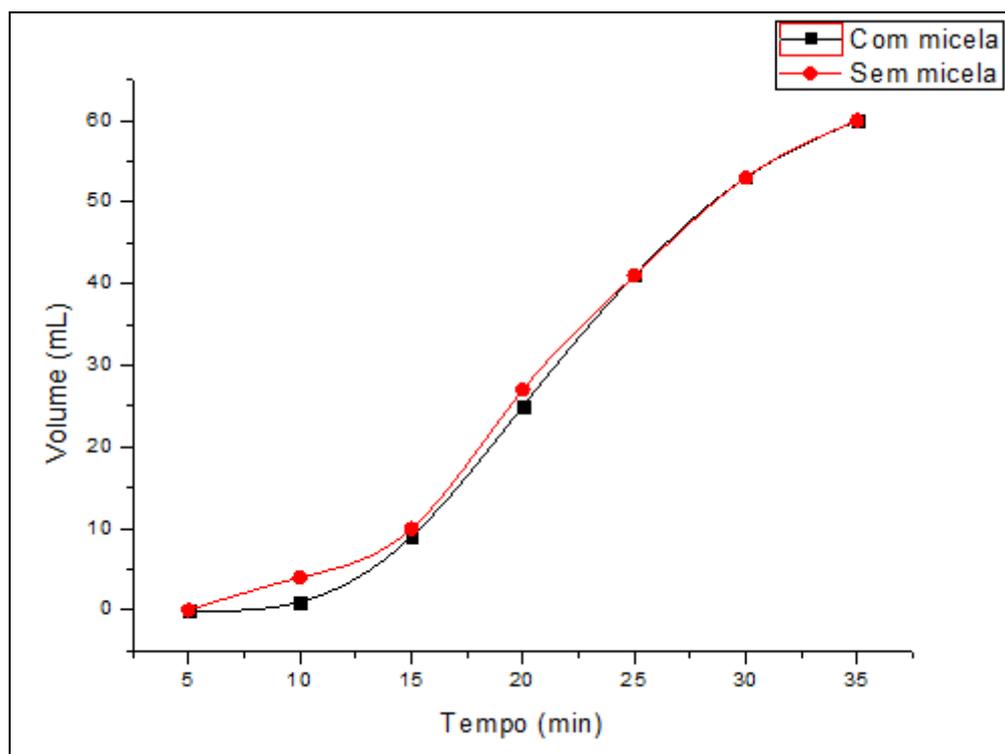


Figura 6. Gráfico de derretimento em função do volume pelo tempo.

Segundo Koxholt et al., (2001), o sorvete é um sistema multifásico complexo, que é formado por uma solução viscosa sendo composta por bolhas de ar, glóbulos de gordura parcialmente coalescidos e cristais de gelo dispersos. Esses elementos formam uma rede tridimensional responsável pela estrutura do sorvete. Vários são os fatores que conduzem o derretimento, entre eles a taxa de incorporação de ar ou *overrun*, as interações lipídicas e a cristalização da gordura e concentração de emulsificante, além do diâmetro dos glóbulos de gordura.

5.4.3 Análise de quantidade de Vitamina C

O valor de F (fator da solução de Tillmans) observado foi de 0,13 mg/ 100 mL e as quantidades de vitamina C nas microesferas foi de aproximadamente 13,6 mg / 100 mL. Para o *frozen yogurt* elaborado com adição de 10% da massa de microesferas foi de aproximadamente 5,2 mg/ 100 mL. O que demonstra que as microesferas são capazes de garantir uma quantidade mínima de aproximadamente 5% de vitamina C no produto final

5.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

5.5.1 Pesquisa de Coliformes a 35°C e a 45°C

Para as duas formulações elaboradas os valores de coliformes totais a 35°C e termotolerantes a 45°C foram <3,0 NMP/g, atendendo os padrões estabelecidos pela Resolução RDC nº 12 da Brasil (2001), que é de no máximo 5×10^1 NMP/g para coliformes termotolerantes.

Os resultados das análises microbiológicas comprovaram condições higiênico-sanitárias satisfatórias para os *frozens* elaborados, demonstraram que as formulações atenderam os Padrões microbiológicos mínimos para consumo, não apresentando risco para o consumidor.

5.6 ANÁLISE SENSORIAL

Não foi observado diferença significativa ao nível de 5% para as duas amostras analisadas (Anexo C).

O Teste Duo-Trio foi realizado com 60 julgadores, dos quais 35 avaliaram as amostras de forma correta. Com base na Tabela do Teste Duo-Trio, para 60 provadores seria necessário no mínimo 37 acertos, e significância de 5%, para as formulações se diferirem.

Na avaliação de um novo produto, a análise sensorial é uma ferramenta importante, pois é através dela que se denota a aceitação e preferências de um público alvo. É um conjunto de técnicas visando avaliar um produto quanto a sua qualidade, usufruindo das percepções, sensações e reações do consumidor sobre seus atributos (MINIM, 2010).

6 CONCLUSÃO

As microesferas obtidas apresentaram tamanhos pequenos, com grande capacidade de dispersão na matriz, baixa taxa de liberação da vitamina C e grande capacidade de conservação da mesma. A adição de microesferas não modificou as características físicas, químicas e sensoriais do *frozen yogurt* mostrando que esta técnica de encapsulação pode ser considerada uma boa oportunidade de negócio para a indústria de alimentos.

7 REFERÊNCIAS

ABIS. Associação Brasileira das Indústrias e do Setor de Sorvetes . **Brasileiros consumiram mais de 1 bilhão de litros de sorvete em 2012**. Disponível em: <<http://www.informativo.com.br/site/noticia/visualizar/id/35508/?Brasileiros-consumiram-mais-de-1-bi-de-litros-de-sorvete-em-2012.html>>. Acesso em: 20 de Jan. 2014.

ALVES, L. L.; RICHARDS, N. S. P. S.; BECKERL L. V.; MILANIL D. F. A. L. I. G.; REZERL A. P. S.; SCIPIONILL G. C.; Aceitação sensorial e caracterização de frozen yogurt de leite de cabra com adição de cultura probiótica e prebiótico. **Ciência Rural**, v. 39, n. 9, p. 2595-2600, 2009.

ANJO, D. L. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**. v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.

ARSHADY, R. Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules. Part2. Polyactides and related polyesters. **Journal Controlled Release**, Amsterdam, v. 17, p. 1-21, 1991.

BAZZO, C.G; SENNA, L.E; PIRES, N.T.A. Poly (3 hydroxybutyrate)/chitosan/ketoprofen or piroxicam composite microparticles: Preparation and controlled drug release evaluation. **Carbohydrate Polymers**.v. 77, p. 839–844, 2009.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**., Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BRASH, J. L. and Wolciechowski. *Interfacial Phenomena and bioproducts*, Marcel Dekker, Inc. New York, 1996.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução nº. 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde

alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 03 de maio de 1999.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência nacional de vigilância sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF. 2001.

BURGESS, D. J.; HICKEY, A. J. Microsphere technology and applications. In: SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C., eds. **Encyclopedia of Pharmaceutical Aceutical technology**. New York: Marcel Dekker, v. 10, p. 1-29, 1994.

CHANGEZ, M.; KOUL, V.; DINDA, A. K. Efficacy of antibioticsloaded interpenetrating network (IPNs) hydrogel based on poly(acrylic acid) and gelatin for treatment of experimental osteomyelitis: **In vivo study**. **Biomaterials**, v.26, p. 2095 -2104, 2005.

CHEN, L.; SUBIRADE, M. Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. **Biomaterials**, v. 27, p. 4646-4654, 2006.

CORREIA, R. T. P., MAGALHÃES, M. M. A., PEDRINI, M. R. S., CRUZ, A. V. F. & CLEMENTINO, I. Sorvetes elaborados com leite caprino e bovino: composição química e propriedades de derretimento. **Revista de Ciências Agrônomas**. Centro de Ciências Agrárias, Fortaleza, v. 39, n. 02, p. 251-256, 2008.

CORTE, F. F. D. **Desenvolvimento de frozen yogurt com propriedades funcionais**. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2008.

CRAIG, W & BECK, L. Phytochemicals: health protective effects. **Canadian Journal of Dietetic Practice and Research**, Montreal, v.60, p.78-84, 1999.

DUTCOSKI, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. 3ª ed., Curitiba: Champagnat, 2011.

FERRARI, Carlos Kusano B.. Bioquímica dos Alimentos Funcionais, Nutrição e Saúde. **Revista Nutrição Profissional**. n. 1, bimestral, maio-jun 2005, p 21-28.

FIB. Food Ingredients Brasil. **A microencapsulação a serviço da indústria alimentícia**. São Paulo: Insumos, n. 25, p.30-36, 2013.

FREI, B. Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low density lipoprotein against oxidation damage. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, p. 1113-1118, 1991.

GAMARANO, L.; FRAIGE FILHO, F. Alimentos Funcionais no tratamento do Diabetes Mellitus. **Qualidade em Alimentação: Nutrição**. São Paulo: Ponto Crítico, n. 19, p. 20-21, jun./set. 2004. ISBN 1519771-9.

GONÇALVES, A. A.; EBERLE, I. R. Frozen yogurt com Bactérias Probióticas. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n. 3, p. 291-297, 2008.

GIUNCHEDI, P.; CONTE, U.; CHETONI, P.; SAETTONE, M.F. Pectin microspheres as ophthalmic carrier for piroxicam evaluation in vitro and in vivo in albino rabbits. **European Journal of Pharmacology**. Sci., v. 9, p. 1-7, 1999.

GRANATO, D.; RIBEIRO, J. C. B.; CASTRO, I. A.; MASSON, M. L. Sensory evaluation and physicochemical optimization of soy-bases desserts using response surface methodology. **Food Chemistry**, v.121, p. 899-906, 2010.

GUPTA, P.; VERMANI, K.; GARG S. Hydrogels: From controlled release to pH-responsive drug delivery. **Drug Discovery Today**. n.10, v. 7, p. 569-579, 2002.

INOUE, K.; SHIOTA, K.; ITO, T. Preparation and properties of ice cream type *frozen yogurt*. **International Journal of Dairy Technology**, v. 51, n. 2, p. 44-50, 1998.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: v. 1, *Métodos Químicos e Físicos para Análises de Alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p.394-395.

JÚNIOR, A.A.S. **Micropartículas biodegradáveis para liberação prolongada de fármacos**. Araraquara-SP: UNESP, 2005. 140p. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, 2005.

KOXHOLT, M.; EISEMANN, B.; HINRICHS, J. Effect of the fat globule size on the meltdown of ice cream. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p.31-37, 2001.

KAS, H. S.; ONER, L. Microencapsulation using coacervation/ phase separation: an overview of the technique and applications. In: WISE, D. L., ed. *Handbook of Pharmaceutical controlled release technology*. New York: Marcel-Dekker, 2000. p. 301-328.

LUQUET, F. M. **Leche y productos lacteos**. Zaragoza: Acribia, 1993. 522p.

MAHAN, M.L.; SCOTT-STUMP, S.E. Alimentos, nutrição & dietoterapia. 11. ed. São Paulo: Roca, 2005.

MINIM, Valéria P. R. **Análise Sensorial: estudos com consumidores**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2010.

MIYATA, T., et. al. **Biomolecule-sensitive hydrogels**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, p.79-98, 2002.

MOSQUIM, M. C. A. **Fabricando sorvetes com qualidade**. São Paulo: Fonte Comunicações, 1999.

MUNIZ, E.C.; GEUSKENS, G. J. **Membrane Science**, v.172, p.287, 2000.

OLIVEIRA, R. R.; SEREIA, M. J.; OLIVEIRA, T. P.; AZEVEDO, A. S. Aspectos físico-químicos e sensoriais de *frozens yogurt* elaborados com culturas probióticas e diferentes proporções de mel. In: SIMPÓSIO DE TECNOLOGIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS, 4. 2012. **Anais...**Campo Mourão: UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2012. 1 CD-ROM.

OLIVEIRA, S.P. Alimentos funcionais: aspectos relacionados ao consumo. **Food Ingredients**, n.20, p.24-28, set./out. 2002.

O'DONNELL, P.B.; MCGINITY, J.W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n. 28, p. 25-42, 1997.

PEPPAS, N.A, BURES, P., LEOBANDUNG, W., ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.50, p.27-46, 2000.

PRASAD, K.N. Modulation of the effects of tumor therapeutic agents by vitamin C. **Life Science**, v.27, p. 275-280, 1980.

POLLONIO, M. A. R. Alimentos funcionais: as recentes tendências e os aspectos de segurança envolvidos no consumo. **Revista Higiene Alimentar**. v. 14, n. 74, p. 26-31, 2000.

RANADE,V.V.; HOLLINGER, M.A. **Drug Delivery System**. Flórida: CRC Press, 2004.

REIG, A. L. C.; ANESTO, J. B. Prebióticos y probióticos, una Relación Beneficiosa. Instituto de Nutrición e Hienede los Alimentos. **Revista Cubana de Alimentação e Nutrição**. v.16, n.1, p.63-8, 2002.

RODRIGUES, L. M.; MORAES, T.; SILVA, R. **Liberção de anti-inflamatórios e Vitamina C a partir de microesferas de hidrogéis de albumina e colágeno**. In: IV SIMTEA – Simpósio de Tecnologia e Engenharia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão: SIMTEA, 2012.

ROKHADE, A. P.; AGNIHOTRI, S. A.; SANGAMESH A. P.; MALLIKARJUNA, N.N.; KULKARNI, P.V.; AMINABHAVI,T.M. Semi-interpenetrating polymer network microspheres of gelatin and sodium carboximethyl cellulose for controlled release of ketorolac tromethamine. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 243-252, 2006.

RUIZ, J., MANTECÓN A., CÁDIZ V. Synthesis and properties of hydrogel from poly (vinylalcohol) and ethylenediaminetetraaceticdianhydride. **Polymer**, v.34, p.6347-6354, 2001.

SHAW, D. J. **Introdução à química dos colóides e de superfícies**. São Paulo: E. Blucher: Ed. Da USP, 1975.

SORVETES & CASQUINHAS. **Frozen yogurt: uma novidade que agradou**. São Paulo: Insumos, p. 34-39, 2012.

THIES, C. **How to make microcapsules**. Combined lecture and laboratory manual. Thies Technology, 1994.

TORALLES, Ricardo P.; et al. Determinação das constantes cinéticas de degradação do ácido ascórbico em purê de pêsego: efeito da temperatura e concentração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 18-23. 2008.

WALZEM, R. L. Functional Foods. **Trends in Food Science and Technology**. v. 15, p. 518, 2004.

WATTS, P. J.; DAVIES, M. C.; MELIA, C. D., Microencapsulation Using Emulsification/ Solvent Evaporation: An Overview of Techniques and Applications. **Critical Reviews Ther Drug Carrier Syst**. v. 7, n. 3, p. 235-259, 1990

WISE, D. L. **Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology**. New York: Marcel Dekker, 2000.

WEISBURGER, JH. Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. **Food Chemical Toxicology**, London, v.37, p.943-948, 1999.

ZHANG, X., HU Z., LI Y. **Polymer**, v.39, p. 2783, 1998.

ZHENG, C.-H.; GAO, J.-Q.; ZHANG, Y.-P.; LIANG, W.-Q. A protein delivery system: biodegradable alginate-chitosan-poly (lactic-co-glycolic acid) composite microspheres. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. P. 1321-1327, 2004.

ANEXO

ANEXO A: Ficha de avaliação utilizada para o Teste duo- trio.

Amostra:	Julgador:	Data:
<p>Você está recebendo uma amostra padrão (P) e duas amostras codificadas. Uma das amostras codificadas é igual ao padrão, faça um círculo nesta amostra.</p> <p>_____</p>		
Comentários:		

ANEXO B: Termo de consentimento livre e esclarecido na forma de convite para os provadores no teste de aceitação.

“Estudo sensorial de frozen *yogurt* com enriquecimento de vitamina C”

Prezado (a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa “ESTUDO SENSORIAL DE FROZEN YOGURT COM ENRIQUECIMENTO DE VITAMINA C”, do meu trabalho de conclusão de curso de graduação junto com a Coordenação dos Cursos de Tecnologia e Engenharia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, campus Campo Mourão. O objetivo da pesquisa é realizar uma avaliação sensorial de *frozen yogurt* funcional com adição de vitamina C microencapsulada. A sua participação é muito importante e você participará como integrante de uma equipe que irá degustar amostras de *frozen yogurt* com enriquecimento de vitamina C e será solicitado a dar sua opinião sobre o quanto gosta dos produtos. Os *frozen yogurt* funcionais foram preparados de forma similar aos normais, com adição da vitamina C encapsulada em microesferas no final da formulação. A análise sensorial levará em torno de 15 minutos, e você poderá fazê-la no horário que tiver maior disponibilidade. A ingestão de tal produto não trará nenhum risco à sua saúde por se tratar de um alimento seguro. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é voluntária, podendo recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo pessoal. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Os benefícios esperados são informação para a continuação de um estudo do *frozen* funcional sendo realizada por um grupo de pesquisa da UTFPR. Informamos que você não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa. Caso dúvidas ou necessite de esclarecimentos pode nos contatar (Prof^a. Dr^a Regiane da Silva Gonzalez,

COLIQ/UTFPR, mshimo@uel.br, (44) 9841527; Prof^a. Dr^a. Maria Josiane Sereia, COEAL/UTFPR, josiane@utfpr.edu.br, (44) 3518-1400), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro Integrado de Ensino Superior da Faculdade Integrado de Campo Mourão - CIES, ou no telefone (44)3518-2500. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Campo Mourão, ____ de _____ de 2014.

Pesquisadora Responsável: Letícia Misturini Rodrigues

RG: 9.146.968-5

_____ (nome por extenso do sujeito de pesquisa), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

ANEXO C: Número mínimo de respostas corretas necessárias para estabelecer diferença significativa entre as amostras ao nível de erro alfa (α) para o Teste Duo – trio para o correspondente número de julgadores (n)

Nº total de julgamentos	Níveis de probabilidade (α)						
	5%	4%	3%	2%	1%	0,5%	0,1%
7	7	7	7	7	7	-	-
8	7	7	8	8	8	8	-
9	8	8	8	8	9	9	-
10	9	9	9	9	10	10	10
11	9	9	10	10	10	11	11
12	10	10	10	10	11	11	12
13	10	11	11	11	12	12	13
14	11	11	11	12	12	13	13
15	12	12	12	12	13	13	14
16	12	12	13	13	14	14	15
17	13	13	13	14	14	15	16
18	13	14	14	14	15	15	16
19	14	14	15	15	15	16	17
20	15	15	15	16	16	17	18
21	15	15	16	16	17	17	18
22	16	16	16	17	17	18	19
23	16	17	17	17	18	19	20
24	17	17	18	18	19	19	20
25	18	18	18	19	19	20	21
26	18	18	19	19	20	20	22
27	19	19	19	20	20	21	22
28	19	20	20	20	21	22	23
29	20	20	21	21	22	22	24
30	20	21	21	22	22	23	24
31	21	21	22	22	23	24	25
32	22	22	22	23	24	24	26
33	22	23	23	23	24	25	26
34	23	23	23	24	25	25	27
35	23	24	24	25	25	26	27
36	24	24	25	25	26	27	28
37	24	25	25	26	26	27	29
38	25	25	26	26	27	28	29
39	26	26	26	27	28	28	30
40	26	27	27	27	28	29	30
41	27	27	27	28	29	30	31
42	27	28	28	29	29	30	32
43	28	28	29	29	30	31	32
44	28	29	29	30	31	31	33
45	29	29	30	30	31	32	34
46	30	30	30	31	32	33	34
47	30	30	31	31	32	33	35
48	31	31	31	32	33	34	36
50	32	32	33	34	34	35	37
60	37	38	38	39	40	41	43
70	43	43	44	45	46	47	49
80	48	49	49	50	51	52	55
90	54	54	55	56	57	58	61
100	59	60	60	61	63	64	66

Fonte: ABNT, NBR 13169, 1994.