

JEAN CLÓVIS BERTUOL DE SOUZA

**Viabilidade da adição de *Lactobacillus casei* com
proteção celular em sorvetes**

Londrina – PR

2010



Jean Clóvis Bertuol de Souza

**Viabilidade da adição de *Lactobacillus casei* com
proteção celular em sorvetes**

Dissertação apresentada à Universidade
Norte do Paraná para obtenção do título
de Mestre em Ciência e Tecnologia do
Leite

Orientadora: Prof. Dra. Kátia Sivieri

Londrina – PR

2010

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Katia Sivieri
(ORIENTADORA)**

**Profa. Dra. Raquel Guttierres Gomes
(MEMBRO)**

**Profa. Dra. Lina Casale Aragon Alegro
(MEMBRO)**

**Dedico a minha esposa Márcia e
aos meus queridos filhos Julio Cesar e
Ana Julia**

AGRADECIMENTOS

À universidade Norte do Paraná e ao Departamento de Ciência e Tecnologia do Leite, pela oportunidade de realizar o mestrado, pela acolhida e pelo apoio ao projeto.

A minha orientadora, Prof. Dra. Kátia Sivieri, pelos ensinamentos, paciência, dedicação, amizade e honrosa orientação.

Ao Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig, pelo incondicional apoio ao projeto.

A Prof. Dra. Marcela de Rezende Costa, pelo incentivo, amizade e os inúmeros ensinamentos.

A Prof. Dra. Christiane Maciel Vasconcellos Barros de Rensis, pela revisão na hora certa.

A Prof. Dra. Karla Bigetti Guergoletto, pela dedicação e apoio em todos os momentos deste desafio.

Aos colegas de curso Yassuo Curiaki e Wilmar Kruger D'Almeida, pela motivação em todos os momentos ao trilhar este árduo percurso.

Ao amigos e técnicos de laboratório Jorge Moraes Donato e Elaine Luvizoto, pelo suporte em todas as horas.

Sumário

Resumo geral -----	9
Abstract -----	10
CAPITULO 1	
Revisão Bibliográfica de Sorvete -----	12
Resumo – Abstrat -----	13
Introdução -----	14
Composição -----	16
Ingredientes -----	19
Processo de fabricação -----	22
Características de um sorvete ideal -----	26
Qualidade do produto -----	29
Viabilidade da adição de probióticos ao sorvete -----	30
Conclusão -----	33
Referências bibliográficas -----	33
Tabela 1 – Pressão aproximada de homogeneização para sorvetes com Diferentes teores de gordura -----	38
Tabela 2 – Vantagens e limitações de alguns ingredientes utilizados em sorvetes -----	39
CAPITULO 2	
Evaluation of the protective effects of trehalose and gum acacia on the survival of <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>Paracasei</i> (lc-1) during lyophilization -----	41
Abstract -----	42
Introduction -----	43
Materials and methods -----	43

Bacterial strain -----	43
Experimental design -----	44
Culture media -----	45
Growth conditions and lyophilization process -----	45
Determination of cellular viability -----	45
Results and discussion -----	45
Conclusion -----	47
Referências -----	48
Tabela – 1 – Variables trehalose and gum acacia: actual and coded Values -----	50
Tabela - 2 - Survival of <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>paracasei</i> (LC-1- values in CFU/g log) in culture media containing milk solids and different concentrations of trehalose and gum acacia, after lyophilization -----	50
Figura – 1 - Response surface plot obtained after lyophilization of <i>Lactobacillus. casei</i> subsp. <i>paracasei</i> suspended in a skim milk & whey medium, for the coded variables trehalose and gum acacia, with the viability of LC-1 expressed in log CFU/g as response. -----	51
CAPITULO 3	
Viabilidade da adição de <i>Lactobacillus casei</i> protegido com trealose e goma acácia em sorvetes -----	52
Resumo -----	52
Introdução -----	53
Materiais e métodos – Processamento do sorvete	
Ingredientes -----	53
Preparação do <i>Lactobacillus casei</i> -----	54
Proteção celular do <i>Lactobacillus casei</i> -----	54

Processamento do sorvete -----	55
Determinação da viabilidade celular -----	56
Análises físico-químicas -----	56
Análises físicas -----	56
Análise sensorial -----	57
Análise estatística -----	57
Resultado e discussão -----	57
Características físico-químicas do sorvete -----	57
Sobrevivência do <i>L. casei</i> livre e protegido em sorvetes -----	58
Avaliação sensorial -----	59
Conclusões -----	60
Referências -----	60
Figura 1 – Fluxograma do processamento do sorvete -----	65
Tabela 1 – Resultados médios da composição centesimal (%) -----	66
Figura 2 - Viabilidade do <i>L. casei</i> em sorvete durante 102 dias de armazenamento à -20°C. -----	66
Figura 3 - Histograma de frequência do atributo sabor de sorvetes controle, com adição de <i>L. casei</i> livre e protegido. -----	67
Figura 4. Histograma de frequência do atributo consistência de sorvetes controle, com adição de <i>L. casei</i> livre e protegido. -----	67
Figura 5. Histograma de frequência do atributo aparência de sorvetes controle, com adição de <i>L. casei</i> livre e protegido. -----	68
Figura 6. Frequência de aceitação dos sorvetes controle, com adição de <i>L. casei</i> livre e protegido. -----	68
Conclusão Geral -----	69

Resumo Geral

Os *Lactobacillus casei* são conhecidos pela suas propriedades probióticas, as quais apresentam efeitos benéficos ao consumidor, entre eles a melhoria e manutenção do equilíbrio intestinal. O sorvete é uma sobremesa láctea gelada, com características refrescantes e nutricionais, e com grande aceitação em todas as classes sociais e idades de consumidores. Este trabalho foi realizado em duas etapas, sendo a primeira a avaliação dos efeitos protetores da trehalose e goma acácia na sobrevivência de *Lactobacillus casei* durante processo de liofilização e na segunda foi avaliar a viabilidade da adição do *L. casei* com proteção celular (threalose e goma acácia) em sorvetes utilizando as melhores condições de threalose e goma acácia encontradas na etapa 1. As concentrações de 5% de trehalose e 4.5% de goma acácia apresentaram as maiores sobrevivências celulares após liofilização. A ASR (Análise de Superfície de Resposta) mostrou interação significativa ($P < 0.001$) entre os dois compostos, sendo que o efeito protetor foi maior quando os dois compostos foram utilizados juntos, comparado aos mesmos separadamente, indicando um forte potencial para uso na indústria de alimentos. Foram testadas três formulações em triplicata: (1) Sorvete sem adição de probiótico (controle); (2) Sorvete com adição do probiótico com proteção celular e (3) Sorvete com adição do probiótico sem proteção. Os sorvetes foram inicialmente caracterizados quanto a sua composição centesimal. Nos dias 0, 14, 28, 42, 63 e 102 dias de armazenamento do sorvete foram avaliadas a sobrevivência do microrganismo, utilizando contagens em meio Ágar MRS, e análises físico-químicas de pH e acidez. Após 15 dias de armazenamento foram realizadas análises sensoriais e de aceitação. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey, ambos ao nível de 5% de significância. No início do armazenamento foi observada contagem média de $10,17 \log \text{UFC.g}^{-1}$ para o *L.casei* livre e $9,77 \log \text{UFC.g}^{-1}$ para o *L. casei* protegido, porém após 102 dias de armazenamento à -20°C estes números diminuíram para $8,79$ e $8,14 \log \text{UFC.g}^{-1}$, respectivamente. A adição do *L.casei* livre ou protegido não afetou as características sensoriais do sorvete. A proteção celular demonstrou significativamente eficiente na adição de microrganismo probiótico em sorvete,

especificamente o *L. casei* protegido (goma acácia e trealose), sem alterações sensoriais.

Palavras chaves: *Lactobacillus casei*, probiótico, alimentos funcionais, sorvete e proteção celular.

ABSTRACT

Lactobacillus casei are known by their probiotic properties, which have beneficial effects for consumers, including improving and maintaining balanced intestinal tract. Ice cream is a frozen dairy dessert, with refreshing and nutritive characteristics, and great acceptance in every social classes and ages of consumers. This work was carried out in two phases: the protective effects of trehalose and gum acacia on the survival of *Lactobacillus casei* during lyophilization process were evaluated in the first one; and feasibility of adding *L. casei* with cell protection (threalose and acacia gum) in ice cream, with the best condition of acacia gum and threalose found in step 1, was evaluated in the phase two. The concentrations of 5% trehalose and 4.5% of acacia gum had the highest cell survival after freeze drying. RSA (Response Surface Analysis) showed a significant interaction ($P < 0.001$) between the two compounds, and the protective effect was greater when the two compounds were used together compared to them separately, indicating a strong potential for their use in the food industry. Three formulations were tested in triplicate: (1) ice cream without addition of probiotic (control), (2) ice cream with the addition of the probiotic with cell protection and (3) ice cream with the addition of unprotected probiotic. The ice creams were initially characterized for their composition. The microorganism survival, pH and acidity were evaluated on days 0, 14, 28, 42, 63 and 102 of storage. Sensory acceptance and purchase intent were analyzed on the 15th day of storage. The data were analyzed by ANOVA and Tukey's test, both at 5% significance level. The average count was 10.17 log CFU for unprotected *L. casei* and 9.77 log CFU for protected *L. casei* at the beginning of storage, but after 102 days at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ these values decreased to 8.79 and 8.14 log CFU, respectively. The addition of free or protected *L. casei* did not affect the sensory

characteristics of the ice cream. The cell protection showed significantly effect in the addition of probiotic microorganisms in ice cream, specifically the *L.casei* protected with gum acacia and trehalose, without sensory changes in the product.

CAPITULO 1

1. Revisão Bibliográfica

1.1. Introdução

Sorvete: composição, processamento e viabilidade da adição de probiótico

"Sorvete: composição, processamento, viabilidade da adição de probiótico"

Artigo aceito para publicação na revista Alimentos & Nutrição

Jean Clovis Bertuol de SOUZA*

Marcela de Rezende COSTA**

Christiane Maciel Vasconcellos Barros DE RENSIS***

Katia SIVIERI****

*Veterinário -Universidade Norte do Paraná- Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite- Avenida Paris n. 675- CEP 86041-140- Londrina-PR, Brasil.

** Veterinário -Universidade Norte do Paraná- Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite- Avenida Paris n. 675- CEP 86041-140- Londrina-PR, Brasil.

***Engenheira química -Universidade Norte do Paraná- Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite- Avenida Paris n. 675- CEP 86041-140- Londrina-PR, Brasil.

****Bióloga- Universidade Norte do Paraná- Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite- Avenida Paris n. 675- CEP 86041-140- Londrina-PR, Brasil. E-mail:katiasiv@hotmail.com

Resumo

Sorvetes são alimentos que incluem ingredientes de grande valor nutricional. O consumo *per capita* anual brasileiro ainda é pouco expressivo em relação a países nórdicos, mas o país tem potencial para aumentar significativamente esse mercado. Neste trabalho, são apresentados aspectos gerais sobre sorvetes, sua tecnologia de fabricação e função dos ingredientes. Também são abordados aspectos relacionados às inovações na área de sorvetes, especialmente a adição de substâncias prebióticas e microrganismos probióticos. A adição de novos ingredientes ao sorvete o torna um alimento ainda mais atrativo e com potencial para promover a saúde através de mecanismos não previstos na nutrição convencional.

Palavras chaves: gelados comestíveis, produtos funcionais, tecnologia de fabricação, ingredientes.

Abstract

Ice cream is a food that includes ingredients of great nutritional value. Its per capita annual consumption in Brazil is still little expressive in relation to the Nordic countries' one, but it has potential to increase significantly this market. General aspects about ice cream, its manufacturing technology and ingredients are presented in this review. Also, the innovations in the ice cream area, especially addition of prebiotic substances and probiotic microorganisms are discussed. The new ingredients addition in the ice cream turns it an even more attractive food and with potential to promote health through mechanisms not seen in the traditional nutrition.

Keywords: frozen desserts, functional foods, manufacture, ingredients.

Introdução

Muitos autores citam vários mitos sobre a história do sorvete relacionados com bebidas congeladas e gelo, que foram populares na Europa durante tempos medievais.^{43, 52, 65} Não existe uma descrição precisa, exceto que neve e gelo eram usados para resfriar e possibilitar congelamento de sobremesas. O sorvete chegou ao Brasil em 1834, quando dois comerciantes do Rio de Janeiro compraram gelo vindo dos Estados Unidos e fabricaram sorvetes com frutas tropicais. Atualmente, o mercado brasileiro de sorvetes está dividido entre os produtos industrializados e os fabricados em escala artesanal.⁵⁷

Mundialmente, o sorvete é um produto de boa aceitação sensorial, sendo que no Brasil há uma ótima perspectiva para seu crescimento comercial. Versátil e rico em opções, este mercado movimentou cerca de US\$ 1.378 milhões em 2008. Pelos dados da Associação Brasileira de Indústrias de Sorvetes, o consumo per capita em 2008 esteve na faixa de 4,98 litros de sorvete/ano por habitante, superando a média dos anos anteriores que se situava ao redor de 3,59 a 3,81 litros. Porém, esses números ainda ficam distantes da média per capita de alguns países, como os EUA, com 22,5; Canadá, com 17,80; Austrália, com 17,80; Itália, 8,20; e França, com 5,40 litros de sorvete/ano por habitante.^{2,7}

O sorvete é fabricado a partir de uma emulsão estabilizada, também chamada de calda, pasteurizada, que através de um processo de congelamento sob agitação contínua (batimento) e incorporação de ar, produz uma substância cremosa, suave e agradável ao paladar. Esta emulsão pode ser composta de produtos lácteos, água, gordura, açúcar, estabilizante, emulsificante, corante e aromatizante.^{46, 52} O sorvete também é rico em vitaminas A, B₁, B₂, B₆, C, D, E e K, cálcio, fósforo e outros minerais, sendo considerado um alimento completo e de alto valor do ponto de vista nutricional.⁵ A estrutura do sorvete, em seus principais aspectos, é semelhante à do creme chantilly e à do creme na fase intermediária de sua conversão em manteiga. A desestabilização do glóbulo de gordura, durante a batidura do preparado, no congelador, é vital para que este adquira uma boa estrutura.⁴⁶ O sorvete é um produto complexo, que contém muitos ingredientes em distintos estados. A gordura apresenta-se na forma de emulsão; proteína, estabilizantes e açúcares insolúveis apresentam-se na forma

de suspensão coloidal, e a lactose e sais em forma de dissolução verdadeira. A água se encontra no estado líquido como solvente de sais e açúcares, e na forma sólida como cristais de gelo.²³

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, resolução RDC nº. 266, sorvete ou gelado comestível é "um produto alimentício obtido a partir de uma emulsão de gordura e proteínas, com ou sem adição de outros ingredientes e substâncias, ou de uma mistura de água, açúcares e outros ingredientes e substâncias que tenham sido submetidas ao congelamento, em condições tais que garantam a conservação do produto no estado congelado ou parcialmente congelado, durante a armazenagem, o transporte e a entrega ao consumo".¹³

Segundo a legislação brasileira (ANVISA), portaria nº 379, de 26 de abril de 1999¹⁴, os gelados comestíveis podem ser classificados em:

- a) Sorvetes de massa ou cremosos - compostos basicamente de leite e derivados lácteos e/ou outras matérias-primas alimentares, nos quais os teores de gordura e/ou proteína são total ou parcialmente de origem não láctea, contendo no mínimo 3% de gordura e 2,5 % de proteínas, podendo ser adicionados outros ingredientes alimentares;
- b) *Sherbets* - são os produtos elaborados basicamente com leite e ou derivados lácteos e/ou outras matérias-primas alimentares e que contêm uma pequena porção de proteína e gordura, as quais podem ser total ou parcialmente de origem não láctea, contendo no mínimo 1% de gordura e 1 % de proteína;
- c) *Sorbets* - produto elaborado basicamente com polpa de fruta, sucos ou pedaços de frutas e açúcares;
- d) Picolés - são porções individuais de gelados comestíveis de várias composições, geralmente suportadas por uma haste, obtida por resfriamento até o congelamento da mistura homogênea ou não, de ingredientes alimentares, com ou sem batimento.

O sorvete deve ser mantido a uma temperatura máxima de armazenamento de -18°C, a qual deve ser medida no produto. Quando o produto é exposto à venda, é tolerada a temperatura de -12°C no produto.^{13,14}

Dentre as inovações encontradas em sorvetes pode-se destacar a adição de microrganismos probióticos e substâncias prebióticas. Segundo Carvalho⁴⁰ o sorvete pode ser um modo de resgate de probióticos na dieta humana, se apresentado como um veículo adequado para esse tipo de microrganismo. Alguns estudos têm demonstrado que é possível a produção de sorvete inoculado de probióticos ou mesmo na forma de iogurte congelado.

Este trabalho tem como objetivo realizar uma revisão na literatura publicada sobre a composição e processamento de sorvete, bem como apontar a viabilidade de adição de probióticos como uma inovação deste produto. Foi realizado uma pesquisa bibliográfica utilizando-se as bases de dados: Pubmed, Science Direct, Scielo, Highwire Press e periódicos Capes. Os descritores bibliográficos utilizados foram: sorvete, processamento, probiótico.

Composição

A composição do sorvete é bastante variada, normalmente apresentando de 8 a 20% de gordura, 8 a 15% de sólidos não gordurosos do leite, 13 a 20% de açúcar e 0 a 0,7% de emulsificante-estabilizante, porém pode haver variabilidade de acordo com a região e em diferentes mercados.⁵

O sorvete é uma excelente fonte de energia, devido principalmente ao seu alto conteúdo de carboidratos e gordura. As proteínas do leite representam de 34 a 36% de seus sólidos não gordurosos, e o sorvete contém elevada concentração de minerais e vitaminas, cujo conteúdo dependerá primariamente da quantidade de sólidos do leite utilizados na formulação.^{9,43}

As proteínas contribuem para o desenvolvimento da estrutura do sorvete, inclusive para emulsificação, aeração, desenvolvimento de corpo, além de apresentar propriedades funcionais tais como a interação com outros estabilizantes, estabilização da uma emulsão depois da homogeneização, contribuição para a formação da estrutura do gelado e capacidade de retenção de água.⁵ A capacidade de retenção de água das proteínas conduz à melhoria da viscosidade da mistura.³⁷ As proteínas também podem contribuir para o aumento do tempo de derretimento do sorvete e para redução de formação de gelo.²⁹

As principais proteínas encontradas no leite são as caseínas, proteína do soro (globulina e albumina) e proteínas das membranas dos glóbulos de gordura.⁵³ As proteínas devido aos grupos laterais hidrófobos que contém, formam parte da membrana que recobre os glóbulos de gordura, determinando com os estabilizantes e emulsificantes, as propriedades reológicas do gelado.^{3,38}

A caseína e as proteínas do soro têm importâncias diferenciadas. A caseína retém aproximadamente 3 gramas de água/grama comparada com a proteína do soro que retém 1 grama de água/grama.²³ Com o tratamento térmico ocorre o aumento da capacidade de retenção da água, fazendo com que a proteína do soro retenha quantidades próximas à da caseína.³ A retenção da água é importante, pois, quanto menor a quantidade de água livre no produto, menor será a quantidade e o tamanho dos cristais de gelo formados. A adsorção das proteínas aos glóbulos de gordura durante a homogeneização da mistura confere propriedades emulsificantes.^{28,29}

A presença de gordura no sorvete contribui para o desenvolvimento de uma textura suave e melhora o corpo do produto.^{3,23} A gordura láctea é o ingrediente de maior importância em sorvete e pode variar de 0 a 24%, dependendo de fatores como padrões legais, qualidade e preço.⁴³ Este ingrediente fornece energia, ácidos graxos essenciais, esteróis e interage com outros ingredientes desenvolvendo o sabor (transporta os sabores solúveis em gorduras, lubrifica a boca, confere cremosidade) e a estrutura.^{1,68}

A melhor fonte de gordura láctea é o creme de leite fresco, mas outras fontes podem ser utilizadas, como creme de leite congelado, manteiga, gordura láctea anidra, gordura láctea fracionada e misturas de leite concentrado.⁴⁴ O tipo de gordura, sua composição e ponto de fusão têm influência decisiva sobre as características organolépticas e estabilidade do sorvete durante sua conservação. A principal gordura utilizada na fabricação do sorvete em adição ou substituição da gordura láctea é a gordura vegetal hidrogenada, devido aos baixos teores de colesterol, plasticidade e bom preço. Outros tipos utilizados para fabricação do sorvete são a gordura de coco, de palma, de cacau, de algodão e de colza.⁴⁵

A diferença mais facilmente observada entre o sorvete de baixa ou elevada quantidade de gordura é a sensação de frio. Os sorvetes com baixos teores de

gordura parecem mais frios ao degustá-los, enquanto que os com altos teores de gordura reduzem a sensação bucal de frio, possuem alta sensação lubrificante na boca e são macios e cremosos.¹⁹ Estudos mostram que glóbulos de gordura concentrados na superfície das células de ar durante o congelamento do sorvete, principalmente de fonte láctea, melhoram o sabor.⁴³

Com o aumento da gordura no sorvete, os sólidos não gordurosos do leite (SNGL) devem ser diminuídos para se evitar a formação de arenosidade, que se deve a cristalização da lactose no sorvete.⁴⁵ Na prática, a quantidade de ar incorporada em relação ao volume do produto (*overrun*) define a área superficial do ar a ser recoberta pela gordura livre e pelos glóbulos isolados.⁴⁶

A lactose é o carboidrato do leite sendo que o seu poder adoçante e a sua solubilidade são menores quando comparados aos de outros açúcares. A lactose intervém na textura do sorvete, dá sabor doce, mas, como é pouco solúvel, quando está em excesso pode cristalizar e produzir alterações indesejáveis na textura. A 25°C, apenas 17,8 g de lactose é solúvel em 100 gramas de solução, e em determinadas condições pode cristalizar como grandes cristais levando o produto a uma textura arenosa, que produz uma desagradável sensação na boca ao degustar o sorvete.^{3,48} O leite em pó é rico em lactose, principalmente o leite em pó desnatado. Portanto, seu uso deve ser limitado devido aos defeitos que a lactose produz no sorvete. O açúcar mais comumente utilizado na elaboração de sorvetes é a sacarose, além da lactose já presente naturalmente no leite.⁶⁶

Os carboidratos, ao formarem solução com a água contribuem para a redução do ponto de congelamento da mistura. Sua presença contribui para o aumento da viscosidade, do tempo de batimento da mistura e da suavidade de textura, e tendem a aumentar a taxa de derretimento, além de influenciar no tamanho do cristal de lactose no produto.⁴⁶

Os sais minerais, além dos inerentes aos ingredientes utilizados na formulação do sorvete, são geralmente utilizados em quantidades limitadas (aproximadamente 0,1%). Este incremento visa alterar as propriedades de manipulação e aparência do produto.⁴⁵

Sais minerais são usados há muito tempo como neutralizantes da acidez. Certos sais são utilizados para ajudar a controlar a separação da gordura na

calda durante o processo de congelamento. Citratos e fosfatos têm efeito sobre as propriedades reológicas, contribuindo para o aspecto e consistência do produto final e sobre a estabilidade da emulsão. Esses sais são comumente utilizados, por exemplo, em sorvetes de chocolate, os quais normalmente são difíceis de congelar devido à baixa viscosidade da calda. A adição destes sais melhora as propriedades de batimento facilitando o congelamento.³ Fosfato de sódio e magnésio, óxido de cálcio e magnésio e bicarbonato de sódio tendem a promover o sabor, a textura e o corpo, melhorando, em geral, as características de produto final.⁵ O uso de sulfato de cálcio aumenta a acidez da mistura, produzindo maior viscosidade da calda e reduzindo a velocidade de derretimento do sorvete.⁴⁴

Ingredientes

A seleção de bons ingredientes e a manipulação adequada são fatores de suma importância no processamento bem sucedido de qualquer alimento, garantindo-lhe sabor limpo, fresco e palatabilidade adequada.³⁵ Os diferentes componentes utilizados na elaboração dos sorvetes, tais como, produtos lácteos, açúcar, estabilizante, emulsificante, gordura vegetal hidrogenada, aromatizante, e corante - exercem funções relativas à qualidade do produto, como corpo, textura, cremosidade, cor, aroma e sabor. Outros componentes também podem ser adicionados à calda e no produto final, como extrato de malte e pedaços de frutas, caracterizando assim, o sabor final do sorvete.⁴⁶

Os sólidos não gordurosos do leite (SNGL) contribuem para o sabor lácteo, corpo, mastigabilidade e textura, além da capacidade de formação das bolhas de ar. Os açúcares, além de conferirem sabor doce, são determinantes para o ponto de congelamento, para textura e para a palatabilidade do produto. Embora cada um dos ingredientes mencionados tenha uma função específica, dependendo da fonte que são obtidos e do processo de fabricação, podem perder parcialmente sua funcionalidade e por isso utilizam-se outros ingredientes para compensar esta perda ou até mesmo melhorar os atributos do produto original.³⁵

Entre os produtos lácteos utilizados destacam-se creme de leite, manteiga, leite, soro de leite, caseína e caseinato. Os produtos não lácteos mais utilizados

são carboidratos, estabilizantes, emulsificantes, essências e corantes, entretanto, outros ingredientes tais como amidos, ovos ou derivados também podem ser adicionados¹⁷. A composição do sorvete interfere nas suas características físicas, pois está relacionada com o processo, que influenciará diretamente com o estado de agregação dos glóbulos de gordura, com a quantidade de ar incorporada, com o tamanho das bolhas de ar, com a viscosidade da fase aquosa e o tamanho e estado de agregação dos cristais de gelo.²²

Água, a fase contínua, está presente como um líquido, um sólido e uma mistura dos dois estados físicos. O ar encontra-se disperso através da emulsão gordura-matriz. A manutenção da quantidade uniforme de ar e sua qualidade são essenciais no controle da boa qualidade do sorvete. A quantidade de ar no sorvete deve obedecer aos padrões regulamentados na legislação brasileira e é importante devido a sua influência na qualidade do produto final, ao qual confere maciez. A interface entre ar e material disperso na fase aquosa é estabilizada por um filme fino de material não congelado e glóbulos de gordura parcialmente misturados.⁴⁵

Os estabilizantes, também chamados de espessantes, aglutinantes e hidrocolóides, são compostos macromoleculares que se hidratam intensamente em água e formam soluções coloidais, controlando, assim, a movimentação da água, devido à formação de pontes de hidrogênio e à formação de uma rede tridimensional que impede a mobilidade da água.^{23,64}

Estabilizantes são usados em pequenas quantidades (0,1 - 0,5%) na mistura de sorvete conferindo uniformidade e maciez ao corpo do produto. A utilização dos estabilizantes no sorvete tem por objetivo evitar o crescimento de cristais de gelo e de lactose, e a recristalização, causada pelas flutuações de temperatura durante sua conservação.^{44,61} Os estabilizantes também melhoram as propriedades de batimento, aumentam a viscosidade da calda, contribuem para o melhoramento do corpo e textura do produto final, melhoram as propriedades de derretimento, evitam a separação do soro, facilitam a incorporação e a distribuição de ar durante a fabricação do sorvete, promovem melhor estabilidade durante o armazenamento e não têm efeito no ponto de congelamento.^{5, 64, 66}

Os tipos de estabilizantes mais utilizados pelas indústrias de gelados são: goma guar, alginato de sódio, carragena e carboximetilcelulose. O comportamento dos estabilizantes é função da temperatura, pH e concentração de cada estabilizante. Por exemplo, carboximetilcelulose é bastante estável à ação do calor e tem propensão para se combinar com proteínas do leite a temperatura mais elevada, formando complexos que tendem a desmoronar durante o armazenamento do sorvete. A combinação deste estabilizante com a carragena minimiza o problema do desmoronamento.⁴⁶

Os emulsificantes são substâncias químicas com uma parte da molécula hidrofóbica e outra hidrofílica, que possibilitam a formação de uma emulsão reduzindo a tensão superficial. No sorvete existem dois tipos de emulsão: uma emulsão gordura em água e uma emulsão ar em calda, parcialmente congelada⁶⁴.

No sorvete, os emulsificantes são usados para promover a uniformidade durante o batimento, reduzir o tempo de batimento da calda, controlar a aglomeração e o reagrupamento da gordura durante a etapa de congelamento (estabiliza a emulsão de gordura) e facilitar a distribuição das bolhas de ar, produzindo um sorvete com corpo e textura cremosa típica. Os emulsificantes também reduzem os efeitos negativos causados pela flutuação da temperatura e aumentam a resistência ao derretimento^{5,46}. Isto tudo é consequência do aumento da rigidez da membrana que rodeia os glóbulos de gordura e da formação de uma rede mais sólida ao redor das bolhas de ar. O uso excessivo de emulsificante pode resultar em derretimento muito lento e alterações nas características desejáveis de corpo e textura^{44,45}. Mono e diglicerídeos e monoestearato de sorbitana são os emulsificantes mais utilizados para a fabricação de sorvete^{46, 64}.

Os corantes e aromatizantes são colocados para intensificar as propriedades de cor, aroma e sabor do alimento. Estas substâncias podem ser naturais ou artificiais. As essências têm duas características importantes: tipo e intensidade. Geralmente essências de sabores pouco intensos são mais facilmente misturadas e tendem a não ser rejeitadas em altas concentrações⁴⁵.

Os sólidos de gema de ovo são de alto valor alimentício, aumentam a viscosidade, conferem corpo e textura, e quase não influenciam o ponto de congelamento, mas usualmente aumentam o custo do sorvete.⁴⁴

Ingredientes como frutas, castanhas, mel, diferentes fontes fornecedoras ou substituintes de gordura (gordura vegetal hidrogenada, soro de leite), sais minerais, entre outros podem ser ainda utilizados. Um dos objetivos em modificar as formulações do sorvete é produzir um produto com textura desejável através da melhoria da estrutura física do sorvete.⁵⁹

Processo de fabricação

Para obtenção de um bom sorvete é importante que se utilize ingredientes de boa qualidade e que haja um correto balanceamento entre os componentes, tais como, a quantidade de sólidos totais, gordura, açúcar, estabilizante, emulsificante e aromatizantes.⁴⁵

Algumas características da mistura que merecem consideração são: custo, propriedades de manipulação (incluindo viscosidade, ponto de congelamento e taxa de aeração), sabor, corpo, textura, valor nutritivo, cor, e palatabilidade. A mistura de sorvete representa um complexo sistema coloidal, onde algumas substâncias ocorrem em solução (os açúcares e os sais), outras em suspensões coloidais (caseínas, estabilizantes e alguns fosfatos de cálcio e magnésio), e os glóbulos de gordura em emulsão. Uma vez que os requisitos de composição relacionados com qualidade e quantidade estejam definidos, a mistura estará pronta para o processamento.⁴⁵

No processamento dos gelados comestíveis, a pasteurização é uma etapa obrigatória. Após esta fase, várias etapas são envolvidas no processo de fabricação do sorvete: a) a homogeneização da mistura que tem como objetivo reduzir o tamanho dos glóbulos de gordura da emulsão; b) a maturação da calda homogeneizada onde são adicionados aromatizantes, polpas de frutas, emulsificantes, acidulantes; c) congelamento e batimento da calda, onde ocorre a incorporação de ar, formação de cristais e aparecimento de uma fase não congelada.⁵⁸

A pasteurização tem por objetivo eliminar todos os microrganismos patogênicos do leite, garantindo assim a qualidade microbiológica do produto. Pela legislação brasileira¹³, os gelados e os preparados para gelados comestíveis, elaborados com produtos lácteos ou ovos devem ser pasteurizados a 70°C por 30 minutos quando o processo for de batelada e a 80°C por 25 segundos quando o processo for contínuo, ou utilizar condições equivalentes de tempo e temperatura no que se refere ao poder de destruição de microrganismos patogênicos. O binômio tempo e temperatura são mais elevados quando comparado aos utilizados no leite fluído, pois à adição dos ingredientes principalmente o açúcar e a gordura, dificultam a transferência de calor e fornecem uma capa protetora aos microrganismos.⁶⁶

Além de eliminar os microrganismos patogênicos, o tratamento térmico produz a fusão dos emulsificantes e ativa os estabilizantes em solução coloidal, melhorando também o efeito das proteínas do soro. Ao desnaturar a proteína do soro, a parte lipofílica da molécula que se encontra no interior da estrutura é quebrada. Nestas condições, as proteínas do soro reduzem a tensão interfacial gordura/água, agindo assim como agentes emulsificantes. A pasteurização também modifica a capacidade de retenção de água da proteína do soro, aumentando cerca de três vezes seu valor, o qual alcança números similares aos da caseína. A desnaturação protéica tem efeito positivo sobre a qualidade do sorvete, levando a um produto mais cremoso, com textura e consistência mais suaves e uniformes. Porém, o que limita as condições de tempo/temperatura mais severas são as alterações de sabor e aroma (principalmente sabor de cozido).^{23, 66}

A homogeneização tem por finalidade diminuir o tamanho dos glóbulos de gordura, reduzindo-os aproximadamente dez vezes e aumentando a superfície total em aproximadamente 100 vezes, o que favorece a formação de um produto mais homogêneo, cremoso e facilitando a ação dos agentes emulsificantes e estabilizantes sobre a superfície das partículas.⁴⁷

Os homogeneizadores são bombas de êmbolo que movimentam uma quantidade constante de líquido, através de orifícios muito finos de uma ou duas

válvulas.^{30,31,45} A etapa da homogeneização depende de vários fatores, tais como:

a. Temperatura - a eficiência da homogeneização melhora quando a calda é homogeneizada a uma temperatura entre 70 e 80°C, porque a mobilidade dos componentes com certa tensão superficial é maior quanto mais alta for a temperatura.^{3,23} É importante observar que, quando a pasteurização se processa a temperaturas acima de 76°C em sistema de batelada, é conveniente que se esfrie a calda a 65°C para reduzir a intensidade do sabor de queimado, especialmente quando a homogeneização não se completa em 30 minutos.⁸

b. Pressão do homogeneizador - a pressão deve ser suficiente para se obter um produto de qualidade. A utilização de pressão excessiva no processo tende a aglomerar as moléculas de gordura, enquanto que uma pressão insuficiente impossibilita a obtenção de uma boa dispersão da matéria gordurosa.²³

c. Teor de gordura - quando o teor de gordura é muito elevado, os glóbulos tornam-se menores durante o processo de homogeneização e tendem a agrupar-se antes que uma nova membrana tenha tempo de formar-se na superfície. Também, a forte pressão eleva a temperatura produzindo a desnaturação das aglutininas, o que favorece a coalescência dos glóbulos. Assim, utiliza-se o processo de homogeneização em dois estágios, de modo que o segundo estágio desfaz os grumos que se formam na primeira fase, dando tempo para a formação de uma nova membrana, impedindo a coalescência dos pequenos glóbulos.^{3,46} Em geral, utilizam-se pressões de 2.000 a 2.500 lb para o primeiro estágio e 500 lb para o segundo estágio (Tabela 1). Para misturas de chocolate, a pressão pode ser reduzida para 1500 a 2000 lb para o primeiro estágio, devido ao elevado conteúdo de gordura presente neste componente.^{23,28}

d. Composição da calda - a eficiência da homogeneização dependerá do teor de gordura adicionado. Quanto menor o teor de gordura, maior deverá ser a pressão, e vice versa.

A calda pasteurizada deverá ser resfriada rapidamente a temperatura de 7 a 10°C e transferida às tinas de maturação, onde permanece à temperatura de 3-5°C. O resfriamento pode ser realizado na própria cuba de pasteurização, introduzindo água fria, ou, passando a calda em um trocador a placas. O objetivo do resfriamento é evitar o crescimento de microrganismos.⁴⁶

A maturação consiste em manter a calda por um período de no mínimo 4 horas, à temperatura de 2 a 5°C antes de congelá-la. Durante este espaço de tempo ocorrem mudanças benéficas na calda como, por exemplo, uma completa hidratação das proteínas e estabilizantes, dessorção da proteína na superfície do glóbulo de gordura e cristalização das moléculas de gordura. Contribui-se assim para o aumento da viscosidade, uma melhor absorção do ar durante seu batimento e congelamento e o aumento da resistência ao derretimento do sorvete.^{3,23,41,46} A maturação pode chegar a 24 horas, porém devem ser evitados períodos muito longos, para que não se produzam alterações por microrganismos psicotróficos.⁶⁶

Após a maturação, a calda é transferida para a máquina produtora de sorvete (sorveteira). No comércio, existem dois tipos fundamentais de congeladores: os descontínuos (horizontal e vertical) e os contínuos (horizontal). As cubas de congelamento descontínuas são utilizadas para o processo artesanal ou em baixa escala, enquanto que os congeladores contínuos são utilizados para fabricação em escala industrial. As propriedades do sorvete são diferentes segundo o tipo de congelador utilizado. O processo de congelamento mais rápido em equipamentos horizontais contínuos, onde 50% da água congela em poucos minutos, forma grande quantidade de pequenos cristais de gelo, levando a obtenção de uma textura suave. O sorvete deve sair da sorveteira a uma temperatura de -6 °C.⁶⁶

A quantidade de ar incorporada também é diferente para os dois sistemas. A incorporação do ar é chamada de *overrun*, usualmente definido como o aumento do volume do sorvete obtido a partir de um volume inicial de calda, e é expressa em porcentagem de *overrun*. Este aumento de volume é composto principalmente do ar incorporado durante o processo de congelamento. A quantidade de ar incorporada depende da composição da calda e de

propriedades do processamento, obtendo-se características adequadas de corpo, textura e palatabilidade necessárias ao sorvete.⁴⁰

O controle do *overrun* é muito importante para obtenção de um produto padronizado, de acordo com os dados especificados no rótulo como composição nutricional e peso da embalagem; além disso, para obter-se a rentabilidade do produto que caracteriza o perfil de manufatura. Em congeladores descontínuos, o ar é simplesmente incorporado por agitação no interior da calda à pressão atmosférica; obtém-se um *overrun* de 50 a 100%; nos congeladores contínuos o ar é incorporado a uma determinada pressão determinada pelo equipamento e posteriormente se expande produzindo um grande número de pequenas células de ar; neste sistema consegue-se um *overrun* de 130% ou mais.⁶⁶

Na saída da sorveteira, o sorvete é envasado, sendo que o processo de congelamento continua, e é conhecido como endurecimento. O endurecimento é feito em câmaras de congelamento à temperatura de -20 a -30°C. Nestas câmaras, o teor de água congelada do sorvete chega de 80% a 90%. O ideal é que o endurecimento seja o mais rápido possível, para se evitar a formação de grandes cristais de gelo.^{2,3}

Características de um sorvete ideal

Um produto ideal deve apresentar características esperadas pelo consumidor e pelo fabricante, quanto aos seguintes atributos de qualidade: sabor, corpo, textura, características de derretimento, cor, embalagem, conteúdo microbiológico e composição. O sorvete ideal deve possuir um sabor típico, fresco, agradável e delicado; ter textura definida e macia; possuir resistência moderada; derreter lentamente em forma de líquido com a aparência da mistura original (sem separações de fase); ter uma cor natural; possuir partículas regularmente distribuídas; e ter contagem bacteriana baixa. Ainda, o produto deve ter as especificações de composição coerentes com o nome e os ingredientes e valores nutricionais identificados no rótulo.⁴⁵

A avaliação sensorial para verificação da aceitação pelos consumidores é crítica para o desenvolvimento de produtos. O sorvete oferece uma combinação

de propriedades sensoriais altamente desejáveis, sendo estas classificadas em atributos como o de aparência, cor, maciez, regularidade, aroma, sabor e textura/preenchimento bucal (dureza, viscosidade, cremosidade).³⁸ Uma importante característica do sorvete está relacionada com a aparência do produto, ou seja, ele deve apresentar uma textura macia, porém, não pegajoso e o preenchimento bucal que não poderá ser muito viscoso.⁶⁸

Testes sensoriais analíticos, como os de diferença e análises descritivas podem ser usados para obtenção de informações qualitativas e quantitativas sobre propriedades sensoriais da sobremesa congelada. As medições instrumentais de propriedades sensoriais são geralmente usadas como um complemento para os testes analíticos sensoriais. Os testes afetivos ou de preferência, aplicados em consumidores em potencial, são indicados para avaliar a aceitação do produto. A alta palatabilidade do sorvete é um fator importante em sua escolha enquanto alimento. A textura suave e aveludada amacia o palato.⁴⁵

Vários passos no processo de fabricação do sorvete, incluindo pasteurização, homogenização, maturação, congelamento e armazenamento contribuem para o desenvolvimento da estrutura e, assim, da qualidade sensorial final do sorvete.^{30,31}

O sorvete tem uma estrutura complexa, tratando-se tanto de uma emulsão óleo-em-água (muito desta água e deste óleo encontrando-se em estado cristalino) como de uma espuma com grande quantidade de gordura.¹⁵ Assim, a qualidade do sorvete dependerá bastante de sua estrutura, que pode ser dividida em aspectos coloidais (gordura e ar) e aspectos de cristalização do gelo, e também do efeito do maior congelamento de solutos e macromoléculas dispersas.³⁰

A estrutura física do sorvete é um sistema físico-químico complicado composto por 50% de bolhas de ar, 25% de cristais de gelo, 5% de glóbulos de gordura e o restante de 20% de matriz composta de açúcares, proteínas e estabilizantes.³¹ Os cristais de gelo e bolhas de ar formam uma dispersão mais grosseira que os glóbulos de gordura.^{15,16} O produto, portanto, é caracterizado fisicamente pelo tamanho e fração volumétrica dos vários elementos estruturais.⁶⁸

A fase mais fluída do sorvete, chamada matriz, circunda os cristais de gelo e as bolhas de ar e resulta de um processo de concentração por congelamento.⁹ A matriz contém grande parte das proteínas presentes na formulação, mas estas se adsorvem nas superfícies das gotas de óleo e células de ar contribuindo, assim, mais para as propriedades destas do que para as propriedades da matriz.¹⁷

A estrutura determina a aparência, viscosidade e consistência, incluindo o preenchimento bucal.⁶⁸ Os aspectos estruturais associados com a aglomeração da gordura têm grande influência sobre o comportamento reológico e de derretimento, ou seja, um aumento no grau de aglomeração da gordura reduz a taxa de derretimento e aumenta a viscosidade.⁶³ A aglomeração dos glóbulos de gordura ocorre principalmente durante a agitação e é resultado do processo chamado de coalescência parcial (ocorrido com glóbulos de gordura contendo uma rede sólida de cristais de gordura). A rede de cristais no glóbulo previne a coalescência completa em bolhas maiores, formando apenas amontoados de formas irregulares.⁶³

Do ponto de vista da reologia a estrutura do sorvete consiste em uma bolha sólida, dentro da qual proteínas e emulsificantes formam uma rígida membrana que circunda os glóbulos de gordura.³⁹ O exame da microestrutura do sorvete é complicado devido ao seu alto conteúdo de água e gordura, e a alta dependência de sua estrutura com a temperatura.¹⁵

A informação sobre tamanhos de cristais de gelo e bolhas de ar e suas distribuições, obtidas da observação das amostras intactas, é importante para a compreensão das propriedades sensoriais do sorvete.¹⁶ Este estudo pode ser possível por microscopia óptica de luz ou microscopia eletrônica.¹⁵

As propriedades de derretimento do sorvete constituem um parâmetro de comportamento crítico para o produto.⁶³ Um sorvete de alta qualidade deve mostrar resistência limitada ao derretimento quando exposto a temperatura ambiente por tempo determinado. Quando o derretimento esperado não ocorre, esse defeito está relacionado com uso excessivo de estabilizantes/emulsificantes, *overrun* muito alto ou ainda processamentos severos e interações entre os componentes que promovem formação de gel altamente estável.¹¹ Uma

correlação adequada entre a instabilidade da emulsão e "secura" do produto fornece um sorvete com boa resistência para uma sensação palatal cremosa.³⁹

Certa consistência também deve ser mantida quando os cristais de gelo derretem de forma a ocorrer uma "retenção de forma".⁶⁸ O produto do derretimento deve ser uma massa líquida, homogênea e uniforme. A não homogeneidade pode ser identificada pela presença de coágulos, escumas, bolhas de ar de tamanhos grandes e/ou variados, ou ainda pela separação de fases. Sorvetes contendo alta concentração de proteína em água são geralmente menos estáveis, nesse aspecto, que similares com menor concentração protéica.¹¹

Qualidade do produto

A qualidade do sorvete é determinada pelo tamanho e distribuição dos glóbulos de gordura não emulsificados, cristais de gelo, células de ar e porções não congeladas que ocorrem na mistura de sorvete.³⁹ Um certo nível de viscosidade é necessário para a aeração e retenção de ar desejáveis no sorvete congelado⁴⁵, mas para atingir a viscosidade desejada a mistura deve ser propriamente balanceada em composição, concentração e qualidade dos ingredientes então adequadamente processados.⁵⁰

Os defeitos são resultantes da carência em sabor, corpo, textura, características de derretimento, cor, embalagem, conteúdo microbiano e/ou composição¹¹. Textura áspera é o defeito mais freqüentemente citado em sorvetes. Quando este defeito torna-se pronunciado, uma sensação bucal de arenosidade ou gelo é seguida pela sensação de "muito gelado" causada pelos cristais de gelo excessivamente grandes.⁵⁰

O sorvete de consistência defeituosa pode ser grumoso, pegajoso ou pesado. Estes defeitos aparecem devido à calda mal equilibrada, ingredientes cujas propriedades funcionais tenham sido modificadas ou processo de fabricação inadequado.³

Defeitos como sabor rançoso ou coloração desigual não podem ser corrigidos pela mudança nas concentrações dos constituintes, pois decorrem de

problemas com a matéria-prima, processamento ou armazenamento.¹¹ Entretanto, outros defeitos como falta de sabor (concentração insuficiente de essência), falta maciez (insuficiência de gordura), arenosidade (concentração muito alta de lactose), ou produto pouco encorpado (baixo conteúdo de sólidos totais ou uso de pouco estabilizante), podem ser corrigidos através da alteração da composição da mistura.⁴⁵

O uso excessivo de SNGL ou de sólidos de soro de leite, comentado no próximo item, resultará em problemas de sabor usualmente descritos como "cozido" ou "empoados", e pode também levar a uma condição de arenosidade do sorvete final devido a cristalização da lactose.¹¹ Na Tabela 2 pode-se observar um resumo das vantagens e desvantagens da adição de alguns constituintes utilizados na elaboração do sorvete.

Viabilidade da adição de probióticos ao sorvete

O desenvolvimento de novos produtos alimentícios torna-se cada vez mais desafiador, à medida que procura atender à demanda dos consumidores por produtos que, concomitantemente, sejam saudáveis e atrativos.⁵¹

Poucos produtos probióticos podem ser encontrados no mercado brasileiro. Os probióticos carregam na forma viável, bactérias de origem intestinal humana (ou animal) com finalidade principal de repor a microbiota intestinal que foi de algum modo, desbalanceada por tratamentos com antibióticos, quimioterapia, radioterapia ou por situações de estresse.⁶² A sobrevivência do probiótico no intestino está relacionada com a capacidade de resistir aos mecanismos antibacterianos. As principais características de um alimento probiótico são: conter um número suficiente de microrganismos capazes de sobreviver e aderir à mucosa intestinal; e capacidade dos microrganismos de resistirem a valores baixos de pH, aos sais biliares e aos fatores antimicrobianos existentes no trato gastrointestinal.^{25,27,49}

Os probióticos possuem potencial para promover a saúde através de mecanismos não previstos na nutrição convencional, devendo ser salientado que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura de doenças.⁵¹ Eles

eram classicamente definidos como 'suplementos alimentares à base de microrganismos vivos que afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o balanço de sua microbiota intestinal.²⁶ Atualmente são definidos como microrganismos vivos que quando administrados de forma adequada conferem efeitos benéficos a saúde dos consumidores.²⁴ Existem vários aspectos benéficos à saúde atribuídos a ingestão de probióticos, sendo alguns destes já comprovados e outros requerem mais estudos, principalmente em humanos. Alguns dos aspectos benéficos relatados são: atividade anti-microbiana, prevenção e tratamento a diarreias, diminuição dos sintomas causados pela intolerância a lactose, efeito anti-mutagênico e atividade anti-carcinogênica, e estimulação do sistema imune.^{54,55,56}

As bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus* são as mais frequentemente empregadas como suplementos probióticos em alimentos, uma vez que elas têm sido isoladas de todas as porções do trato gastrointestinal do humano saudável. O intestino delgado e o cólon são os locais preferenciais para a colonização intestinal dos *Lactobacillus*, bifidobactérias e do *Enterococcus faecium*.^{10,18}

Lactobacilos podem colaborar na digestão da lactose em indivíduos com intolerância a esse dissacarídeo, reduzir a constipação e a diarreia infantil, ajudar na resistência a infecções por salmonela, prevenir a "diarreia do viajante" e aliviar a síndrome do intestino irritável.⁴² O propósito da administração de produtos probióticos é resultar em uma microbiota intestinal balanceada e, conseqüentemente, ter um impacto favorável sobre a saúde do consumidor.⁶⁰

Para se obter o máximo benefício dos probióticos é necessário que os mesmos estejam viáveis e disponíveis em concentrações superiores a 10^6 UFC/g.²¹ No Brasil, a AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA¹² sugere que os produtos contendo probióticos prontos para o consumo e consumidos diariamente devem possuir de 10^6 a 10^7 UFC. Entretanto, segundo a Federação Internacional de Leite (IDF) deve-se conter no mínimo 10^7 UFC/g no produto.^{21, 32, 34}

As bactérias probióticas utilizadas em escala industrial devem ser apropriadas para cada tipo de produto e manter-se com boa viabilidade durante o

armazenamento. Esses pré-requisitos representam desafios tecnológicos significantes, uma vez que muitas bactérias probióticas são sensíveis à exposição a oxigênio, calor e pH ácidos. Os alimentos mais utilizados como veículos para os microrganismos probióticos são os produtos lácteos fermentados.⁶⁰ Entretanto, novos produtos contendo microrganismos probióticos vêm sendo introduzidos no mercado internacional, tais como: sobremesas lácteas, leite em pó para a alimentação infantil, sorvetes, vários tipos de queijos, produtos em forma de cápsulas e alimentos fermentados de origem vegetal.^{20, 26}

O sorvete pode ser uma alternativa de inclusão de probióticos na dieta humana, se apresentado como um veículo adequado para esse tipo de microrganismo. Alguns estudos têm demonstrado que é possível a produção de sorvete inoculado, tipo iogurte congelado.⁴⁰

Segundo Cruz et al.²⁰ a incorporação de bactérias probióticas na formulação do sorvete não afeta a qualidade global do produto quando comparado com um sorvete convencional.

A viabilidade de probiótico numa matriz alimentícia depende de muitos fatores, como o tipo de cultura que será adicionada no produto, interação com outros microrganismos existentes no alimento, produção de hidróxido de hidrogênio durante o metabolismo bacteriano e acidez final do produto.⁶⁷

De acordo com Cruz et al.²⁰ estão sendo realizados muitos estudos em vários países, sendo que os resultados demonstram que as culturas probióticas são capazes de se manterem viáveis durante o processamento de sorvetes. Segundo Andrighetto & Gomes⁴, o sorvete adicionado de *Lactobacillus acidophilus* pode ser armazenado durante 60 dias, a -25°C , sem ter suas características sensoriais e microbiológicas alteradas. No estudo, o sorvete apresentou uma contagem de $8,3 \times 10^7$ ufc/g após 60 dias de armazenamento. Kebary et al.³⁶ demonstraram que o *Bifidobacterium ssp* conseguiu alta sobrevivência em *frozen yogurts* adicionados de alginatos. Shah & Ravula⁵⁵ reportaram que a sobrevivência de bactérias em sorvetes pode ser otimizada utilizando processos de encapsulação. De acordo com a Hamayoni et al.³³ com a utilização de processos de encapsulação de *Lactobacillus casei* foi observada uma sobrevivência de 10^8 a 10^9 UFC/g no final da vida de prateleira do sorvete.

De acordo com Cruz et al.²⁰ os sorvetes são produtos alimentícios que vem demonstrando grande potencial de ser utilizados como culturas probióticas, com uma vantagem de ser um produto de alta aceitabilidade em todas as faixas etárias

Conclusão

O sorvete é um alimento consumido praticamente no mundo inteiro e seu mercado movimentava o equivalente a bilhões de dólares anualmente. Portanto, trata-se de uma área de grande interesse para as indústrias de alimentos. Essas empresas têm buscado a inovação em produtos e processos tanto para ampliar sua abrangência de mercado como para atender as expectativas do consumidor, o qual vem se preocupando cada vez mais com a qualidade sensorial e nutricional dos produtos que consome. Desta forma, a indústria de sorvetes vem evoluindo nos últimos anos e apresentando ao consumidor produtos com características diferenciadas. Uma área ainda com grande potencial de desenvolvimento é a produção de sorvetes explorando a relação entre o consumo de determinados ingredientes com fatores promotores de saúde e/ou a redução de fatores de risco para determinadas doenças, como a adição de microrganismos probióticos.

Referências Bibliográficas

1. AKOH, J. Fats, oils and fat replacers. **Food Technol.**, v.52, n.3, p.47-53, 1998.
2. ALMEIDA, R.C.C; MATOS, C.O; ALMEIDA, P.F. Implementation of a HACCP system for on-site hospital preparation on infant formula. **Food Control.**, v.10, n.3, p. 181-187, 1999.
3. AMIOT, J. **Ciência y tecnología de la leche**. Zaragoza: Acribia; 1991.547p.
4. ANDRIGHETTO, C; GOMES, M.I.F.V. Produção de picolés utilizando leite acidófilo. **Brazilian J. Food Technol.**, v.6, n.2, p. 267-271, 2003.
5. ARBUCKLE, WS. **Ice cream**. 3ed. Westport: AVI Publ. Co.; 1977. 517p
6. ARVANITOYANNIS, I.S; HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, M.V. Functional foods: a survey of health, claims, pros and cons, and current legislation. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.45, p. 385-404, 2005.

7. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIAS DE SORVETES; 2008. Acesso em: 19 Mai. 2009. Disponível em <<http://www.abis.com.br/estat.asp>>
8. BEATTIE, K. 2004. Technical fact sheet No.5 -Manufacturing. Ice Cream Alliance, UK. Acesso em 10 jan. 2009. Disponível em: <http://www.ice-cream.org/UPLOAD/ICAFACTSHEET5.PDF>. Accessed Nov. 20. 2006
9. BERGER, K.G. Ice cream. In: LARSSON K; FRIBERG S. Food emulsions. 2. ed. New York: Marcel Dekker; 1997. p. 413-489.
10. BIELECKA, M; BIEDRZYCKA, E; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Res. Int.**, v.35, n.2/3, p.125-131, 2002.
11. BODYFELT, F.W; TOBIAS, J; TROUT, G.M. Sensory evaluation of ice cream and related products. In: The sensory evaluation of dairy products. New York: Library of Congress Cataloging-in-Publication Data; 1988. p. 166-226.
12. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RCD n. 2, de 07 de janeiro de 2002. Acesso em 4 jun. 2009. Disponível em: [http:// www.anvisa.org.br](http://www.anvisa.org.br).
13. BRASIL. Portaria nº 379, de 26 de abril de 1999. Aprova o regulamento técnico referente a gelados comestíveis, preparados, pós para o preparo e bases para gelados comestíveis. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 29 abr. 1999. Acesso em 4 jun. 2009. Disponível em: <[http:// www.anvisa.org.br](http://www.anvisa.org.br).
14. BRASIL. Resolução n.º 266, 22 set. 2005. Regulamento técnico para gelados comestíveis e preparados para gelados comestíveis. Diário Oficial da União, 23 set. 2005. Seção 1. Acesso em 4 jun. 2009. Disponível em: <[http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/ public /showAct.php?id=18825&word=](http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18825&word=)
15. CALDWELL, K.B; GOFF, H.D; STANLEY, D.W. A low temperature scanning electron microscopy study of ice cream. I. Techniques and general microstructure. **Food Struct.**,v.11, n.1, p.1-9, 1992.
16. CALDWELL, K.B; GOFF, H.D; STANLEY, D.W. A low temperature scanning electron microscopy study of ice cream. II. Influence of selected ingredients and processes. **Food Struct.**, v.11, n.1, p.11-23, 1992.

17. CAMPBELL, I.J; PELAN, B.M.C: emulsion and foam stabilization. . Buchheim, W. Ice Cream. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM HELD IN ATHENS, 1998, Brussels. **International Dairy Federation**, 1998. p. 25-36.
18. CHARTERIES, W.P. et al. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **Int. J. Dairy Technol.**, v. 51, n.4, p.123-136, 1998.
19. COSTA, O.P; LUSTOZA, D.C. Aspectos tecnológicos envolvidos na fabricação de sorvetes. **Rev. Sorveteria Bras.**; v.123, p. 47-60, 1998
20. CRUZ, AG.et al. Ice-cream as a probiotic food Carrier. **Food Res. Int.**, v.42, p.1233-1238, 2009.
21. DAVE, R.I; SHAH, N.P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. **J. Dairy Sci.**, v.81, p.2804-2816, 1998.
22. DICKINSON, E; STAINSBY, G. **Colloids in foods**. London: Applied Science Publishers; 1982. 383p.
23. EARLY, R. **Tecnologia de los productos lácteos**. Zaragoza: Acribia; 2000.459p.
24. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. 2001. Acesso em 4 jun 2009. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf.
25. FERREIRA, C.L.L.F. Produtos lácteos probióticos: uma realidade. **Leite e Derivados**, v.42, p.6-82, 1998.
26. FULLER, R. **History and development of probiotics**. Denmark: Christian Hansen; 1994. 30p.
27. FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**,v.66, n.365-378, 1989.
28. GOFF, H.D; Jordan W K. Action of emulsifiers in promoting fat destabilization during the manufacture of ice cream. **J. Dairy Sci.**,v.72, n.1, p.18-29, 1989.
29. GOFF, H.D; Kinsella, J.E; Jordan, WK. Influence of various milk protein isolates on ice cream emulsion stability. **J. Dairy Sci.**, v.72, n.2, p. 385-397, 1989.
30. GOFF, H.D. Ice cream under control. **Dairy Ind. Int.**, v.66, n.1, p.26-30, 2001.

31. GOFF, H.D. Instability and partial coalescence in whippable dairy emulsions. **J. Dairy Sci.**, v.80, n.10, p.2620-2630, 1997.
32. HEKMAT, S; MCMAHON, D.J. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. **J. Dairy Sci.**, v.75, n.6, p.1415-1422, 1992.
33. HOMAYOUNI, A. et al. Growth and survival of some probiotic strains in simulated ice cream conditions. **J. Applied Sci.**, v.8, n.2, p.379-382, 2008.
34. KAILASAPATHY, K; SULTANA, K. Survival and B-D-galactosidase activity of encapsulated and free *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in ice-cream. **The Australian J. Dairy Technol.**,v.58, p.223-227, 2003.
35. KATO, N.M. **Propriedades tecnológicas de formulações de sorvete contendo concentrado protéico de soro (CPS)**. 2002. 50f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.
36. KEBARY, K. M.K; HUSSEIN, S. A; BADAWI, R. M. Improving viability of bifidobacterium and their effect on frozen ice milk. **Egypt J Dairy Sci.**, v.26, p.319-337, 1998.
37. KINSELLA, J.E. Milk proteins: physicochemical and functional properties. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.21, n.3, p.197-262, 1984.
38. KOEFERLI, C.S; SCHWEGLER, P.P; HONG-CHEN, D. Application of Classical and Novel Sensory Techniques in Product Optimization. **Milchwissenschaft**, v.31, n.5, p.407-417, 1998.
39. KOKUBO, S.K. et al. Agglomeration of fat globules during the freezing process of ice cream manufacturing. **Milchwissenschaft**, v.53, n.4, p.206–209, 1998.
40. LEANDRO, E. et al. Sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UVF H2b20 em sorvete. **Inst. Lat. Cândido Tostes**, v.64, p.300-303, 2006.
41. MADRID, A; CENZANO, I; VICENTE, J.M. **Manual de indústrias dos alimentos**. São Paulo: Livraria Varela; 1996. 599p.
42. MANNING, K. Soft Fruit. In: TAYLOR, G.B; TUCKER, G.A (Ed) **Biochemistry of Fruit Ripening**, New York: Seymour, Chapman and Hall, 1993. p.347-377.
43. MARSHALL, R.T; ARBUCKLE, W.S. **Ice cream**. 5.ed. New York: International Thomson Publication, 1996. 349p.

44. MARSHALL, R.T; GOFF, H.D; HARTEL, R.W. Composition and properties. In: MARSHALL, R.T; GOFF, H.D; HARTEL, R.W. (Ed) **Ice cream**, 6 ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publication, 2003.p.11-50.
45. MARSHALL, R.T; GOFF, H.D; HARTEL, R.W. **Ice Cream**. 6ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publication, 2003.366p.
46. MOSQUIM, M.C.A. **Fabricando sorvete com qualidade**. São Paulo: Varela; 1999.62p.
47. PORTO, O.L. Uma importante etapa na produção perfeita do sorvete: homogeneização. **Sorveteria Brasileira**, v.122, p.37-38, 1998.
48. ROBINSON, R.K. Microbiologia lactologica. Zaragoza: Acribia; 1987.298p.
49. ROGINSKI, H. Fermented milks. **Aust. J. Dairy Technol.**, v.43, p.37-46,1988.
50. RUGER, P.R; BAER, R.J; KASPERSON, K.M. Effect of double homogenization and whey protein concentrate on the texture of ice cream. **J. Dairy Sci.**, v.85, n.7, p.1684-1692, 2002.
51. SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **Int. Dairy J.**, v.8, p.341-347, 1998.
52. SAWYER, W.H. Complex between β -lactoglobulin and κ -casein: a review. **J. Dairy Sci.** v.52, n.9, p.1347-1363, 1969.
53. SGARBIERI, V.C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradação, modificações. São Paulo: Varela; 1996. 517p.
54. SHAH, N.P; RAVULA, R.R. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. **Aust. J. Dairy Technol.**, v.55, p.139-144, 2000.
55. SHAH, N.P. et al. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yogurt during refrigerated storage. **Int. Dairy J.**, v.5, p.515-521, 1995.
56. SHAH, N.P. Functional cultures and health benefits. **Int. Dairy J.**, v.17, n.11, p.1262–1277, 2007.
57. SILVA, K; BOLINI, H.M.A. Avaliação sensorial de sorvete formulado com produto de soro ácido de leite bovino. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.1, n.26, p. 116-122, 2006.
58. SILVEIRA, H.G. et al. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de sorvetes do tipo tapioca. **Rev. Cienc. Agron.**, v.40, n.1, p.60-65, 2009.

59. STANLEY, D.W; SMITH, A.K., GOFF, H.D. Texture-structure relationships in foamed dairy emulsions. **Food Res. Int.**, v.29, n.1, p.1- 13, 1996.
60. STANTON, C. et al. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.16, n.196-203, 2005.
61. STOGO, M. Ice cream and frozen desserts: a commercial guide to production and marketing. New York: John Wiley & Sons; 1997. 58p.
62. TANNOCK, G.W. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. **Int. Dairy J.**, v.8, p.527-533, 1998.
63. THARP, B.W. et al: ingredient functionality. In: International Symposium Held In Athens, 1998, Brussels. International Dairy Federation, 1998. p. 54-64.
64. TIMM, F. Fabricacion de helados. Zaragoza: Acribia; 1989.304p.
65. TURNBOW, G.D; TRACY, P.H; RAFFETTO, L.A. **The ice cream industry.** 2ed. New York: John Wiley & Sons; 1947.381p.
66. VARNAM, A.H; SUTHERLAND, J.P. **Leche y productos lácteos: tecnologia, química e microbiologia.** Zaragoza: Acribia; 1994.476p.
67. VASILJEVIC, T; SHAH, N.P. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. **Int. Dairy J.**, v.18, n.7, p.714–728, 2008.
68. WALSTRA, P; JONKMAN, M: emulsion and foam stabilization. In:INTERNATIONAL SYMPOSIUM HELD IN ATHENS, 1998, Brussels.International Dairy Federation, 1998.

Tabela 1

Pressão aproximada de homogeneização para sorvetes com diferentes teores de gordura

Gordura %	Um Estágio (lb)	Dois estágios	
		Primeira válvula (lb)	Segunda válvula (lb)
8-12	2.500 – 3.000	2.500 – 3.000	500
12-14	2.000 – 2.500	2.000 – 2.500	500
15-17	1.500 – 2.000	1.500 – 2.000	500
18	1.200 – 1.800	1.200 – 1.800	500
>18	800 – 1.200	800 – 1.200	500

Fonte: Arbuckle (8).

Tabela 2

Vantagens e limitações de alguns ingredientes utilizados em sorvetes

Constituintes	Vantagens	Limitações
Gordura do leite	Aumenta a riqueza do sabor Produz textura cremosa Ajuda a dar corpo ao sorvete	Custo Alto valor calórico Alto conteúdo deixa o sorvete enjoativo
Sólidos não gordurosos	Promovem textura Ajudam a dar corpo Fonte barata de sólidos	Alta concentração produz arenosidade Pode causar sabor a cozido e salgado
Açúcar	Fonte barata de sólidos Promove textura Melhora o sabor	Doçura excessiva Reduz a habilidade de batimento Requer longo tempo de congelamento Para o processo de endurecimento há necessidade de baixas temperaturas
Estabilizantes	Efetivos para uma textura suave Proporcionam corpo ao produto Aumentam resistência ao derretimento	Gosto amargo
Sólidos totais	Podem deixar a textura cremosa Melhor corpo Podem aumentar o valor nutritivo	Podem deixar o sorvete com corpo pesado e pastoso

Compostos de sabor	Aumentam a aceitabilidade	Sabor adstringente
Compostos de cor	Promovem atratividade Ajudam na identificação do sabor	

Fonte : Marshall & Arbuckle ⁴³

CAPITULO 2

EVALUATION OF THE PROTECTIVE EFFECTS OF TREHALOSE AND GUM ACACIA ON THE SURVIVAL OF *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* (LC-1) DURING LYOPHILIZATION

Artigo redigido segundo as normas da revista Le Lait

(Protective effect of trehalose and gum acacia on probiotic lactobacillus)

Karla Bigetti GUERGOLETTO^{1*}, Jean Clovis Bertual de SOUZA², Katia SIVIERI²,
Sandra GARCIA¹

¹ *Department of Food Science and Technology, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.*

² *Master Degree in Dairy Science, Universidade Norte do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil.*

*Corresponding author adress: Department of Food Science and Technology, Universidade Estadual de Londrina, Rod Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, Campus Universitário, C.P. 6001, CEP 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

Tel: +55-43-3371-4565; Fax: +55-43-3371-4080;

E-mail: karla2901@gmail.com

ABSTRACT

The protective effect of trehalose and gum acacia on microbial cells during drying processes has been the object of numerous studies. The objective of this study was to use the factorial experimental design and response surface analysis (RSA) to investigate the effect of the action of trehalose and gum acacia on the probiotic *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* (LC-1), subjected to lyophilization or freeze-drying suspended in a medium containing 5% skim milk powder and 5% whey powder. The results were analyzed using the Statistica 6.0 software program. The media containing 5% trehalose and 4.5% gum acacia exhibited the highest cell survival rates after freeze-drying. RSA showed significant interaction ($P < 0.001$) between the two compounds, with the protective effect being greater when the two compounds were used in combination as compared to the protective effect of each compound separately, thereby indicating a substantial potential for use in the food industry.

Keywords: probiotics, cryoprotectants, drying, response surface, compatible solute

1. Introduction

According to FAO/WHO [6], probiotics are live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer health benefits on the host. In order to produce such health benefits, it is essential that live probiotic bacteria survive after passing through the gastrointestinal tract and reach their site of action intact.

Lyophilization or freeze-drying has been widely used to produce probiotics in powder form. Lyophilization is a process based on the sublimation of water, in which bacterial cells are first frozen and then dried under high vacuum [11]. Since water plays an important role in stabilizing the structure and maintaining the functional integrity of cellular macromolecules, its removal causes damage to the surface of cell walls and membranes, thereby compromising the viability of the bacterial cells [15].

For most probiotic bacterial cultures of commercial interest to the dairy industry, skim milk powder is frequently selected as drying medium because it (1) prevents cellular injury by stabilizing the cell membrane constituents; (2) creates a porous structure in the freeze-dried product that makes rehydration easier, and (3) contains proteins that provide a protective coating for the cells. In addition, supplementing skim milk with other compounds, such as glycerol, betaine, sucrose or gum acacia may enhance the survival of probiotic bacteria during freezing, drying and storage. [2].

The objective of this study was to evaluate the effects of trehalose and gum acacia, and their interactions, on the viability of LC-1, investigating the best concentrations of these compounds to obtain the highest cell survival rate, using a factorial experimental design and response surface analysis (RSA). Milk solids were partially replaced by whey powder to reduce the manufacturing costs of the lyophilized product and facilitate the development of future industrial applications.

2. Materials and Methods

2.1 Bacterial strain

The freeze-dried *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* (LC-1) culture, kindly provided by Christian Hansen (Valinhos, São Paulo, Brazil), was

activated in a solution of skim milk powder (5% w/v) and whey powder (5% w/v), sterilized at 100°C for 20 minutes and cultured at 37°C for 17h (stationary phase). Next, 1% (v/v) of the culture was subjected to the same conditions to obtain the pre-inoculum.

2.2 Experimental design

The experiment was a complete factorial design of the 2^2 type with two center points and four axial points, totaling 10 tests, as described by Barros Neto et al. [1]. The effects of the independent variables, the concentrations of trehalose and gum acacia on the cellular viability of *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* after lyophilization were investigated (Table 1). The selection of the concentrations indicated by the center points was based on the studies of Conrad et. al. [3] and Schiavão-Souza et. al. [16].

The results were analyzed by multiple linear regression and subsequently used to develop the mathematical models using the Statistica (Statsoft, Tulsa, USA) software program. The polynomial equation obtained was:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_1X_{12} + b_2X_{22} + b_{12}X_{12}X_{22} + \varepsilon$$

(equation 1)

Where:

Y: response

X_1, X_2 : independent variables

b_0, b_1, b_2, \dots : constant coefficients

ε : experimental error with normal distribution

The statistical significance of the model was tested by analysis of variance (ANOVA), with the minimum level of significance set at $P < 0.05$. The influence of each of the variables can be seen in the 3D response surface plot. The response surface was generated using the Statistica (Statsoft, Tulsa, USA) software package.

2.3 CULTURE MEDIA

The culture media were prepared using reconstituted skim milk powder (5% w/v) and whey powder (5% w/v), added with different concentrations of trehalose (Hayashibara Trehalose) (degree of purity \geq 98%) and gum acacia (Instantgum BA-Goma Colloides Naturels International).

The 30% (w/v) trehalose solution was sterilized by filtration through a 0.2- μ m-pore filter, 47 mm in diameter (Schleicher & Schuell). The 20% (w/v) gum acacia solution was sterilized at 100°C for 20 minutes (fluent steam).

The different concentrations of trehalose and gum acacia added to the skim milk & whey medium, are shown in Table I.

2.4. Growth conditions and lyophilization process

The culture media, formulated and prepared as described above, were inoculated with 1% (v/v) of the pre-inoculum and incubated at 37°C for 17 hours. After this period, the samples were transferred to sterile plastic vials and frozen at -18°C for 12 hours before being subjected to lyophilization (L101-Liobras Lyophilizer) for 36 hours at a temperature of -30°C under a pressure of 500 uHg.

2.5 Determination of cellular viability

One-gram samples of each lyophilized culture were added to 9mL 0.1% (p/v) sterile peptone water, followed by decimal solutions, inoculation in MRS broth and incubated in anaerobic jars at 37°C for 48h. The number of LC-1 viable cells was determined by the plate count method [4].

3 Results and Discussion

Table II shows the results of cellular viability after lyophilization using skim milk & whey media added with different concentrations of trehalose and gum acacia. The highest survival rates were obtained with the media containing 5% trehalose and 4.5% gum acacia, which statistically correspond to the center point.

Conrad et al. [3], reported a survival rate of 90% of *Lactobacillus acidophilus* cells after lyophilization in a drying medium containing 5% (w/v)

trehalose. Desmond et al. [5] observed that the use of 10% (w/v) gum acacia in the medium used for drying *L. paracasei* in a spray-dryer increased survival of the probiotic by 10 times compared to the medium without gum acacia.

Schiavão-Souza et al. [16] observed that the addition of 4,5% gum acacia to the culture medium containing *Lactobacillus casei* (LC-1) favored the production of exopolysaccharides (EPS) and, according to Looijesteijn et. al. [10] and Ruas-Madiedo et al. [14], the production of these compounds by lactic bacteria may be considered as a protection mechanism against stress situations, such as the action of bacteriophages, toxic compounds and dehydration processes, the latter of which may explain the higher survival rates obtained in our study.

Statistical analysis showed that the interaction between trehalose and gum acacia has a positive and significant effect ($p=0.04$) of 1.75 log cycles on the viability of LC-1 lyophilized in a skim milk & whey medium, thereby demonstrating the effectiveness of the combined use of these carbohydrates. On the basis of this result, it is believed that their combined use enhanced the individual potential protective activities of trehalose and gum acacia.

From the calculated coefficients it was possible to obtain the following equation adjusted to the experimental data:

$$Y = 10.52 + 0.87 x_1x_2 - 0.52x_1^2 - 0.58x_2^2$$

The determination coefficient (R^2) of the model was 0.62, with a lack of fit of 0.68, indicating the fit of the experimental data to the model. The negative sign for the quadratic terms indicates that the response is close to its optimum value.

The response surface plot (Figure 1) shows the experimental data distributed in the intervals studied and allows to observe that the highest survival rates of LC-1 are located in the region around the center point.

In the processes of freezing and lyophilization, the drop in temperature and changes in the water/lipid ratio are the main causes of cellular membrane injuries that destroy the permeability barrier of ionic species and ultimately lead to cell collapse. These changes and their implications may be

related to a strong interdependency between unsaturated and saturated fatty chains and polar groups of the cell membrane [8].

For active microbial metabolism to occur, the intracellular conditions of bacteria, such as ionic composition, pH and metabolite levels must remain relatively constant. Since the cytoplasmic membrane is permeable to water, it forms an effective barrier against most solutes and, consequently, a change in the osmolarity of the cellular environment may rapidly compromise essential functions. To survive, a bacterium needs to adapt to such changes and this may be achieved: (i) by the accumulation of compatible solutes under hyper-osmotic conditions and release under hypo-osmotic conditions [17]; (ii) by the production of exopolysaccharides (EPS), which are believed to be able to act as a protectant of lactobacillus species against dehydration [14]; (iii) and by possible alterations in the fluidity and profile of the fatty acids of the membrane, which may help to preserve cellular integrity during stress [2]. Within this context, the mechanism proposed by some authors of cryoprotective action of trehalose would involve the ability of this carbohydrate to reallocate water molecules in the region of polar groups and in protein structures [8].

The composition of the growth medium is also an important factor for the survival of probiotic cultures during drying. Panoff, Thammayongs and Gueguen [13], Ferreira et. al. [7], and Tymczynsyn, Gomez-Zavaglia and Disalvo [18] demonstrated that the addition of carbohydrates, such as lactose, sucrose and trehalose to the growth medium enhances the survival of bacterial cells after lyophilization.

Conclusion

Response surface methodology allowed to observe that the highest level of viability of *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* (LC-1), was obtained with the addition of 5% trehalose and 4.5% gum acacia. Furthermore, the combined use of these compounds has a potential for application in the dairy industry for the production of lyophilized probiotics and their use in foods, since the interaction between these two compounds was a positive and statistically significant factor in the survival of LC-1.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq) for the financial support provided to this project.

Referências

- [1]Barros Neto, B. B., Scarminio, I. S., Bruns, R. E. Planejamento e otimização de processos. Campinas, SP: Editora da UNICAMP (Série Manuais), 1995.
- [2]Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira P., Malcata, F. X., Gibbs, P. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 14 (2004) 835-847.
- [3]Conrad, P. B., Miller, D. P., Cielenski, P. R., & Pablo de, J. J. Stabilization and Preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology*, 41 (2000) 17-24.
- [4]Corcoran, B. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *J. Appl. Microbiol.* 96 (2004) 1024-1039.
- [5]Desmond, C., Ross, R. P., O'Callaghan, E., Fitzgerald, G., Stanton, C. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *J. Appl. Microbiol.* 93 (2002) 1003-1011.
- [6]FAO/WHO. Guidelines for Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, 30 april and 01 mat, 2002.
- [7]Ferreira, V., Soares, V., Santos, C., Silva, J., Gibbs, P. A., Teixeira, P. (2005). Survival of *Lactobacillus sakei* during heating, drying and storage in the dried state when growth has occurred in the presence of sucrose or monosodium glutamate. *Biotechnology Letters*, 27, 249-252.
- [8]Gómez-Zavaglia, A., Tymczyszyn, E., De Antoni, G., Disalvo, A. Action of trehalose on the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* by heat and osmotic dehydration. *J. Appl. Microbiol.* 95 (2003) 1315-1320.
- [9]Linders, L. J. M, Jong, de G. I. W., Meerdink, G., Riet, K. V. (1997). Carbohydrates and the dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*: The role of moisture distribution and water activity. *Journal of Food Engineering*, 31, 237-250.

- [10] Looijesteijn, P. J., Trapet, L., Vried, de E., Abee, T., Hugenholtz, J. Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Microbiol.* 64 (2001) 71-80.
- [11] Meng, X. C., Stanton, G. F., Fitzgerald, C. D., & Roos, R. P. (2007). Anhydrobiotics. *Food Chemistry*, 106 (4), 1406-1416.
- [12] Otero, M. C., Espeche, M. C., Macías, M. E. N. Optimization of freeze-drying media and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Delbrueckii* for veterinarian probiotic applications. *Proc. Biochem.* 42 (2007) 1406-1411.
- [13] Panoff, J. M., Thammavongs B., Guéguen, M. Cryoprotectants lead to Phenotypic Adaptation to Freeze-Thaw Stress in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CIP 101027T. *Cryobiology*, 40 (2000) 264-269.
- [14] Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., Zoon, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 12 (2002) 163-171.
- [15] Santivarangkna, C., Higl, B., & Foerst, P. Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. *Food Microbiol.* 25 (2008) 429-441.
- [16] Schiavão-Souza, T. D., Yuhara, T. T., Castro-Gómez, R. J., Garcia, S. Produção de exopolissacarídeos por bactérias probióticas: otimização do meio de cultura. *Brazilian J. Food Technol.* 10 (2007) 27-34.
- [17] Sunny-Roberts, E. O., Knorr, D. Evaluation of the response of *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800 to sucrose-induced osmotic stress. *Food Microbiol.* 25 (2008) 183-189.
- [18] Tymczyszyn, E.E., Gómez-Zavaglia, A., Disalvo, E. A. Effect of sugars and growth media on the dehydration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *J. Appl. Microbiol.* 102 (2007) 1081-1086.
- [19] Zayed, G., & Roos, Y. H. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subject to freeze-drying and storage. *Proc. Biochem.* 39 (2004) 1081-1086.

Table 1: Variables trehalose and gum acacia: actual and coded values

Experiment	Trehalose (x1)	Trehalose (% w/v)	Gum acacia (x2)	Gum acacia (% w/v)
1	-1.000	2.500	-1.000	3.500
2	-1.000	2.500	1.000	5.500
3	1.000	7.500	-1.000	3.500
4	1.000	7.500	1.000	5.500
5	0.000	5.000	0.000	4.500
6	0.000	5.000	0.000	4.500
7	-1.414	1.464	0.000	4.500
8	1.414	8.536	0.000	4.500
9	0.000	5.000	-1.414	3.086
10	0.000	5.000	1.414	5.914

Table 2: Survival of *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* (LC-1- values in CFU/g log) in culture media containing milk solids and different concentrations of trehalose and gum acacia, after lyophilization

Experiment	Trehalose concentration (% w/v)	Gum acacia concentration (% w/v)	Cellular viability (log CFU)
1	2.500	3.500	10.2
2	2.500	5.500	8.4
3	7.500	3.500	8.0
4	7.500	5.500	9.7
5	5.000	4.500	11.0
6	5.000	4.500	10.9
7	1.464	4.500	10.0
8	8.536	4.500	9.6
9	5.000	3.086	9.9
10	5.000	5.914	9.5

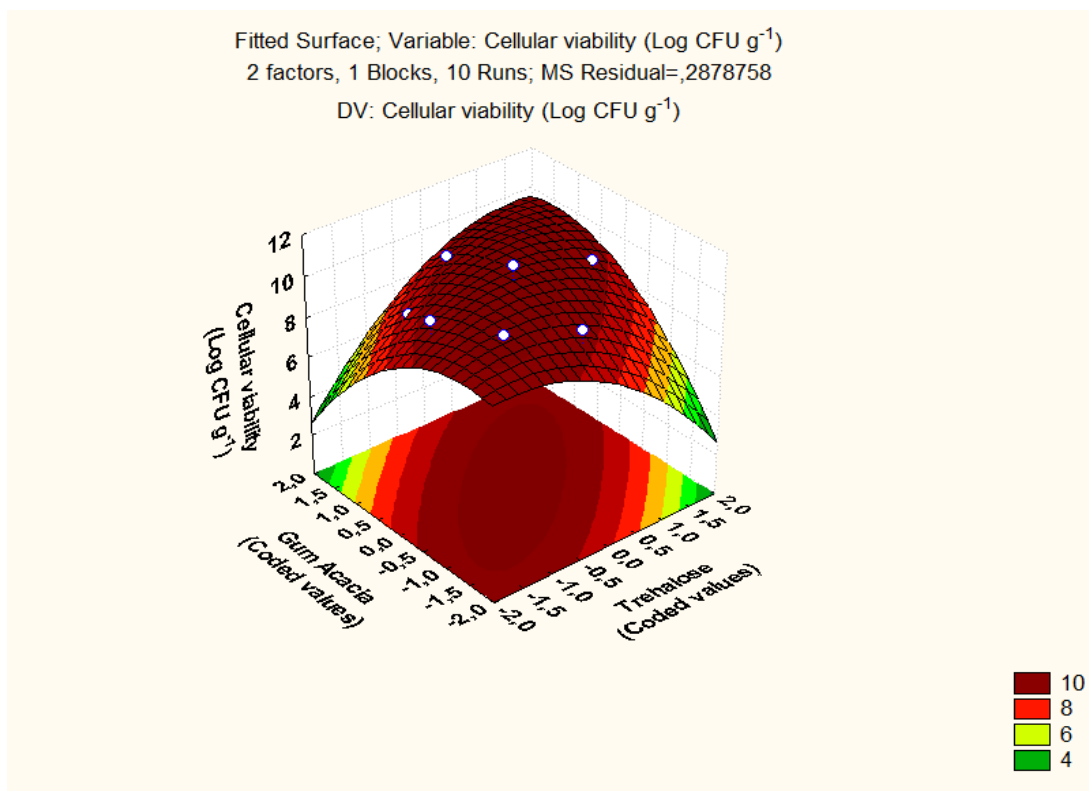


Figure 1: Response surface plot obtained after lyophilization of *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* suspended in a skim milk & whey medium, for the coded variables trehalose and gum acacia, with the viability of LC-1 expressed in log CFU/g as response.

CAPITULO 3

Viabilidade da adição de *Lactobacillus casei* protegido com trehalose e goma acácia em sorvetes

Artigo redigido segundo as normas da Swiss Society of Food Science and Technology

Jean Clovis Bertuol de Souza^a, Katia Sivieri^b.

Resumo

Os probióticos têm se tornado um elemento de extrema importância na nossa alimentação por proporcionarem efeitos benéficos à saúde humana gerando uma melhor qualidade de vida. O presente trabalho teve como objetivo analisar a viabilidade do microrganismo probiótico *Lactobacillus casei* protegido com trehalose e goma acácia em sorvete. A viabilidade foi avaliada nos dias 0 (72h), 14, 28, 42, 63 e 102 dias após o processamento do sorvete através de contagens em meio MRS. Durante os 102 dias de vida de prateleira *L. casei* controle (sem proteção celular) e *L. casei* protegido se mostraram viáveis. No início do armazenamento foi observada contagem média de 10,17 log UFC.g⁻¹ para o *L. casei* livre e 9,77 log UFC.g⁻¹ para o *L. casei* protegido, porém após 102 dias de armazenamento à -20°C estes números diminuíram para 8,79 e 8,14 log UFC.g⁻¹, respectivamente. A proteção celular demonstrou ser viável na adição de probiótico em sorvetes, tendo se diferenciado do sorvete com probiótico sem proteção após 63 dias de armazenamento. A adição do *L. casei* livre ou protegido não afetou as características sensoriais do sorvete. A proteção celular demonstrou ser eficiente na adição de microrganismo probiótico em sorvete, especificamente o *L. casei* protegido (goma acácia e trealose), sem alterações sensoriais.

Termos para indexação: Probiotic, Prebiotic, Synbiotic, Survival, Microencapsulation, Ice cream.

1. Introdução

O mercado mundial de alimentos funcionais está em pleno crescimento e procurando sempre novos produtos com características funcionais tecnológicas e fisiológicas. A indústria de laticínios está entre as que mais se destacam na disponibilização de produtos funcionais, em especial nos segmentos de iogurtes e outros leites fermentados, onde essa funcionalidade é efetivada por meio da utilização de culturas probióticas e/ou adição de substâncias prebióticas (Ferreira, 2003).

Para se obter o máximo benefício dos probióticos é necessário que os mesmos estejam viáveis e disponíveis em concentrações superiores a 10^6 UFC.g⁻¹ (Dave & Shah, 1998; Hekmat & McMahon, 1992; Kailasapathy & Sultana, 2003). No Brasil, a AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA sugere que os produtos contendo probióticos prontos para o consumo e consumidos diariamente devem possuir de 10^6 a 10^7 UFC (Brasil, 2002). Entretanto, segundo a Federação Internacional de Leite (IDF) deve-se conter no mínimo 10^7 UFC.g⁻¹ no produto (David & Shah, 1998).

Vários estudos têm mostrado baixo número de bactérias viáveis em alguns produtos comerciais, abaixo dos valores exigidos pela IDF (Kailasapathy & Chin, 2000; Shortt, 1998). Entretanto, vários fatores como acidificação do produto final, ácidos produzidos durante o armazenamento, nível de oxigênio no produto, permeação do oxigênio através da embalagem, compostos antimicrobianos e a perda de nutrientes do leite podem reduzir sua viabilidade e, conseqüentemente, suas propriedades probióticas são prejudicadas. Para se tentar minimizar este tipo de problema pode-se citar o uso do probiótico liofilizado (na forma de cápsulas ou pílulas), utilização da técnica de microencapsulação; proteção celular ou ainda utilizar a tecnologia da Engenharia Genética para desenvolver linhagens mais específicas a determinadas condições do paciente (Shah et al., 1995; Sanders & Klaenhammer, 2001).

O sorvete apresenta-se como um veículo adequado para o resgate de probióticos na dieta humana. Alguns estudos têm demonstrado que é possível a

produção de sorvete inoculado com microrganismo probiótico (Cruz et al., 2009; Miguel & Rossi, 2003).

Dentre os produtos inovadores como alimento funcional, o sorvete possui um mercado promissor e um grande potencial de crescimento. O leite e derivados lácteos são ingredientes obrigatórios nos sorvetes e permitem a veiculação de microrganismos probióticos. No entanto, a forma que o microrganismo é adicionado não deve descaracterizar sensorialmente o produto. Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade do *Lactobacillus casei* ssp. *casei* e na forma livre e protegido com a trealose e a goma acácia em sorvete durante 102 dias de armazenamento.

2. Materiais e métodos

Processamento do sorvete

Ingredientes

Foram utilizados como matéria prima 100 L (73,4%) de leite de vaca da raça Jersey, provenientes do Sítio Estação do Leite, localizado em Laranjeiras do Sul, Paraná, Brasil. O teor sólidos do leite foi ajustado à 21% pela adição de 8 kg (5,9%) de leite em pó integral (Confepar, Brasil). Foram utilizados também como ingredientes: 5 kg (3,7%) de glucose (Cargil, Brasil); 20 kg (14,7%) de açúcar cristal (Alto Alegre, Brasil); 300 g (0,2%) de liga industrial (Duas Rodas, Brasil); 2 kg (1,5) de aromatizante sabor creme (Duas Rodas, Brasil); 1 kg (0,7%) de emulsificante (Duas Rodas, Brasil).

Preparação do *Lactobacillus casei* livre

A cultura probiótica liofilizada (1%) de *Lactobacillus casei* (Lc-01), cedida pela Christian Hansen (Valinhos São Paulo), foi ativada inoculando-a em 40 ml de leite esterilizado a 100°C por 20 minutos e cultivando à 37°C por 9h. A massa probiótica na fase log de crescimento foi adicionada na fase final do sorvete. (Homayouni et al., 2008).

Proteção celular do *Lactobacillus casei*

A proteção celular foi realizada conforme descrito previamente por Guergoleto et al, (2010). Resumidamente, o procedimento foi realizado como descrito a seguir: a cultura liofilizada de *Lactobacillus casei* (LC-1), cedida pela Christian Hansen (Valinhos, São Paulo, Brasil), foi ativada em uma solução de leite em pó desnatado (5% p/v) e soro de leite desidratado (5% p/v), esterilizado a 100°C por 20 minutos e cultivada a 37°C durante 17h (fase estacionária). Decorrido este tempo, 1% (v/v) da cultura foi submetida a iguais condições para obtenção do pré-inóculo. Os meios de cultivos foram preparados utilizando leite em pó desnatado (5% p/v) e soro de leite desidratado (5% p/v), reconstituídos, adicionado (3,75% p/v) de trealose (Hayashibara Trehalose) (grau de pureza ≥ 98%) e 4% p/v de goma acácia (Instantgum BA-Goma Colloides Naturels International).

O meio de cultivo foi inoculado a 1% (v/v) com o pré-inóculo e incubados a 37°C por 17 horas. Após este período as amostras foram congeladas à -18°C em frascos plásticos estéreis por 12 horas e em seguida submetidas ao processo de liofilização (Liofilizador L101-Liobras) por 36 horas à temperatura de -30°C e pressão de 500 uHg.

Processamento do sorvete

O leite resfriado (4°C) foi colocado no tanque pasteurizador (MDG, Brasil), em seguida adicionados o leite em pó, glucose, açúcar e liga industrial. A mistura resultante foi pasteurizada em 74°C por 5 min, resfriada a 4°C e armazenados por 16h, para a maturação nesta temperatura com homogeneizações (Congel, Brasil) intercaladas de 5 min com intervalo de 10 min (Figura 1).

O sorvete foi dividido em porções de 8 Kg com a adição de 160g (1,5%) de aromatizante de creme (Duas Rodas, Brasil) e 80g (0,7%) emulsificante (Duas Rodas, Brasil) e homogeneizados (Kohlbach, Brasil) à 2000 rpm/min por 2min. Em seguida, a calda foi encaminhada á sorveteira (Refrigas, Brasil) onde ocorreu o congelamento parcial da massa sob homogeneização (180 rpm/ min/ -7°C)

Logo após o congelamento parcial, ainda sob homogeneização o sorvete foi embalado em três partes de 1 L (A, B e C), a amostra A (controle) isenta de probiótico (*L. casei*), a amostra B com *L. casei* protegido (goma acácia +

trealose) com 10^9 UFC/ mL, e amostra C com *L. casei* livre 10^{10} UFC/ mL. O sorvete foi armazenado congelado em freezer a -20°C durante 45 dias. Todos os experimentos foram realizados duplicata.

Determinação da viabilidade celular

A amostra de sorvete foi descongelada a 4°C por 2 horas, a com probiótico livre e a com probiótico encapsulado (goma acácia + trealose), onde se realizou a contagem do *L. casei*, 72 horas após o congelamento considerando como ponto 0 do experimento. A análise da viabilidade do *L. casei* no sorvete foi realizada durante 45 dias de armazenamento nos dias 0 (72h), 14, 28, 42, 63 e 102 dias de vida de prateleira.

As amostras de sorvete (25g) foram decimalmente diluídas em 225 mL de água peptonada estéril (0,1%), as quais foram realizadas as diluições seriadas. As diluições foram plaqueadas sob profundidade em Ágar MRS em triplicata e incubadas a 30°C por 48 horas.

As médias de todos os resultados foram expressas como log de unidades formadoras de colônias por grama de amostra ($\log \text{UFC.g}^{-1}$).

Análises físico-químicas

O pH do sorvete foi medido utilizando um pH-metro digital (Tecnal, Brasil). O conteúdo de gordura do sorvete foi determinado conforme normas do Instituto Adolfo Lutz (1997). O teor de nitrogênio foi determinado pelo método de Kjeldahl e o teor de proteína total foi calculado multiplicando o teor de nitrogênio por 6,38. O teor de cinzas pelo método gravimétrico de incineração em mufla a 550°C e o teor de sólidos totais por secagem em estufa à temperatura de 105°C por 16 h. O teor de lactose foi calculado pela seguinte fórmula: $\text{Lactose (\%)} = \text{teor de sólidos totais} - (\text{teor de lipídios} + \text{teor de proteína} + \text{teor de cinzas})$.

Análises físicas

Determinação do “overrun”. O “overrun” se define como o volume de sorvete obtido em excesso em relação ao volume de mistura. Nos processamentos do experimento o valor médio de ar incorporado é 75%.

Método: O overrun é calculado pela seguinte fórmula

$$\% \text{ overrun} = \frac{(V_{\text{final}} - V_{\text{inicial}})}{V_{\text{inicial}}} \times 100$$

(KATO, 2002).

Onde V_{final} é o volume do produto aerado e V_{inicial} é o volume inicial da mistura não aerada. O teste foi repetido três vezes para cada amostra.

Análises sensoriais

Teste sensorial de aceitação foi realizado com os produtos finais (após quinze dias de produção). Recrutaram-se 100 provadores não treinados, dentre alunos, professores e funcionários da Universidade Norte do Paraná – UNOPAR, para realizarem as análises. Os provadores foram selecionados levando-se em conta o fato de consumirem os produtos, e, também, de terem disponibilidade e interesse em participar do teste. Os atributos aparência, aroma, sabor, e textura foram analisados por meio de uma ficha contendo uma escala hedônica com nove pontos em que 1 significa desgostei muitíssimo, e 9, gostei muitíssimo (Meilgaard; Civille; Carr, 1999).

Análises estatísticas

Os dados de dos testes físico-químicos das misturas e dos sorvetes prontos foram analisados utilizando procedimentos lineares gerais (Sas, 1996) tendo sido a significância determinada por Teste de Tukey com diferença 0,05%.

A comparação dos resultados para a viabilidade dos microrganismos probióticos entre os diferentes tratamentos para cada período de armazenamento e entre os diferentes períodos de armazenamento para cada tratamento, foi realizada através de análise de variância para medidas repetidas; com posterior aplicação do teste de Tukey, considerando-se um nível de significância $p < 0,05$ (Callegari-Jacques, 2003).

3. Resultados e discussão

Características físico-químicas do sorvete

A composição centesimal dos sorvetes pode ser visualizada na Tabela 1. O conteúdo de proteína ficou entre 3,70 à 5,69%, o de gordura não oscilou, cinzas foi de 0,40; 0,57 e 1,69% e de carboidratos foi 32,49; 21,27 e 45,05 para as formulações controle, com *L.casei* livre e *L.casei* protegido, respectivamente.

Os valores de composição centesimal encontrado foram semelhantes aos observados por Oliveira et al (2008) para sorvete de creme (carboidratos, 22%; proteínas 4% e gordura 7%). Observa-se na Tabela 1 que os maiores teores de proteína (5,69%) e carboidrato (45,02%) foram encontrados no sorvete com o *L.casei* protegido. Estes valores eram esperados, pois nesta formulação utilizou-se 3,75% de trealose e 4% de goma acácia para a proteção do microrganismo.

Os valores de pH do sorvetes foram em média 7,12; 6,5 e 5,45 para o controle, com adição de com *L.casei* livre e *L.casei* protegido, respectivamente. Valores semelhantes ao encontrado por Homayouni et al (2008), os quais observaram um valor de 6,6 para sorvete sabor creme com adição de *L.casei* microencapsulado. O valor de *overrum* encontrado foi de $106,25 \pm 8,83$. Segundo Oliveira et. al., (2005) altos valores de *overrum* garantem maciez e suavidade a massa do sorvete.

Sobrevivência do *L. casei* livres e protegidos em sorvete

A Figura 2 mostra os resultados das contagens de *L.casei* livre e protegido durante 102 dias de estocagem à -20°C. Observa-se que o sorvete com *L.casei* livre teve uma contagem inicial maior (tempo zero) quando comparado com o sorvete com *L.casei* protegido. Durante a vida de prateleira o *L.casei* livre diminuiu dois ciclos logarítmicos, enquanto que o *L.casei* protegido diminuiu somente um ciclo. A contagem inicial no dia 0 (72h) era de 10,17 log UFC.g⁻¹ para o *L.casei* livre e 9,77 log UFC.g⁻¹ para o *L.casei* protegido, porém com 102 dias de armazenamento as contagens de *L.casei* livre e protegido foram dentro da mesma fase log (8,79; 8,14 log UFC.g⁻¹, respectivamente) conforme tabela 2. Hekmat and McMahon (1992) verificaram um declínio de 2 ciclos logarítmicos do *L.*

acidophilus em sorvetes após 17 semanas de armazenamento à -29 °C. Resultados semelhantes foram observados em nossos experimentos com *L.casei* livre. A redução da contagem de microrganismos probióticos em sorvetes durante a vida de prateleira foi observada por Homayouni et al., 2008; Vasiljevic & Shah, 2008; Andriquetto & Gomes, 2003. O declínio da contagem bacteriana pode ser resultado do congelamento, com a injúria das células e eventualmente a morte celular (Homayouni et al., 2008).

Dentre os protetores celulares mais utilizados destacam-se a trehalose e a goma acácia. Trabalhos como de Linders et al. (1997), Conrad et al. (2000) e Zayed e Ross (2004) vem mostrando a ação deste açúcar e da goma acácia na proteção de microrganismos probióticos durante processos de desidratação como a liofilização. Nossos resultados mostraram que o uso da trehalose e da goma acácia como protetores celulares foi eficiente para manter uma alta contagem do *L.casei*, com diminuição de apenas 1 ciclo log após 102 dias de armazenamento à -20 °C.

Segundo Andriquetto e Gomes (2003), o sorvete adicionado de *Lactobacillus acidophilus* pode ser armazenado durante 60 dias, a -25°C, sem ter suas características sensoriais e microbiológicas alteradas e apresentando contagem de $8,3 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ na contagem inicial. Kebery et al. (1998) demonstraram que o *Bifidobacterium ssp* conseguiu alta sobrevivência em *frozen yogurts* adicionados de alginatos. Shah e Ravula (2000) reportaram que a sobrevivência de bactérias em sorvetes pode ser otimizada utilizando processos de encapsulação. De acordo com a Homayouni et. al. (2008) com a utilização de processos de encapsulação de *Lactobacillus casei* foi observada uma sobrevivência de 10^8 a 10^9 UFC.g⁻¹ no final da vida de prateleira do sorvete.

Para se obter o máximo benefício dos probióticos é necessário que os mesmos estejam viáveis e disponíveis em concentrações superiores a 10^6 UFC.g⁻¹ (Shah, 2000). No Brasil, a agência nacional de vigilância sanitária (Brasil 2002) sugere que os produtos contendo probióticos para o consumo devem possuir no mínimo 10^6 UFC.g⁻¹. Os sorvetes analisados neste trabalho apresentaram a concentração mínima exigida pela legislação brasileira para ser considerado probiótico durante 102 dias de armazenamento.

Avaliação sensorial

A produção de sorvete com probiótico de alta aceitação sensorial é uma tarefa difícil, pois requer conhecimento técnico e muitas vezes os sorvetes funcionais apresentam performance sensorial pobre, quando comparado a um sorvete convencional (Aryana & Summers, 2006; Favaro-Trindade et al., 2006; Hekmat & McMahon, 1992).

A qualidade dos sorvetes foi avaliada pelos consumidores através de testes de aceitação e intenção de compra com os seguintes atributos, aceitação, consistência e aparência.

Os resultados das análises sensoriais podem ser observados nas Figuras 3, 4, 5 e 6. Os três tipos de sorvete, controle, o com *L. casei* livre e o com *L. casei* protegido apresentaram um perfil sensorial semelhante em relação aos atributos de sabor, consistência e aparência e não diferiram estatisticamente entre si ($P < 0,05$). As Figuras 3, 4, 5 e 6 mostram que todos os atributos analisados estão na faixa de notas entre 7 a 9 (gostei a gostei muitíssimo), portanto a adição do microrganismo probiótico (na forma livre e protegido) não afetou as propriedades sensoriais. Resultado semelhante foi observado por Homayouni et al (2008), os quais verificaram que a adição de *L. casei* microencapsulado em sorvete não afetou a qualidade sensorial do produto.

4. Conclusões

A proteção celular demonstrou significativamente eficiente na adição de microrganismo probiótico em sorvete, especificamente o *L. casei* protegido (goma acácia e trealose), sem alterações sensoriais.

5. Referências

Andrighetto, C.; Gomes, M.I.F.V. (2003). Produção de picolés utilizando leite acidófilo. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.6, n.2, p. 267-271.

Aryana, K. J., & Summers, M. (2006). Probiotic fat-free, no sugar added ice-cream. *Milchwissenschaft*, 61(1), 184–187.

BRASIL (2001). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Resolução- RDC n° 12, de 02 de janeiro de 2001*: regulamento técnico sobre padrões microbiológicos em alimentos.

BRASIL (2010). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RCD n. 2, de 07 de janeiro de 2002*. Acesso em 4 jun. Disponível em: [http// www.anvisa.org.br](http://www.anvisa.org.br).

BRASIL (2002). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Resolução RDC n° 2, de 7 de janeiro de 2002*: Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde.

Callegari-Jacques, S.M. (2003). *Bioestatística: princípios e aplicações*. Porto Alegre: Artmed. 255p.

Conrad, P. B., Miller, D. P., Cielenski, P. R., & Pablo de, J. J. (2000). Stabilization and Preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology*, 41 17-24.

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

Dave, R. I., & Shah, N. P. (1998). Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *Journal of Dairy Science*, 81, 2804–2816

Favaro-Trindade, C. S., Bernadi, S., Boldini, R. B., & Balieiro, J. C. C. (2006). Sensory acceptability and stability of probiotic microorganisms and vitamin C in fermented acerola ice-cream. *Journal of Food Science*, 71(6), 492–495.

Ferreira, C. L. L. F. (2003). Prebióticos e Probióticos: *Atualização e prospecção*. Viçosa, MG, 206p.

Guergoletto, K., B., Sivieri, K., Fornelli, A., Garcia, S. (2010). Avaliação dos efeitos protetores da trehalose e goma acácia na sobrevivência de *Lactobacillus casei* durante processo de liofilização, *Journal of Dairy Science and Technology*.

Hekmat, S., & McMahon, D. J. (1992). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice-cream for use as probiotic food. *Journal of Dairy Science*, 75(6), 1415–1422.

Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M. R., Yarmand, M. S., & Razavi, S. H. (2008). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of symbiotic ice-cream. *Food Chemistry*, 111(1), 50–55.

Instituto Adolfo Lutz. Normas Do Instituto Adolfo Lutz. (1976). *Métodos químicos e físicos de análise de alimentos*. 2 ed. São Paulo.

Kailasapathy, K., & Chin, J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.. *Immunology and Cell Biology*, 78, 80–88.

Kailasapathy, K., & Sultana, k. (2003). Survival and b-D-galactosidase activity of encapsulated and free *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in ice cream. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58(3), 223–227.

KATO, N.M., (2002). Propriedades Tecnológicas de Formulações de Sorvete contendo Concentrado Protéico de Soro (CPS). *Dissertação de Mestrado UFRRJ*.

Keব্য, K. M. K., Hussein, S. A., & Badawi, R. M. (1998). Improving viability of bifidobacterium and their effect on frozen ice milk. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 26, 319–337.

Linders, L. J. M, Jong, de G. I. W., Meerdink, G., Riet, K. V. (1997). Carbohydrates and the dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*: The role of moisture distribution and water activity. *Journal of Food Engineering*, 31, 237-250.

Meilgaard, M., Civille, G. V., & Carr, B. T. (1999). Selection and training of panel members. *In Sensory evaluation techniques (3rd ed., pp. 146–172)*. New York: CRC Press.

Miguel, D.P.; Rossi, E.A. (2003). Viabilidade de bactérias ácido lácticas em sorvetes de iogurte durante o período de estocagem. *Alimentos e Nutrição, v.14*, p.93-96.

Oliveira, A.; Silva, M.; Sobral, P.; Oliveira, C.; Habitante, A. (2005). Propriedades físicas de misturas para sherbets de mangaba. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 40*, p. 581-586.

Oliveira, K. H.; Souza, J. A. R; Monteiro, A. R. (2008). Caracterização reológica de sorvetes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 28 (3): 592-598*, jul.-set.

Sanders, M.E., Klaenhammer, T.R. (2001). Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J. Dairy Sci., Savoy, v.84*, p.319-331, 2001.

SAS. (1996). *SAS user's guide: statistics, version 6.12 ed.* Gary, NC: SAS Institute

Shah, N. P.; Lankaputhra, W. E. V.; Britz, M. L.; Kyle, W. S. A. (1995). Shah, N.P. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science, v.83, n.4*, p.894-907.

Shah, N. P., & Ravula, R. R. (2000). Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *Australian Journal of Dairy Technology, 55*, 139–144.

Shortt, C. (1998). Living it up for dinner, *Chem Ind*, 300–303. Valsiljevic, T.; Shah, NP. (2008). Probiotics-from metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal, v.18, n.7*, p.714-728.

Zayed, G., & Roos, Y. H. (2004). Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subject to freeze-drying and storage. Proc. Biochem. 39, 1081-1086.

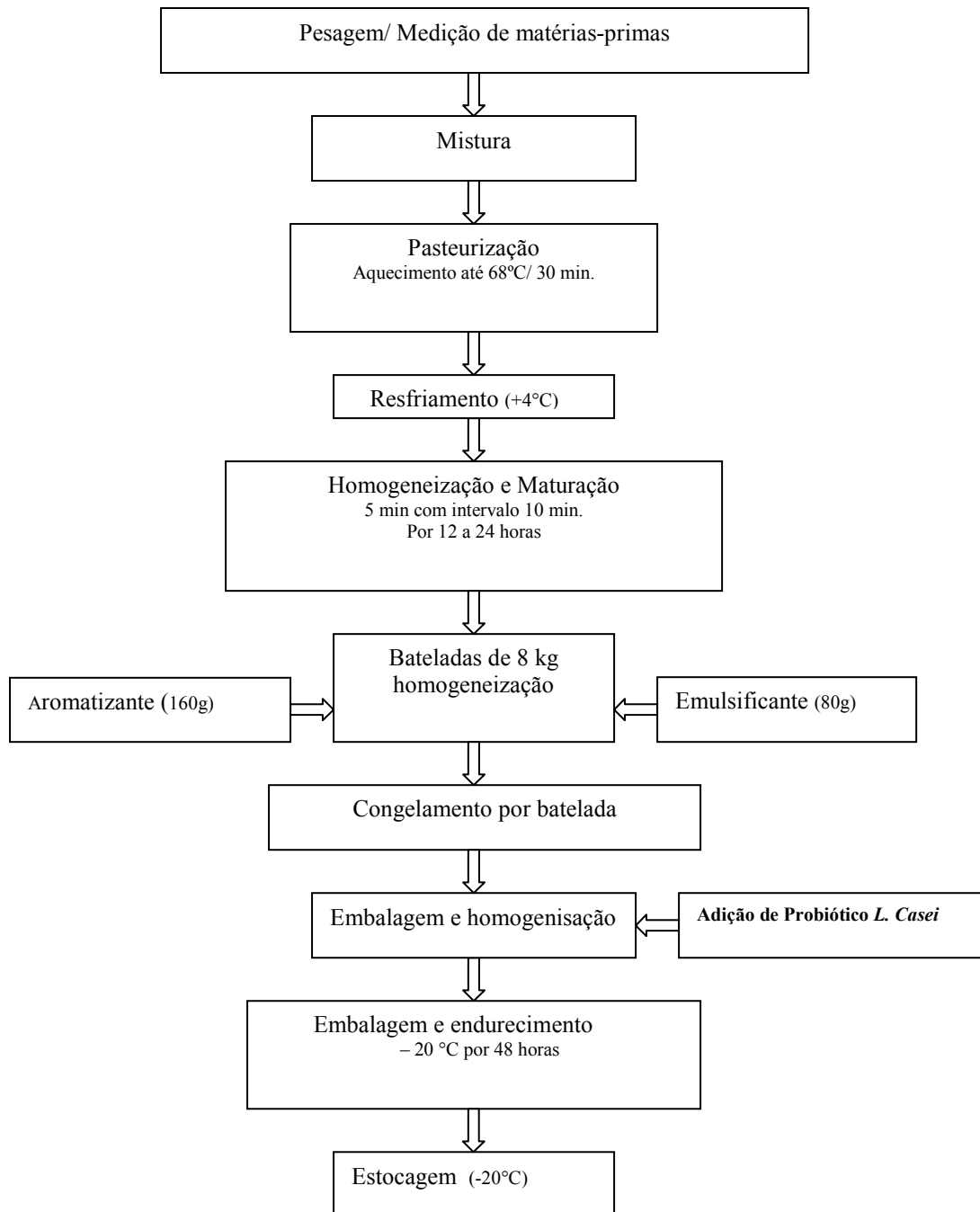


Figura 1. Fluxograma do processamento do sorvete

Tabela 1. Resultados médios da composição centesimal (%)

Experimentos	Sólidos totais	Cinzas	Gordura	Proteínas	Carboidratos
Controle	41,18 ^b ±0,20	0,40 ^c ±0,28	5,0 ^a ±0,11	3,91 ^b ±0,12	32,49 ^b ±0,11
Livre	30,54 ^c ±0,11	0,57 ^b ±0,26	5,0 ^a ±0,21	3,70 ^b ±0,17	21,27 ^c ±0,15
Protegido	57,40 ^a ±0,09	1,69 ^a ±0,15	5,0 ^a ±0,22	5,69 ^a ±0,34	45,02 ^a ±0,16

Tabela 2. Viabilidade do *L. casei* em sorvete durante 102 dias de armazenamento à -20°C.

Amostras	Dias de armazenamento					
	0 dias (72h)	14 dias	28 dias	42 dias	63 dias	102 dias
L. casei livre	10,18	9,73	9,36	9,36	8,86	8,80
L. casei com proteção celular	9,77	8,88	8,88	8,06	8,20	8,15

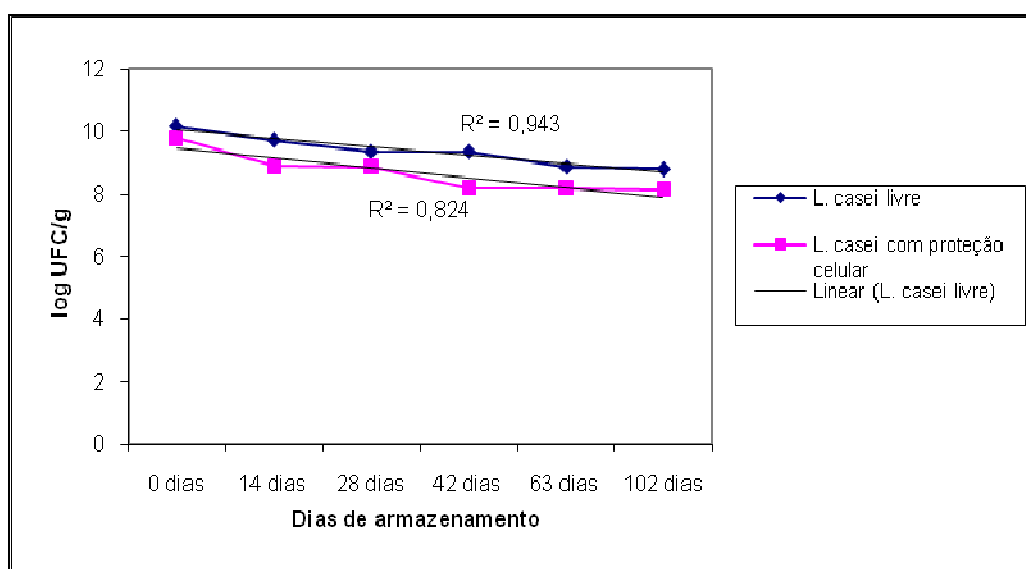


Figura 2. Viabilidade do *L. casei* em sorvete durante 102 dias de armazenamento à -20°C.

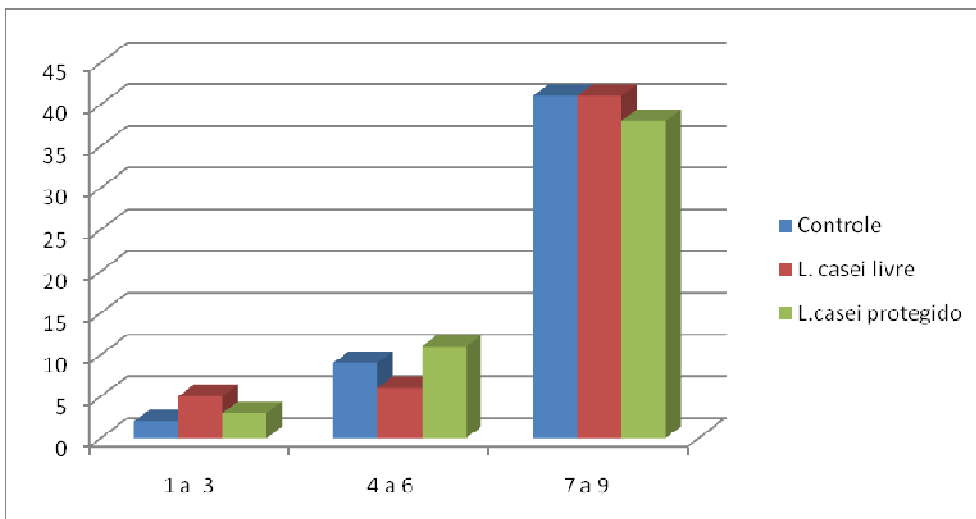


Figura 3. Histograma de frequência do atributo sabor de sorvetes controle, com adição de *L. casei* livre e protegido.

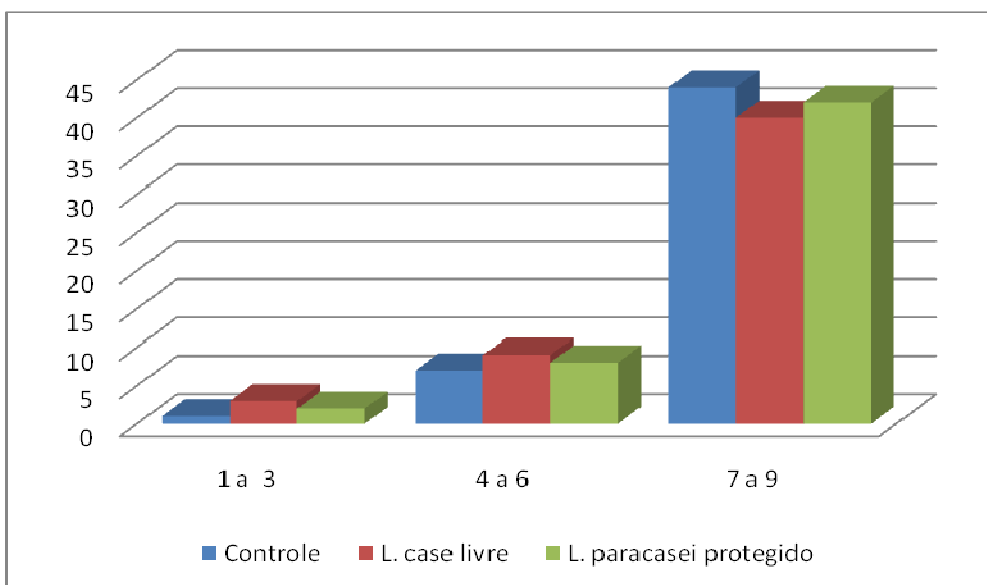


Figura 4. Histograma de frequência do atributo consistência de sorvetes controle, com adição de *L. casei* livre e protegido.

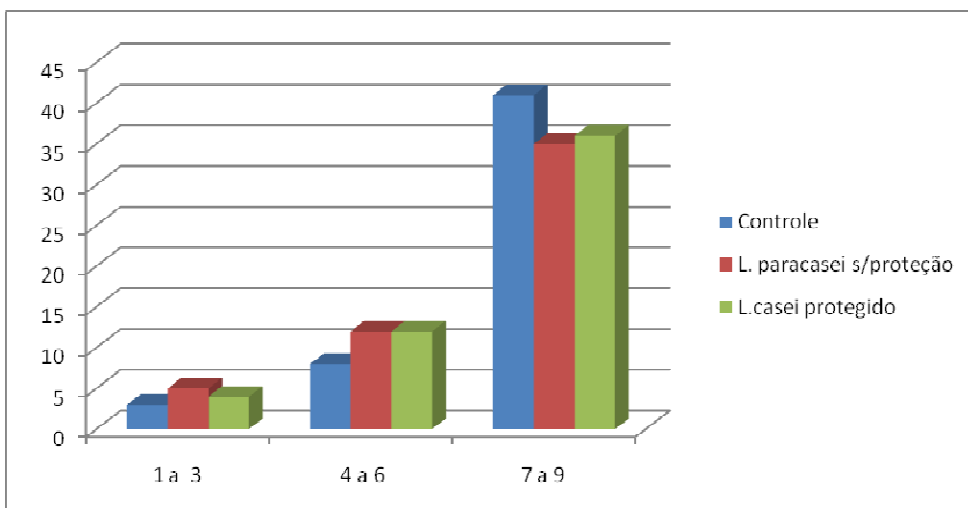


Figura 5. Histograma de frequencia do atributo aparência de sorvetes controle, com adição de *L. casei* livre e protegido.

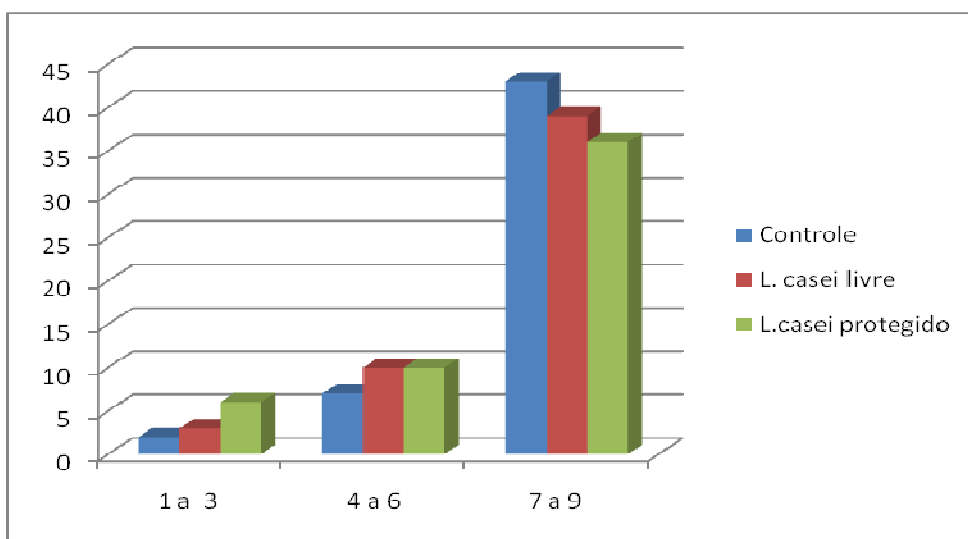


Figura 6. Frequencia de aceitação dos sorvetes controle, com adição de *L. casei* livre e protegido.

Conclusão Geral

O sorvete mostrou ser um bom veículo para a adição de microrganismo probiótico, o *L.casei* se manteve viável durante 102 dias de armazenamento.

A melhor resposta na proteção celular corresponde às concentrações de 5% de trehalose e 4.5% de goma acácia respectivamente e pelos resultados obtidos pode-se concluir que o sorvete elaborado com adição de microrganismo probiótico, especificamente o *L. casei* protegido (goma acácia e trehalose), demonstrou eficiente alternativa para adição de probióticos em sorvete. A adição do *L.casei* livre ou protegido não afetou as características sensoriais do sorvete. Apesar disto, outras pesquisas deverão se conduzidas para validar estes resultados e sua eficácia clínica.