UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

**Desenvolvimento de sorvetes probióticos à base de extrato
solúvel de soja**

LUDMILA CARRIL FERNÁNDEZ

Lorena – SP
2015

LUDMILA CARRIL FERNÁNDEZ

**Desenvolvimento de sorvetes probióticos à base de extrato
solúvel de soja**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha

Edição reimpressa e corrigida

Lorena – SP

Junho, 2015

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Fernández, Ludmila Carril

Desenvolvimento de sorvetes probióticos à base de extrato solúvel de soja / Ludmila Carril Fernández; orientador Ismael Maciel de Mancilha - ed. reimp., corr. - Lorena, 2015.
86 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2015
Orientador: Ismael Maciel de Mancilha

1. Extrato solúvel de soja. 2. Lactobacillus delbrueckii ufv h2b20. 3. Sorvete probiótico. I. Título. II. Mancilha, Ismael Maciel de , orient.

Dedico esta dissertação aos meus pais, Adriana e Telmo,
e às minhas avós Manuela e Bienvenida, por todo apoio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amparar nos momentos difíceis e me dar forças para seguir em frente.

Ao meu orientador, prof. Ismael Maciel de Mancilha, pelos ensinamentos, pela amizade, paciência, pelas correções e sugestões para o aprimoramento do trabalho, além da confiança depositada em mim.

Ao prof. Gerônimo Virginio Tagliaferro, pela ideia do projeto de pesquisa e disposição em auxiliar.

À empresa Olivebra Industrial S.A que cedeu gentilmente os extratos solúveis de soja.

Ao Valdir Junior, Toninho e à MR Sorvetes pela disponibilidade de utilização dos equipamentos, matérias-primas e funcionários para a produção dos sorvetes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e aos professores Alcinéia e Eduardo Ramos, que estiveram sempre presentes em minha formação desde a graduação e cederam gentilmente seu laboratório para realização dos experimentos de composição centesimal dos sorvetes.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Probióticos, Cláudio, Aline, Flávio, Rafaela, Moysés e Juan por contribuírem com seus conhecimentos e me auxiliar na realização deste trabalho, além da amizade e dos momentos de descontração.

Ao pessoal da Microcervejaria da EEL pela disponibilidade de utilização do laboratório de análise sensorial de bebidas.

Aos amigos que conquistei durante as disciplinas do mestrado no Departamento de Biotecnologia Industrial (DEBIQ), ao Omar, Maiara, Maria Fernanda, Sara, Angela, Andrés e Orerves.

À turma do espanhol que fizeram meus horários de almoço muito mais divertidos, ao Felipe, Rafael, Germano, Isabela, Gabi, Fernanda e Larissa Brumano.

Aos meus amigos da graduação que sempre estiveram presentes de alguma forma, à Mayara que sempre esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis, me dando apoio e coragem para continuar. Ao Douglas pela amizade mesmo que distante, e por todo auxílio na parte experimental realizada na UFLA.

Aos meus pais, Telmo e Adriana, por todo incentivo e força para realização do mestrado, além de todo amor e carinho incondicionais.

Às minhas avós, Bienvenida e Manuela, que sempre me apoiaram e incentivaram minha carreira acadêmica.

A toda minha família e amigos que me apoiaram e torceram pela finalização deste trabalho.

Ao João Carlos, Maria e Bruna Karadi que se tornaram uma segunda família para mim. Obrigada pelo apoio, carinho e pelos momentos de descontração e alegria.

Ao André, pelo amor, companheirismo, incentivo, amizade, descontração e ajuda nos momentos difíceis.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

BIOGRAFIA

LUDMILA CARRIL FERNÁNDEZ, filha de Adriana Dias Carril e Telmo Vicente Fernández, nasceu no Rio de Janeiro em 10 de outubro de 1988.

Em 2006, formou-se como Técnica em Química pelo Colégio Técnico de Lorena - COTEL/EEL-USP.

Em 2012, graduou-se em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Lavras – UFLA. Nesse mesmo ano, iniciou a pós-graduação em nível de Mestrado em Biotecnologia Industrial junto a Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo (EEL/USP), na área de concentração de Microbiologia Aplicada.

Em 2014, concluiu o curso de Especialização em Engenharia da Qualidade pela Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

RESUMO

FERNANDEZ, L. C. **Desenvolvimento de sorvetes probióticos à base de extrato solúvel de soja.** 2015. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

Sorvetes são alimentos que apresentam grande potencial como veículo de espécies de micro-organismos probióticos, tendo em vista que apresentam elevada aceitabilidade em todas as faixas etárias. Os alimentos elaborados a base de soja se destacam no mercado devido às inúmeras evidências científicas sobre seus efeitos benéficos à saúde humana. Desta forma, no presente trabalho objetivou-se o desenvolvimento de sorvetes probióticos formulados com diferentes extratos solúveis de soja (*in natura* e fermentados), utilizando-se a cepa *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20. Primeiramente, avaliou-se o desempenho fermentativo (pH e acidez titulável) de 5 cepas de *Lactobacillus* em meio formulado com os extratos solúveis de soja ESL e ES60, cujos resultados demonstraram que estes extratos são adequados para a formulação de meios de fermentação. Na sequência foram processados sorvetes probióticos formulados com os respectivos extratos *in natura* (ESL e ES60) e fermentado (ESL F e ES60 F) por *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20. Nos sorvetes confeccionados com os extratos na forma *in natura*, uma suspensão de células da referida cepa foi adicionada à calda previamente ao processo de batimento e congelamento. Os sorvetes foram estocados a -23 °C por 5 meses e avaliados periodicamente quanto às características físico-químicas (pH, acidez titulável, composição centesimal e overrun), microbiológica (viabilidade celular) e sensoriais. Os resultados demonstram que a cepa de *Lactobacillus* avaliada foi capaz de fermentar os açúcares presentes nos respectivos extratos de soja produzindo ácido láctico, atingindo a concentração de 0,90% no meio formulado com o extrato de soja desengordurado ES60. Os sorvetes confeccionados com os respectivos extratos fermentados apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) quanto ao pH e acidez titulável em relação aos sorvetes com extratos *in natura*, atingindo valores de pH inferiores a 4,0 com produção máxima de ácido láctico de 1,36%. A composição centesimal dos sorvetes desenvolvidos está de acordo com o padrão mínimo estabelecido pela ANVISA, apresentando uma composição média de 2,5% de proteínas, 5,0-6,0% de gordura e 36,0% de sólidos totais. As características probióticas dos sorvetes estudados foram preservadas, apresentando contagens de células viáveis superiores a 10^6 UFC/g, com redução do número de células inferior a um ciclo logarítmico ao longo de 150 dias de estocagem a -23°C. A análise sensorial revelou que os sorvetes formulados com os respectivos extratos *in natura* não apresentaram diferenças significativas entre si ($P > 0,05$) para os atributos avaliados e apresentaram maior aceitabilidade, sendo o sorvete formulado com o extrato ESL o que obteve maior aceitação, com médias acima de 6,0 correspondente a “gostei ligeiramente”. Os resultados demonstraram ainda que a fermentação dos extratos interferiu negativamente nas características sensoriais dos respectivos sorvetes, apresentando diferenças significativas em relação aos extratos *in natura*, além de resultar nos menores escores de aceitação, tendo o sorvete fermentado ES60 F sido avaliado como “desgostei moderadamente”. Estes resultados permitem concluir que o extrato solúvel de soja é um insumo adequado para a formulação de meio de cultivo de espécies de micro-organismos probióticos, além de apresentar potencial para a confecção de sorvetes probióticos mediante adaptações da tecnologia de produção de gelados comestíveis.

Palavras-chave: Extrato solúvel de soja, *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20, sorvete probiótico.

ABSTRACT

FERNANDEZ, L. C. **Development of probiotic ice cream from soluble soybean extract**. 2015. 86p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

Ice creams are foods that have great potential as a vehicle for species of probiotic microorganisms due to its high acceptability by all age people. Foods made with soybeans byproducts stand out in the market due to the numerous scientific evidences that show its beneficial effects on human health. Therefore, this study aimed to the development of probiotic ice cream formulated with different soybean soluble extracts (*in natura* and fermented), using the strain *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20. Primarily, it was evaluated the fermentation performance (pH and titratable acidity) of 5 *Lactobacillus* strains in media formulated with soluble soybean extracts ESL and ES60 (Olivebra®), and the results showed that these soybean byproducts are suitable for the formulation of fermentation media. The probiotic ice cream were formulated with the soybean extracts *in natura* (ESL and ES60) and fermented (ESL F and ES60 F) by *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20. For the manufacture of ice cream with the soybean extracts *in natura*, a cell suspension was added to the basic ice cream formulation before beating and freezing procedures. The ice creams were stored at -23 ° C for 5 months and evaluated periodically regarding the physico-chemical characteristics (pH, titratable acidity, chemical composition and *overrun*), microbiological (cell viability) and sensorial evaluation. The results shown that the *Lactobacillus* strain were capable to metabolize the sugars presented in the soluble soybean extracts producing lactic acid reaching a concentration of 0.90% in the media formulated with defatted soybean extract ES60. The ice creams made with fermented extracts showed significant differences ($P < 0.05$) regarding pH (< 4.0) and titratable acidity (1,36%) in relation to the ice creams manufactured with extracts *in natura*. The results concerned to the chemical composition of the ice cream, showed that the values obtaneid are in accordance with those stablished by ANVISA, presenting an average composition of 2.5% protein, 5,0-6,0% fat and 36,0% total solids. The probiotic characteristics, of the formulated ice creams, were preserved presenting viable cell counts greater than 10^6 UFC/g, and a decreasing in the cell number lower than one log cycle after 150 days of storage at -23 °C. Regarding the sensorial evaluation, the results revealed that the ice creams formulated with soybean extracts *in natura* showed no significant differences between them ($P > 0.05$) for the evaluated attributes and they showed higher acceptability. The ice cream formulated with ESL extract presented higher acceptance, with average notes greater than 6.0, corresponding to "like slightly". The results also showed that the fermentation of the extracts influenced negatively on the sensory properties of the ice cream, showing significant differences regarding the ice cream made with the extracts *in natura*, and lower acceptance scores, being the fermented ice cream ES60 F evaluated as "moderately disliked". These results indicate that the soluble soybean extracts evaluated in the present work are suitable for culture medium formulation for probiotic microorganisms, and also shown its potential for making probiotic ice cream by adaptation of the technology.

Keywords: Soluble soy extract, *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20, probiotic ice cream.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Probióticos	15
2.1.1 Gênero <i>Lactobacillus</i>	18
2.1.2 Alimentos Probióticos.....	20
2.2 Soja	23
2.3 Extrato Solúvel de Soja.....	26
2.4 Sorvete	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Extrato Solúvel de soja	36
3.2 Micro-organismos	37
3.3 Avaliação do desempenho das culturas lácticas em meio formulado com extrato solúvel de soja.....	38
3.4 Elaboração do Sorvete Probiótico.....	38
3.4.1 Elaboração de sorvetes probióticos à base de extrato solúvel de soja fermentado	40
3.4.2 Elaboração de sorvetes probióticos à base de extrato solúvel de soja <i>In Natura</i>	40
3.4.3 Avaliação Sensorial	42
3.5 Métodos Analíticos	44
3.5.1 Determinação da população de células viáveis.....	44
3.5.2 Análises Físico-químicas	44
3.5.2.1 pH e Acidez Titulável	44
3.5.2.3 Composição Centesimal.....	44
3.5.3 Determinação do <i>Overrun</i>	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Avaliação do desempenho das cepas de <i>Lactobacillus</i> em meios formulados com extratos solúveis de soja	48
4.1.1 pH e Acidez titulável	48
4.3 Avaliação dos Sorvetes Probióticos.....	51
4.3.1 Caracterização dos extratos de soja fermentados por <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20	51
4.3.2 População de células viáveis.....	52
4.3.2 pH e Acidez Titulável	55

4.3.3	Avaliação da composição centesimal dos sorvetes	56
4.3.4	Determinação do Overrun	58
4.3.5	Avaliação sensorial dos sorvetes probióticos.....	59
5	CONCLUSÕES.....	65
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	65
	REFERÊNCIAS	67
	APÊNDICE A	80
	APÊNDICE B	82

1. INTRODUÇÃO

A constante preocupação com a saúde, bem-estar e melhoria da qualidade de vida tem sustentado o desenvolvimento de alimentos funcionais, os quais, além de nutritivos, estimulam as atividades fisiológicas e/ou metabólicas do organismo, trazendo benefícios para o indivíduo destacando-se os alimentos probióticos, prebióticos e simbióticos. Devido ao potencial deste mercado, a indústria de alimentos tem sido estimulada a desenvolver novos produtos funcionais para atender um mercado competitivo e exigente.

Os alimentos probióticos fazem parte do grupo de alimentos funcionais, são constituídos por micro-organismos vivos e quando consumidos regularmente em quantidades suficientes, conferem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro.

Os micro-organismos probióticos quando ingeridos, alcançam o intestino e são somados à microbiota já existente, promovendo o equilíbrio desta microbiota e auxiliando a absorção de nutrientes. Dentre suas funções benéficas à saúde, esses micro-organismos auxiliam na atividade digestória, cardiovascular, metabólica e imunomoduladora. Assim, produzem efeitos como o aumento da tolerância à lactose, o tratamento de diarreia, o estímulo na absorção de determinados nutrientes como o cálcio, a modulação da microbiota intestinal após tratamento com antibióticos e alívio da constipação.

Os iogurtes e outros leites fermentados são os alimentos mais comuns que podem ser suplementados com micro-organismos probióticos, no entanto, o sorvete é também uma alternativa de veículo destes micro-organismos além de ser um produto de boa aceitação pelos consumidores de todas as faixas etárias. Estudos têm demonstrado que é possível a incorporação de micro-organismos probióticos na formulação de sorvetes, sem alteração das suas propriedades e características sensoriais, mantendo a quantidade de micro-organismos viáveis durante o processamento e estocagem.

O leite de vaca tem sido utilizado como base para a formulação de sorvete probiótico, porém, tendo em vista a ocorrência de intolerância à lactose, observada em mais da metade da população mundial adulta, uma das alternativas para esta anomalia seria o uso do extrato solúvel de soja suplementado com culturas probióticas para formulação desse produto.

Tem sido demonstrado que o extrato solúvel de soja, como meio de fermentação láctica, pode atuar como veículo apropriado para espécies de micro-organismos probióticos resultando em produtos não lácteos sensorialmente aceitáveis pelo consumidor. Desta

maneira, espécies de bactérias probióticas como *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* vêm sendo utilizadas para fermentação do extrato solúvel de soja, obtendo-se bebidas probióticas com características sensoriais aceitáveis.

Diante do exposto, no presente trabalho objetivou-se contribuir para o desenvolvimento de tecnologia para produção de sorvete probiótico formulado à base de extrato solúvel de soja. Especificamente, avaliou-se o desempenho de cepas de micro-organismos probióticos em meio formulado à base de extrato solúvel de soja. Estudou-se também a utilização do extrato solúvel de soja (*in natura* e fermentado) como ingrediente para a formulação de mistura para fabricação de sorvete probiótico. Este sorvete foi avaliado por meio do estudo da viabilidade de micro-organismos probióticos ao longo da vida de prateleira, de suas características físico-químicas e de sua aceitação por meio da análise sensorial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Probióticos

Em 1907, Elie Metchnikoff, cientista russo que recebeu o Prêmio Nobel de Medicina em 1908 e professor do Instituto Pasteur, fez observações relevantes sobre o papel positivo desempenhado por algumas espécies de bactérias (FAO/WHO, 2001). Desta forma, postulou que as bactérias ácido-láticas conferem benefícios à saúde resultando na longevidade do indivíduo. Além disso, sugeriu que a “auto-intoxicação” intestinal poderia ser suprimida pela modulação da microbiota intestinal por meio da substituição de espécies de micro-organismos produtores de substâncias tóxicas por micro-organismos úteis ou benéficos à saúde (OMGE, 2008).

Probiótico é uma palavra de origem grega, que significa “para a vida” e foi usada pela primeira vez para descrever uma substância microbiana que estimulava o crescimento de outros micro-organismos (LILLEY; STILLWELL, 1965). Parker (1974) foi o primeiro a usar a palavra probiótico no contexto de suplementação animal e a definiu como organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal. Fuller (1989) definiu probiótico como um suplemento alimentar contendo micro-organismos vivos que afetam o hospedeiro de forma benéfica, equilibrando a microbiota intestinal.

Diversas outras definições para o termo “probiótico” foram mencionadas por Sanders (2003), entretanto, a definição mais amplamente aceita pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO/WHO, 2001) é a de que “probióticos são micro-organismos vivos, que administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”.

Existem alguns critérios que são adotados para a seleção de cepas de micro-organismos probióticos, com ênfase para a resistência ao ácido biliar; ser de origem humana; apresentar a capacidade de se fixar nas células epiteliais intestinais; colonizar o trato gastrointestinal humano; produzir substâncias antimicrobianas, incluindo bacteriocinas; além de boas características de crescimento e conferir efeitos benéficos à saúde humana (FRIGHETTO, 2012; MONDRAGÓN-BERNAL, 2004). Uma das características mais importantes de uma cepa de micro-organismo probiótico é não ser

patogênica e deve ser considerada como segura - GRAS – “generally recognized as safe” (GRANATO et al., 2010).

Os micro-organismos probióticos não devem ser patogênicos e tóxicos, devem apresentar atividade antimutagênica ou anticarcinogênica no organismo hospedeiro, atividade antagonista sobre espécies patogênicas e ser geneticamente estáveis, especialmente em relação à resistência a antibióticos, devem resistir às condições do trato gastrointestinal e apresentar a capacidade de se aderir e colonizar a mucosa do intestino, além de promover efeito imunomodulador sem efeitos inflamatórios (SAARELA et al., 2000).

Quando empregados em alimentos com alegação de propriedade funcional, os micro-organismos probióticos devem apresentar resistência às operações de processamento como desidratação, congelamento e liofilização, e apresentar viabilidade durante o período de estocagem do produto (FRIGHETTO, 2012).

Para garantir a sobrevivência desses micro-organismos probióticos e sua atividade metabólica no hospedeiro, é fundamental que as cepas apresentem resistência aos níveis de acidez, bile e enzimas do trato gastrointestinal (ALAMPRESE et al., 2002).

Nos últimos anos tem sido observado um aumento no interesse por alimentos probióticos tanto pela comunidade científica como pela população devido ao seu papel na saúde humana (TIBANQUIZA, 2011). Vários benefícios à saúde são atribuídos à ingestão de alimentos probióticos, conforme mostrado na Tabela 1, que segundo a FAO/WHO (2001), Mercenier et al. (2002) e Sanders (2003), apresentam evidências científicas suficientes para confirmar o potencial desses benefícios para a saúde devido ao consumo destes alimentos. No entanto, os autores consideram que é necessário dados de pesquisas adicionais para confirmar um número desses benefícios à saúde em seres humanos, seguindo as diretrizes para a avaliação de probióticos sugeridas pela FAO/WHO (2001).

Segundo Drago et al. (1997), algumas espécies do gênero *Lactobacillus* apresentam efeito antagonico sobre algumas espécies patogênicas como *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* e *Serratia marcescens*.

Espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais utilizadas, não exclusivamente como micro-organismos probióticos vendidos na forma de cápsula, mas em uma variedade de alimentos probióticos contendo esses micro-organismos que já estão disponíveis para o consumidor (FAO/WHO, 2001).

Algumas espécies de micro-organismos probióticos dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus* são regulamentadas pela ANVISA para aplicação em

alimentos com alegação de propriedade funcional, conforme (Tabela 2). Entretanto, *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, espécies envolvidas na produção de iogurte, foram retiradas da lista por não apresentarem efeito probiótico cientificamente comprovado (BRASIL, 2002; BRASIL, 2008).

Porém, segundo a Organização Mundial de Gastroenterologia (OMGE) em 2008 foi demonstrada melhoria na digestão da lactose e redução dos sintomas relacionados à sua intolerância, em indivíduos que consumiam iogurte contendo células viáveis de *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Além disso, a OMGE (2008) reportou que estes micro-organismos associados a *L. casei* DN-114 001 em leite fermentado em quantidades de 10^{10} UFC, administradas duas vezes ao dia, auxiliam na prevenção da diarreia associada a antibióticos e na prevenção da diarreia em adultos causada por *Clostridium difficile*.

Tabela 1. Efeitos benéficos associados aos micro-organismos probióticos em humanos.

Prevenção de diarreia causada por certas bactérias e vírus patogênicos

Supressão de infecção por *Helicobacter pylori*

Manutenção da microflora intestinal normal

Melhoria do sistema imunológico

Redução da intolerância à lactose

Redução dos níveis de colesterol

Redução de doenças cardiovasculares

Redução de alergias

Atividade antimutagênica, anticarcinogênica e antitumorogênica

Melhoria do valor nutricional dos alimentos

Alívio da constipação intestinal

Prevenção da infecção urogenital

Prevenção da diarreia dos viajantes

Redução da ocorrência de diarreia induzida por antibióticos

Prevenção contra câncer de cólon e bexiga

Prevenção da osteoporose

FONTE: adaptado de Lourens-Hattingh; Viljoen (2001); FAO/WHO (2001).

É importante salientar a necessidade do consumo de uma quantidade mínima diária de células de micro-organismos probióticos para que estas apresentem efeitos benéficos no trato gastrointestinal, sendo a dose mínima recomendada situada na faixa de 10^8 - 10^9 UFC, correspondente a 100g de produto que contenha de 10^6 - 10^7 UFC/g (BRASIL, 2008; LEE; SALMINEN, 1995; MOROTI et al., 2009). Desta forma, esses micro-organismos devem ser mantidos viáveis durante a vida de prateleira do produto (MOROTI et al., 2009).

Tabela 2. Espécies de micro-organismos probióticos aprovados pela ANVISA.

Lactobacillus acidophilus

Lactobacillus casei variedade *shirota*

Lactobacillus casei variedade *rhamnosus*

Lactobacillus casei variedade *defensis*

Lactobacillus paracasei

Lactococcus lactis

Bifidobacterium bifidum

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

Bifidobacterium longum

Enterococcus faecium

FONTE: adaptado de BRASIL (2002); BRASIL (2008).

2.1.1 Gênero *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* é um grupo heterogêneo de bactérias gram-positivas, não formadoras de esporos e microaerófilas. Essas bactérias são de grande importância para o homem, pois são membros essenciais de uma microbiota humana saudável em diversos nichos e servem como elementos importantes de uma dieta humana saudável (LAHTINEN et al., 2011).

Lahtinen et al. (2011) afirmam que o trato gastrointestinal de animais é um importante nicho ecológico dos lactobacilos. Os autores complementam ainda que estes micro-organismos podem também ser isolados de várias outras fontes como a microbiota vaginal e o leite materno, bem como a partir de plantas e do solo, sendo que algumas espécies são empregadas na produção de alimentos fermentados.

Baseado em suas vias de fermentação, as espécies de *Lactobacillus* podem ser agrupadas em homoláticas e heteroláticas. Segundo Lahtinen et al. (2011), a via homofermentativa é baseada na glicólise ou via Embden-Meyerhof, com formação de somente ácido láctico e 2 mols de ATP por mol de glicose consumida, enquanto na via heterofermentativa também conhecida como via pentose-fosfato, hexose monofosfato ou 6-fosfogluconato, além de ácido láctico, são formadas quantidades significativas de CO₂ e etanol ou acetato.

Silva et al. (2007) e Lahtinen et al. (2011) classificam o *L. acidophilus* e o *L. delbrueckii* como bactérias homoláticas, o *L. casei* e o *L. plantarum* como heteroláticas facultativas e o *L. fermentum* como espécie obrigatoriamente heterolática.

De acordo com Silva et al. (2007), espécies de bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus* requerem aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos, derivados de ácidos nucléicos, vitaminas, sais e carboidratos fermentáveis para seu crescimento. Bergey e Holt (1994) afirmam que esses micro-organismos crescem entre 27 a 40 °C sendo a temperatura ótima de crescimento de 37 °C e pH ótimo de 4,5.

A cepa de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20 foi isolada na Universidade Federal de Viçosa a partir de fezes de recém-nascidos amamentados exclusivamente com leite materno por Santos (1984). Devido ao seu perfil de fermentação de açúcares e da origem no trato digestivo humano, Magalhães et al. (2008) reportaram que esta linhagem foi originalmente considerada como *L. acidophilus* e que posteriormente passou a ser classificada como *L. delbrueckii* após a análise sequencial de genes e ensaios de hibridização DNA-DNA, apresentando valores de reassociação de DNA superior a 75% para *L. delbrueckii* subsp. *lactis* e *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, indicando assim, que as linhagens pertencem a uma mesma espécie.

Estudos como os de Neuman et al. (1998), Sumita (2007) e Conceição (2012) tem demonstrado o potencial probiótico de *L. delbrueckii* UFV H2B20, nos quais esta cepa apresentou características promissoras como probiótico devido a sua resistência *in vitro* a condições do trato gastrointestinal, como a presença de ácido clorídrico e altas concentrações de sais biliares, além de produção de peróxido de hidrogênio em concentrações inibitórias para micro-organismos patogênicos. Neuman et al. (1998) observaram ainda que essa bactéria foi capaz de colonizar o trato gastrointestinal e estimular a resposta imune não específica em camundongos suíços, enquanto Santos (2011) observou que esse mesmo micro-organismo protegeu estes camundongos contra infecção por *Listeria monocytogenes*.

Araújo et al. (2010) avaliaram o comportamento das células de *L. delbrueckii* UFV H2B20 incorporadas em queijo cottage simbiótico durante 20 dias de estocagem a 5 °C, o qual exibiu níveis de células probióticas superiores ao recomendado para produzir efeitos benéficos à saúde do consumidor. Além disso, a concentração de inulina adicionada no queijo simbiótico foi suficiente para defini-lo como um alimento prebiótico. Os autores observaram que a bactéria probiótica exibiu boa sobrevivência sob condições simuladas do trato gastrointestinal, e concluíram que as características do queijo simbiótico provavelmente protegeram o micro-organismo durante sua exposição a baixo pH e altas concentrações de sais biliares, demonstrando assim que o queijo cottage simbiótico apresentou potencial para ser usado como um alimento funcional.

Leandro et al. (2013) avaliaram a sobrevivência do *L. delbrueckii* UFV H2B20 em três formulações de sorvete (baixa gordura, livre de gordura e alta gordura) após processamento e estocagem a -16 °C. Os autores observaram que a sobrevivência do micro-organismo estudado não foi afetada após processamento e durante 40 dias de estocagem, independente da formulação. *L. delbrueckii* foi capaz de sobreviver nas três formulações de sorvete quando exposto a condições de estresse ácido e de sais biliares. Os resultados demonstraram o potencial do *L. delbrueckii* UFV H2B20 para ser usado em sorvetes e sua capacidade de resistência ao estresse ácido e crescimento em presença de sais biliares.

2.1.2 Alimentos Probióticos

Para suprir a crescente demanda por alimentos funcionais, a indústria alimentícia tem desenvolvido novos produtos probióticos contendo cepas específicas de bactérias lácticas tais como *L. acidophilus*, *L. casei*, *B. longum*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. crispatus*, *L. plantarum*, *B. animalis* e *B. lactis* (GRANATO et al., 2010).

Segundo Granato et al. (2010), uma grande variedade de bebidas probióticas tem sido desenvolvida. No entanto, os autores ressaltam que este mercado ainda apresenta enorme potencial de crescimento, sendo que a maioria dos produtos disponíveis no mercado consiste de iogurtes ou leites fermentados com *B. animalis* e *L. acidophilus*.

De acordo com Alamprese et al. (2002) e Komatsu et al. (2008), o procedimento de congelamento nas etapas de preparo de produtos como *frozen yogurt* e sorvete, pode causar

danos para as células microbianas, como a morte dos micro-organismos, inibição do seu desenvolvimento e redução ou interrupção da atividade metabólica. Entretanto, Alamprese et al. (2002) relatam que outros estudos têm demonstrado que as baixas temperaturas de estocagem podem garantir uma taxa de sobrevivência de micro-organismos probióticos elevada, e que a mortalidade desses micro-organismos aumenta com o tempo de armazenamento do produto.

Alamprese et al. (2002) estudaram a viabilidade de micro-organismos probióticos durante 8 meses de estocagem a -16 °C e a -28 °C em sorvetes adicionados de *Lactobacillus johnsonii* La1, formulados com diferentes concentrações de açúcar e gordura. Os autores observaram que, independentemente da formulação do sorvete, as taxas de sobrevivência da cepa de *Lactobacillus johnsonii* La1 foram elevadas independente das concentrações de açúcar e gordura estudadas, apresentando de 85% a 100% de sobrevivência ao longo dos 240 dias de estocagem na temperatura de -28 °C.

Romano et al. (2012) avaliaram os efeitos da adição de inulina em diferentes concentrações na sobrevivência dos probióticos em *frozen yogurt* simbiótico com teor reduzido de lactose durante 45 dias de armazenamento a -20 °C. Os autores observaram que a adição de inulina favoreceu a sobrevivência do *L. acidophilus* adicionado, resultando em contagens de células viáveis superior a 10^7 UFC/g, independente da concentração. A análise sensorial dos *frozen yogurt* revelou que 82% dos avaliadores comprariam o produto contra 18% que não o adquiririam devido ao sabor ácido característico do produto.

Gaino et al. (2012) estudaram a viabilidade de *Lactobacillus casei* LC-11 adicionado em requeijão cremoso probiótico após a fusão da massa a 50 °C, durante 28 dias de armazenamento a 4 °C. Os resultados demonstraram que o requeijão probiótico manteve a suas características probióticas ao longo do período de estocagem, apresentando contagem de *L. casei* superior a 10^7 UFC/g. O requeijão probiótico apresentou aceitação sensorial e 82% dos provadores declararam que certamente ou provavelmente comprariam o produto, permitindo a conclusão de que o requeijão estudado pode ser considerado uma boa alternativa de produto lácteo probiótico.

Barbosa (2007) avaliou o comportamento e a viabilidade da bactéria probiótica *Lactobacillus acidophilus* – NCFM durante a fermentação do extrato de soja “Embrapa BRS-213” saborizado com sacarose e polpa de pêssgo, armazenado a 4 °C por 7 dias. Os resultados indicaram que o processo fermentativo ocorreu de maneira adequada, atingindo pH de 4,5 em 9 horas de fermentação. Foi observado que a adição de sacarose e polpa de pêssgo não afetou negativamente as características físico-químicas da bebida à base de

extrato de soja fermentado com *L. acidophilus*, bem como seu potencial probiótico, o qual manteve sua quantidade de células viáveis superior a 10^9 UFC/mL durante 7 dias de armazenamento.

Cichosz, Aljewicz e Nalepa (2014) determinaram a viabilidade do *Lactobacillus rhamnosus* HN001 em queijo tipo Suíço, queijo tipo Holandês e em produtos tipo-queijo durante seu processamento, com 10 semanas de amadurecimento e 3 meses de armazenamento. Os resultados demonstraram que o uso da bactéria probiótica no queijo tipo Holandês e nos produtos tipo-queijo mudou a composição química dos mesmos em relação ao conteúdo de proteína e gordura, porém não afetou a taxa de variação de pH dos queijos e dos produtos tipo-queijo durante a maturação. Os autores observaram que o amadurecimento dos queijos e dos produtos tipo-queijo foi caracterizado por altas taxas de sobrevivência do *L. rhamnosus*, o qual excedeu 10^8 UFC/g após a maturação. Foi observada uma redução não significativa do número de células viáveis durante o armazenamento dos queijos tipo Suíço e tipo Holandês, enquanto foi observado um aumento significativo na contagem de células dos produtos tipo-queijo durante o armazenamento, demonstrando que os queijos avaliados cumpriram os critérios de produtos alimentares potencialmente probióticos.

Céspedes et al. (2013) determinaram a viabilidade em bebidas não lácteas e a resistência a condições gástricas simuladas de cepas probióticas comerciais comumente utilizadas em produtos lácteos, *Lactobacillus casei* LC-01 e *Lactobacillus casei* BGP 93. As bactérias lácticas foram adicionadas em diferentes bebidas não lácteas comerciais e foram monitoradas sua viabilidade e resistência à digestão gástrica simulada durante estocagem a 5 e 20 °C durante 28 dias. Foi observado que para ambas as cepas, pelo menos uma bebida não láctea apresentou contagem de células viáveis da ordem de 10^7 UFC/mL até o final do período de estocagem, apresentando alterações na resistência à digestão gástrica simulada. Os autores concluíram que as culturas probióticas comerciais utilizadas podem ser adicionadas a sucos de frutas comerciais após uma cuidadosa seleção do produto para garantia da viabilidade celular, onde a resistência à digestão gástrica simulada pode ser uma ferramenta de fácil aplicação *in vitro* que contribui para a caracterização do produto auxiliando na escolha da matriz alimentícia.

Ferraz et al. (2012) avaliaram a aceitação sensorial e a sobrevivência do *Lactobacillus acidophilus* em sorvetes tradicionais de baunilha produzidos com diferentes níveis de *overrun* (45%, 60% e 90%). Os sorvetes apresentaram contagem mínima de células viáveis de 6 log UFC/g ao final de 60 dias de armazenamento a -18 °C. Entretanto,

os autores reportaram que níveis elevados de *overrun* influenciaram negativamente a viabilidade celular, sendo reportado um decréscimo de 2 log UFC/g para o tratamento com 90% de *overrun*, mas não foi observada influência sobre a aceitabilidade em relação a aparência, aroma e sabor dos sorvetes. Os autores sugerem a partir dos resultados que baixos níveis de *overrun* podem ser adotados durante o processamento de sorvetes a fim de manter suas características probióticas durante a vida de prateleira.

Santini et al. (2012) desenvolveram um *cream cheese* sabor tomate seco adicionado de *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 e avaliaram a viabilidade da bactéria probiótica e a aceitação sensorial do produto durante 21 dias de estocagem a 5 °C. Os resultados demonstraram que a quantidade de células viáveis manteve-se superior a 10⁷ UFC/g durante todo o período de armazenamento, caracterizando o produto como potencialmente probiótico. O *cream cheese* sabor tomate seco probiótico obteve aceitação pelos consumidores, dos quais 82,6% afirmaram que “certamente comprariam o produto” ou “provavelmente comprariam o produto”.

Bernat et al. (2014) estudaram a fermentação de “leite” de avelã por *Lactobacillus rhamnosus* GG e *S. thermophilus*, variando a concentração de glicose, inulina e inóculo. A vida de prateleira dos produtos foi caracterizada quanto à sobrevivência probiótica e aceitação sensorial a cada 7 dias, durante 28 dias de armazenamento a 4 °C. Os resultados demonstraram que a formulação contendo 3% de glicose, 2,75% de inulina e 6% de inóculo permitiu obter um produto fermentado em 3,5 horas, o qual apresentou altas taxas de sobrevivência (em torno de 10⁸ UFC/g) durante todo o período de armazenamento, podendo ser considerado como um produto funcional. Os autores observaram que a viabilidade do *L. rhamnosus* GG foi reduzida em torno de 35% sob condições gástricas simuladas, e sugerem que a inulina não degradada (prebiótica) presente no produto providencia um valor agregado a este, obtendo-se um produto não lácteo fermentado com características simbióticas. A análise sensorial demonstrou maior preferência pelas amostras armazenadas em menor período de tempo, entretanto, o produto “leite” de avelã fermentado com 28 dias de estocagem também apresentou aceitação pelos provadores.

2.2 Soja

Pereira e Oliveira (2004) relatam que a soja, *Glicine max* (L.) Merrill, é uma oleaginosa originária da Ásia, onde seu cultivo iniciou-se na China por volta de 2800 a.C.

Sua semente era considerada sagrada pelo povo chinês, e somente no século XX a soja se tornou conhecida no Ocidente, onde agricultores americanos iniciaram seu cultivo em larga escala, sendo utilizada principalmente como ração animal. Os autores ressaltaram que quando os óleos comestíveis e as fontes tradicionais de proteínas começaram a se tornar escassos durante a Segunda Guerra Mundial, a soja passou a ser utilizada em produtos destinados ao consumo humano.

Após a chegada da leguminosa ao Brasil em 1908, seu cultivo foi expandido na década de 70, quando o governo brasileiro investiu no cultivo da soja, com incentivos à pesquisa, começando então a serem desenvolvidas cultivares adaptadas para diversas regiões do país (LAZZARI, 2006).

Segundo Daleprane et al. (2009), a soja recebeu maior atenção em relação às pesquisas científicas devido ao seu perfil de nutrientes, pois apresenta carboidratos complexos, proteínas, fibras solúveis e insolúveis, oligossacarídeos e fitoquímicos. Os autores a descrevem como uma fonte rica em proteínas apresentando em sua composição uma média de 30 a 45% de proteínas, 20 a 25% de carboidratos e 15 a 25% de lipídeos, além de conter minerais como ferro, zinco, magnésio, potássio, cálcio, manganês e selênio, e vitaminas como retinol, tiamina, riboflavina, piridoxina e ácido fólico. Esta leguminosa também é uma importante fonte de fibras e oligossacarídeos como a rafinose, um trissacarídeo formado por uma estrutura de galactose-glicose-frutose, e a estaquiase, um tetrassacarídeo com uma estrutura de galactose-galactose-glicose-frutose (DIXIT et al., 2011; MATIAS, 2011).

A procura por alimentos derivados de soja tem se destacado em virtude de inúmeras evidências científicas sobre seus efeitos benéficos à saúde (KOPPER et al., 2006), onde suas características químicas e nutricionais a qualificam como um alimento funcional. Segundo a portaria nº 398 de 30/04/99 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (BRASIL, 1999), “alimento funcional é todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido na dieta usual produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica”.

Em relação a sua funcionalidade, a soja contém concentrações elevadas de compostos bioativos, como as isoflavonas e saponinas, as quais contribuem para a alegação da soja como um alimento saudável (BEHRENS; SILVA, 2004; TSENG; XIONG, 2009). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para o produto ser comercializado como proteína de soja, deve constar no rótulo a seguinte frase como

alegação funcional: “O consumo diário de no mínimo 25 g de proteína de soja pode ajudar a reduzir o colesterol. Seu consumo deve estar associado com uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis” (BRASIL, 2008).

Além de ser uma fonte de proteínas de qualidade, há evidências de que a soja pode atuar na redução do risco de certas doenças. Entre os principais benefícios à saúde atribuídos às isoflavonas, está a redução do risco de câncer de mama e de próstata, pois interferem no crescimento das células cancerígenas dependentes de hormônios e interferem em outros mecanismos e ciclos celulares (PIMENTEL et al., 2005; WU et al., 2008; YAN; SPITZNAGEL, 2009). Além disso, as isoflavonas reduzem o risco da osteoporose e de doenças cardiovasculares, uma vez que apresentam a capacidade de diminuir os níveis de colesterol total e LDL-colesterol (LAGARI; LEVIS, 2010; MESSINA; LANE, 2007; PIMENTEL et al., 2005); além de ajudar a aliviar os sintomas da menopausa (HOWES et al., 2006; PIMENTEL et al., 2005).

Mücke (2010) relata que nas décadas de 70 e 90, os alimentos derivados de soja eram consumidos apenas por indivíduos adeptos a esta alternativa ou por aqueles que eram intolerantes à lactose ou pelos vegetarianos. Entretanto, o autor afirma que até o ano de 2010 a quantidade de soja consumida pela população aumentou devido aos estudos que demonstraram o seu efeito positivo sobre a saúde.

No ano de 2009, os Estados Unidos lideraram a produção de soja, seguidos pelo Brasil, Argentina e China. Segundo um levantamento estatístico do Instituto Interamericano de Cooperação para Agricultura (IICA, 2009), o Brasil foi responsável por 25% da produção mundial de soja em 2009, correspondente a 69 milhões de toneladas. Contudo, em um levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2015) em janeiro de 2015, referente à safra 2014/2015, a produção brasileira de soja atingiu aproximadamente 96 milhões de toneladas, sendo a região Centro-Sul a maior produtora, responsável pela produção de 84 milhões de toneladas.

Em uma pesquisa realizada nos Estados Unidos e divulgada em 2013 pela United Soybean Board (USB, 2013), foi reportado que 42% dos americanos consomem alimentos derivados de soja uma vez por mês ou mais, em comparação com 30% em 2006. Em 2013, 28% dos americanos afirmaram que consomem soja uma vez por semana ou mais, em comparação com 19% em 2006. Ademais, o número de indivíduos que indicaram que nunca consomem soja diminuiu de 43% no ano de 2006 para 27% em 2013.

Dentre os produtos derivados de soja, encontram-se no mercado brasileiro: óleo de soja, extrato solúvel de soja em pó, sorvetes e iogurtes à base de soja, proteína texturizada

de soja (PTS ou “carne” de soja), farinha de soja, creme de soja, condensado de soja, congelados à base de soja (hambúrguer, salsichas e *nuggets* de soja), pratos prontos congelados (lasanha e ravióli de queijo com molho à bolonhesa de soja), entre outros (HIRAOKA; BONFLEUR, 2008).

2.3 Extrato Solúvel de Soja

O extrato de soja, também conhecido como “leite de soja”, é obtido a partir da hidratação dos grãos de soja de alto valor nutricional, e posteriormente, submetidos à maceração, tratamento térmico e prensagem, sendo uma boa fonte de nutrientes, conforme mostrado na Tabela 3 (BARBOSA, 2007; BREN et al., 2010). De acordo com a resolução nº 14, de 28 de junho de 1978, da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (BRASIL, 1978), “o extrato de soja em pó na forma de emulsão aquosa, é uma fonte de proteínas que pode ser usada como alimento ou ingrediente na produção de alimentos”.

O extrato solúvel de soja não contém lactose e colesterol, sendo uma boa alternativa para os consumidores intolerantes à lactose e pode ser usado como substituto ao leite de vaca. Por ser uma proteína de alta qualidade, é a única proteína de origem vegetal de qualidade comparável à proteína animal (TIBANQUIZA, 2011).

O consumo do extrato solúvel de soja *in natura* é limitado devido ao seu sabor adstringente oriundo de compostos voláteis produzidos quando os tecidos dos grãos são danificados na presença de umidade, ocorrendo oxidação dos ácidos graxos insaturados catalisada pelas enzimas lipoxigenases, as quais podem ser inativadas por tratamento térmico (MATIAS, 2011; MONDRAGÓN-BERNAL, 2004).

Os oligossacarídeos presentes no grão, como a estaquiose e a rafinose, são fatores que também limitam o consumo de soja por serem indigeríveis pelo organismo humano, causando a produção de gases no trato intestinal (BARBOSA, 2007; MATIAS, 2011; MONDRAGÓN-BERNAL, 2004).

De acordo com Mondragón-Bernal (2004) e estudos anteriores citados por Barbosa (2007), esses oligossacarídeos presentes no extrato de soja podem ser usados como meio de crescimento e atividade bioquímica de bactérias probióticas na produção de queijo de soja e iogurtes, proporcionando alimentos com propriedades funcionais ao mercado

consumidor e uma alternativa para as pessoas que apresentam alergias ou distúrbios alimentares devido à ingestão de leite bovino.

Segundo Machado (2007), a produção de ácido láctico, acetaldeído e diacetil pela fermentação láctica, modificam as características sensoriais de produtos à base de extrato de soja, além de reduzir a produção de gases devido à presença dos oligossacarídeos, causadores do desconforto gastrointestinal. Deste modo, o autor afirma que a fermentação do extrato solúvel de soja por bactérias probióticas tem sido utilizada com o intuito de melhorar o sabor e favorecer a aceitação do produto.

Tabela 3. Composição química do extrato solúvel de soja e do leite de vaca integral, em pó.

Composição (por 100g)	Extrato Solúvel de Soja	Leite Bovino
Calorias (kcal)	459	497
Carboidratos (g)	28,5	39,2
Proteínas (g)	35,7	25,4
Lipídios (g)	26,2	26,9
Fibra Alimentar (g)	7,3	NA
Colesterol (mg)	NA	85
Cálcio (mg)	359	890
Ferro (mg)	7,0	0,5
Fósforo (mg)	647	1242
Magnésio (mg)	216	77
Manganês (mg)	216	Tr
Sódio (mg)	83	323
Potássio (mg)	1607	1132
Cobre (mg)	1,19	0,11
Zinco (mg)	5,8	2,7
Retinol (mcg)	NA	361
Tiamina (mg)	Tr	0,24
Riboflavina (mg)	0,11	1,03
Piridoxina (mg)	0,35	Tr
Niacina (mg)	0,4*	0,7*
Vitamina C (mg)	9,2	6,0*

Fonte: TACO, 2011; NA – Não Aplicável, Tr – Traço; * Fonte: FRANCO, 2003.

O desenvolvimento de produtos à base de extrato de soja fermentado suplementados com substâncias como saborizantes, açúcares e polpas de frutas, expandiu-se como uma alternativa para melhorar e/ou incrementar as características sensoriais e a aceitabilidade do produto (BARBOSA, 2007). Como a aceitação dos extratos de soja na forma pura é limitada pelos consumidores, os produtos de soja prontos para consumo disponíveis no mercado são adicionados de adoçantes e/ou aromatizantes com o objetivo de melhorar seu sabor (RODRIGUES, 2003).

Esteves (2011), durante o desenvolvimento de uma bebida fermentada de soja tipo “iogurte”, com uma cultura mista de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* SAB 440A, observou o consumo dos açúcares presentes na soja, sem adição de outra fonte de carbono, onde essas espécies de bactérias consumiram glicose e sacarose, e também metabolizaram a rafinose, a qual segundo o autor, é um oligossacarídeo não digerível no trato gastrointestinal humano.

Mondragón-Bernal (2004) avaliou o desenvolvimento de espécies probióticas de *B. longum* BL04 e *L. paracasei* ssp. *paracasei* LBC81, individualmente e em associação com *L. acidophilus* LAC4, em uma bebida fermentada a partir de extrato solúvel de soja desengordurado, com e sem adição de frutooligossacarídeos. O autor verificou que as culturas puras de *L. paracasei* e *B. longum* apresentaram bom crescimento em extrato solúvel de soja, atingindo contagem de células de 10^{12} a 10^{13} UFC/mL com 16 a 20 horas de fermentação, enquanto a contagem de *L. acidophilus* juntamente com *B. longum* apresentou um aumento do número de células, atingindo a faixa de 10^{10} – 10^{13} UFC/mL com 20 a 24 horas de fermentação.

Em estudos realizados com espécies de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* foram observados bons resultados de aceitação sensorial, como o iogurte de soja suplementado com os prebióticos oligofrutose e inulina, desenvolvido por Haully, Fuchs e Prudencio-Ferreira (2005), que apresentou índice de aceitação de 71,20%.

Tibanquiza (2011) desenvolveu uma bebida de soja probiótica, fermentada durante 8 horas a 37 °C, com inoculação de *Lactobacillus plantarum* e adicionada de sacarose, variando a concentração de inóculo (1 - 3%) e sacarose (2,6 – 3,4%). Foram avaliados sensorialmente os atributos: odor, acidez, sabor, textura e aceitabilidade, onde a amostra contendo 3% de inóculo e 3,4% de sacarose apresentou maior aceitação por parte dos provadores.

No desenvolvimento de uma bebida a partir de extrato solúvel de soja, fermentada por *L. acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium bifidum* BB-12, Bren et al. (2010) observaram

índice de aceitação de 81,33% para a bebida formulada a partir de 50% de extrato solúvel de soja e 8% de glicose.

Matias (2011) avaliou a aceitação de um produto semelhante ao queijo *petit-suisse*, porém à base de soja, com polpa de fruta e adição dos micro-organismos probióticos *Bifidobacterium animalis* Bb-12, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e da cultura “starter” *Streptococcus thermophilus* ABT-4, armazenado a 4 °C durante 21 dias. As formulações foram constituídas a partir de queijo *petit-suisse* probiótico de base láctea (F1); “queijo” de soja probiótico com creme de leite de origem láctea e base láctea parcialmente substituída por soja (F2); e “queijo” de soja probiótico com creme de soja e base láctea totalmente substituída por soja (F3). O autor observou uma influência positiva da soja sobre os escores atribuídos à formulação F3, a qual mostrou tendência a um melhor desempenho sensorial nas análises conduzidas em 21 dias de armazenamento, obtendo a maior frequência nos escores de aceitação entre “gostei ligeiramente” e “gostei muitíssimo” dentre as três formulações, onde o autor concluiu que a formulação F3 (produto totalmente a base de soja) é um produto com boas perspectivas para futura comercialização.

Segundo Lourens-Hattingh e Viljoen (2001), dentre os fatores que influenciam a sobrevivência de bactérias probióticas durante a fermentação destacam-se as cepas utilizadas, as interações entre as espécies presentes no meio, as condições de cultura, a composição química do meio de fermentação (fonte de carboidratos), a disponibilidade de nutrientes, o nível de inoculação, a temperatura de incubação, o tempo de fermentação, o teor de sólidos, a acidez final, a concentração de açúcares, os fatores de crescimento e inibidores, o nível de oxigênio dissolvido, bem como a temperatura de armazenamento do produto final.

2.4 Sorvete

O sorvete é um produto obtido a partir de uma emulsão estabilizada, chamada de calda, a qual é submetida a pasteurização, maturação e posterior processo de congelamento sob agitação contínua e incorporação de ar, obtendo-se um produto cremoso, suave e agradável ao paladar (MOSQUIM, 1999; SOUZA et al, 2010).

O sorvete pertence ao grupo dos gelados comestíveis, os quais, segundo a ANVISA (BRASIL, 2005), são definidos como produtos congelados obtidos a partir de uma emulsão

de gorduras e proteínas, ou de uma mistura de água e açúcares, podendo ser adicionado de outros ingredientes desde que não descaracterizem o produto.

Segundo Souza et al. (2010), sua composição varia de acordo com a região e os diferentes mercados, apresentando 8-20% de gordura, 8-15% de sólidos não gordurosos do leite, 13-20% de açúcar e 0-0,7% de emulsificante-estabilizante. Ademais, estes autores consideram o sorvete como uma excelente fonte de energia, pois contém alto teor de carboidratos e gordura, além do conteúdo de proteínas que representa cerca de 35% do teor de sólidos não gordurosos e da elevada concentração de vitaminas e minerais.

De acordo com Mosquim (1999), diferentes insumos são utilizados na elaboração de sorvetes, como produtos lácteos, açúcar, estabilizantes, emulsificantes, gordura vegetal hidrogenada, aromatizantes e corantes, os quais desempenham importante papel sensorial e funcional no produto final, interferindo no corpo, textura, cremosidade, cor, aroma e sabor. Além destes, o autor menciona outros componentes que podem ser adicionados tanto à calda quanto ao produto final, como extrato de malte, pedaços de frutas, castanhas, mel e outros ingredientes, melhorando assim o sabor final do sorvete.

A Figura 1 apresenta as principais etapas envolvidas no processamento de gelados comestíveis que consistem de pasteurização, homogeneização, maturação e batimento/congelamento da calda.

Early (2000) e Varnam e Sutherland (1994) afirmam que além de eliminar os micro-organismos patogênicos, a pasteurização promove a fusão dos emulsificantes e ativa os estabilizantes que estão presentes em uma solução coloidal. De acordo com esses autores, esta etapa de tratamento térmico melhora o efeito das proteínas do soro devido a sua desnaturação, assim essas proteínas agem como emulsificantes por reduzirem a tensão interfacial gordura/água, e que deste modo, a desnaturação protéica tem um papel positivo na qualidade do sorvete, promovendo um produto mais cremoso, de textura e consistência mais suaves e uniformes. A pasteurização deve ser realizada a 80 °C por 25 segundos em processos contínuos ou a 70 °C por 30 minutos em processos em batelada (BRASIL, 2005).

Segundo Porto (1998), a homogeneização tem o objetivo de reduzir o tamanho dos glóbulos de gordura em aproximadamente 10 vezes e aumentar a superfície total em 100 vezes, permitindo que mais proteínas envolvam os glóbulos de gordura, evitando sua separação. Deste modo, o autor explica que é formado um produto mais uniforme e homogêneo, cremoso e a ação dos emulsificantes e estabilizantes sobre a superfície das partículas é facilitada.

Figura 1. Fluxograma de produção de sorvete em massa.

Fonte: adaptado de SENAI (2000).

A calda pasteurizada e homogeneizada é resfriada rapidamente em trocadores de calor a 7-10 °C para evitar o crescimento de micro-organismos, após o que é transferida às tinas de maturação onde permanece à temperatura de 2-5 °C, de 4 a no máximo 24 horas (EARLY, 2000; MOSQUIM, 1999; MÜCKE, 2010).

Durante a maturação, ocorre completa hidratação das proteínas e estabilizantes, dessorção da proteína na superfície do glóbulo de gordura e cristalização das moléculas de gordura. Esta etapa proporciona o aumento da viscosidade, melhora a absorção de ar durante o batimento e congelamento, e aumento da resistência ao derretimento do sorvete (EARLY, 2000; MOSQUIM, 1999). Adicionalmente, é nesta fase onde se complementa a calda com adição dos ingredientes sensíveis ao tratamento térmico, como polpas, suco de frutas, aromatizantes e corantes (CARVALHO, 2006).

Após o período de maturação, a calda é transferida das tinas para a máquina produtora de sorvete, onde ocorre a etapa de batimento e congelamento. Segundo Carvalho (2006) e Varnam e Sutherland (1994), esta é uma das etapas mais importantes da produção de sorvetes, pois ocorre um rápido congelamento da mistura de 4 °C até -5 °C enquanto é agitada para incorporação de ar, limitando-se assim, o tamanho dos cristais de gelo formados. Em seguida, o produto parcialmente congelado é endurecido sem agitação para obtenção de um congelamento rápido.

Varnam e Sutherland (1994) relatam que essa incorporação de ar é denominada de *overrun*, o qual é definido como o aumento do volume do sorvete obtido a partir do volume inicial da calda, expresso em porcentagem de *overrun*, e que seu controle é importante para obter um produto padronizado e com qualidade, além de interferir no rendimento do processo. Segundo estes autores, em equipamentos descontínuos obtêm-se de 50-100% de *overrun*, enquanto em sistemas contínuos consegue-se 130% ou mais.

De acordo com Mücke (2010) e Souza et al. (2010), ao sair da máquina produtora, o sorvete é envasado e o processo de congelamento continua com seu armazenamento em câmaras de congelamento a temperaturas de -25 °C a -30 °C. Os autores salientam ainda que nesta fase o teor de água congelada do sorvete pode chegar a 80-90%, e o desejável é que a etapa de endurecimento seja rápida para evitar a formação de grandes cristais de gelo que são formados durante o congelamento lento.

Um sorvete ideal deve apresentar características como sabor típico, fresco, agradável e delicado; textura definida e macia; resistência moderada; derreter lentamente em forma de líquido sem separação de fases, aparentando a mistura original; cor natural; partículas regularmente distribuídas; e baixa contagem bacteriana (MARSHALL; GOFF; HARTEL, 2003). A avaliação sensorial para verificar a aceitação pelos consumidores é essencial para o desenvolvimento de novos produtos, onde se deve considerar a combinação de propriedades sensoriais altamente desejáveis que o sorvete oferece em

atributos como: aparência, cor, maciez, aroma, sabor e textura, incluindo dureza, viscosidade e cremosidade (KOEFERLI; SCHWEGLER; HONG-CHEN, 1998).

Embora o sorvete seja um produto que possua boa aceitação em nível mundial, seu consumo no Brasil apresenta níveis baixos quando comparado a outros países. De acordo com os dados da Associação Brasileira das Indústrias e do Setor de Sorvetes (ABIS, 2013), no ano de 2012 o consumo per capita nacional foi de 6,21 litros, o que superou os anos anteriores, entretanto, esses dados ainda são muito inferiores se comparados aos EUA que apresentam uma média de consumo per capita de 22,5 litros e ao Canadá com 17,8 litros per capita. Apesar de o Brasil ocupar o 11º lugar no ranking mundial de consumo de sorvetes, o país apresentou um crescimento no consumo per capita de 62,5% no período de 2003 a 2012, com uma produção de 875 milhões de litros de sorvete em massa no ano de 2012.

Souza et al. (2010) correlacionam esse aumento no consumo e na produção de sorvetes com a evolução da indústria sorveteira que vem apresentando ao consumidor uma grande variedade de produtos com características diferenciadas. Neste contexto, os autores afirmam que vários estudos têm desenvolvido sorvetes com adição de ingredientes especiais visando explorar os fatores promotores de benefícios à saúde, como a adição de micro-organismos probióticos, além de se considerar que o sorvete é um ótimo veículo destes micro-organismos.

Gonçalves e Eberle (2008) desenvolveram um *frozen yogurt* contendo *L. acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium* BB-12 e *S. thermophilus*, variando apenas a concentração e o tipo de gordura adicionada (creme de leite pasteurizado e gordura vegetal hidrogenada). A amostra contendo a cultura probiótica com a formulação de 10% de creme de leite pasteurizado com adição de 3% de inulina apresentou o melhor resultado, com 100% de aceitabilidade, e constituiu-se em um alimento probiótico contendo número de células probióticas superior a 10^6 UFC/g, durante 60 dias de armazenamento.

Rossi e Miguel (2003) verificaram a viabilidade de bactérias lácticas em sorvetes de “iogurte” de soja armazenados a -23 °C, durante 180 dias de estocagem. As amostras de sorvetes foram processadas a partir de formulações de iogurte convencional (leite de vaca) e “iogurte” de soja fermentados pelo cultivo misto de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *S. thermophilus*, e “iogurte” de soja fermentado por um cultivo probiótico de *Lactobacillus jugurti* e *Enterococcus faecium*. Os autores observaram uma redução da ordem de 2 ciclos logarítmicos ao longo do período de seis meses de estocagem em todas as amostras, entretanto, a população de células viáveis permaneceu superior a 10^6 UFC/mL. Os autores

concluíram que *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *S. thermophilus* se mantiveram viáveis tanto em meio formulado com extrato solúvel de soja quanto em leite bovino, e que a estocagem dos sorvetes durante 180 dias a -23 °C não apresentou efeito significativo na sobrevivência das culturas probióticas.

Rossi e Miguel (2003) evidenciaram ainda que alguns autores relataram ocorrer redução na contagem de bactérias probióticas durante a estocagem do produto, enquanto outros pesquisadores mostraram que essa contagem permaneceu estável, demonstrando assim que a resistência ao congelamento certamente é uma característica da espécie do micro-organismo.

Favaro-Trindade et al. (2007) avaliaram o efeito de culturas probióticas em sorvete de cajá, onde as amostras de sorvete contendo individualmente *L. acidophilus* 74-2, *L. acidophilus* LAC 4 e cultura de iogurte tradicional (*S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) apresentaram contagem de células viáveis superior a 10^6 UFC/g durante 105 dias de estocagem a -18 °C.

Akin, Akin e Kirmaci (2006) estudaram a viabilidade das bactérias probióticas *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus* LA-14 e *Bifidobacterium lactis* BL-01, individualmente, em sorvete de baunilha durante 90 dias de estocagem a -18 °C, e avaliaram o efeito da adição de açúcar (sacarose) em diferentes concentrações no sorvete probiótico e a suplementação com inulina. Os autores observaram que o número de bactérias viáveis foi maior nas amostras de sorvete contendo 18% de açúcar, e que a contagem de *S. thermophilus* permaneceu estável em todas as amostras do sorvete probiótico, apresentando quantidades superiores a 10^7 UFC/g durante o período de estocagem. A contagem de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* foi reduzida de 1,5 ciclos logarítmicos. *Lactobacillus acidophilus* e *B. lactis* tiveram sua população reduzida para 10^5 UFC/g nas amostras controle, enquanto as contagens das amostras suplementadas com inulina apresentaram 10^6 UFC/g. Os autores sugeriram que a adição de inulina contribuiu para a sobrevivência do *L. acidophilus* e do *B. lactis*, resultando uma melhor viabilidade dessas bactérias.

Magariños et al. (2007) estudaram a viabilidade de bactérias probióticas *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 em sorvete durante 60 dias a -25 °C. Os autores observaram que a maior parte da redução da viabilidade dos micro-organismos avaliados ocorreu durante o congelamento, devido à incorporação de ar no sorvete (*overrun*), com uma perda de aproximadamente 10% da população inicial. Entretanto, tanto as amostras de sorvete contendo individualmente cada cepa de micro-organismo

probiótico quanto as amostras contendo a cultura mista, apresentaram contagens de células viáveis acima de 10^6 UFC/g durante o período de estocagem.

Friguetto (2012) avaliou a viabilidade de *L. paracasei* Lpc-37 em sorvete probiótico e em sorvete simbiótico contendo inulina, polidextrose e oligofrutose, durante 90 dias de armazenamento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. O autor observou que a contagem de células permaneceu estável ao longo do período de estocagem, mantendo uma população próxima de 10^8 UFC/g nos sorvetes probióticos e simbióticos.

O sorvete de iogurte simbiótico à base de extrato de soja e yacon desenvolvido por Miguel (2009) manteve suas características probióticas ao longo de 180 dias de estocagem a $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$, apresentando contagem final de células viáveis de *L. acidophilus* CRL 1014 de 10^9 UFC/g.

Alamprese et al. (2005) confirmaram a viabilidade de *L. rhamnosus* GG em sorvetes com diferentes formulações de gordura (5-10%) e açúcar (15-22%), utilizando sacarose e glicose. Além disso, os autores variaram as temperaturas e o tempo de armazenamento, com amostras armazenadas a $-16\text{ }^{\circ}\text{C}/30$ dias e a $-28\text{ }^{\circ}\text{C}/365$ dias, onde foi possível produzir sorvete contendo bactérias probióticas. Os autores observaram que a contagem de células do micro-organismo adicionado permaneceu constante com taxas de sobrevivência de 100% tanto nas amostras mantidas a $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 dias de armazenamento, como nas amostras mantidas durante 365 dias a $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$, independente da formulação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os sorvetes foram confeccionados nas instalações da empresa MR Sorvetes localizada na cidade de Lorena – SP, onde foram realizadas duas repetições de 10 litros para cada tratamento. A composição centesimal dos sorvetes foi determinada no Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e o desenvolvimento das fermentações e demais análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Probióticos da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP).

3.1 Extrato Solúvel de soja

Foram empregados extratos solúveis de soja cedidos gentilmente pela empresa Olvebra Industrial S.A., especificados como Provesol ES60 e Provesol ESL.

De acordo com o fabricante, o Provesol ES60 (Tabela 4) é um produto protéico obtido pela extração aquosa dos componentes solúveis da farinha de soja desengordurada, submetida a tratamento térmico adequado para inativação dos fatores antinutricionais e microbiológicos, e seco pelo processo de *spray-drying*, resultando um produto de grande poder emulsificante de gordura. Apresenta-se sob a forma de pó fino, com alta solubilidade e dispersabilidade. O produto é indicado para a formulação de sorvetes de soja, gelados comestíveis e como substituto de leite em pó. Por ser um extrato de soja desengordurado apresenta teor reduzido de gorduras; além disso, o extrato é substituinte de leite animal, 100% vegetal, isento de lactose, sacarose, caseína e glúten, apresenta ótima estabilidade a tratamento térmico e contém alto teor de isoflavonas.

O Provesol ESL (Tabela 4) é um extrato protéico obtido a partir da emulsão aquosa dos grãos descorticados de soja, submetida a tratamentos térmicos adequados para inativação dos fatores antinutricionais, com separação da fração solúvel, adicionada de maltodextrina, seguido de secagem por processo de *spray-drying*. Apresenta-se na forma de pó fino, com alta solubilidade e dispersabilidade. O produto é indicado como substituto lácteo, podendo substituir o leite animal; além de ser 100% vegetal, isento de lactose, caseína e glúten, e apresenta ótima estabilidade a tratamento térmico, conforme informações do fabricante.

Tabela 4. Composição nutricional dos extratos de solúveis de soja Provesol ES60 e Provesol ESL em 100 g de produto.

Extrato de soja	ES60	ESL
Valor Energético	351 kcal	449 kcal
Carboidratos	21 g	40 g
Proteína	60 g	30 g
Gorduras totais	3,0 g	18,5 g
Gorduras saturadas	Zero	2,6 g
Gorduras <i>trans</i>	Zero	Zero
Colesterol	Zero	Zero
Fibra alimentar	2,0g	1 g
Sódio	45,0 mg	24,5 mg
Cálcio	169,0 mg	86,0 mg
Ferro	5,6 mg	2,8 mg
Umidade	máx 6%	máx 6%
Cinzas	máx 8%	máx 6%

FONTE: Olvebra Industrial S.A.

3.2 Micro-organismos

No presente trabalho a cepa de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20 foi empregada para a produção dos sorvetes probióticos. Além desta, foi avaliado o desempenho das cepas *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus casei* ATCC 7469, *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338 e *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 em meio formulado com os diferentes extratos de soja avaliados.

As respectivas cepas de Lactobacilos foram congeladas a -80 °C em 80% de glicerol, mantidas a -20 °C e reativadas em meio MRS. A reativação destas cepas consistiu na sua incubação a 37 °C por 24h em caldo MRS constituído de 10 g/L de peptona, 8 g/L de extrato de carne, 4 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de glicose, 2 g/L de fosfato dipotássico, 5 g/L de acetato de sódio trihidratado, 2 g/L de citrato triamoniaco, 0,2 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado, 0,05 g/L de sulfato de manganês tetra hidratado e 1 mL/L de Tween 80, esterilizado a 121 °C por 20 minutos.

3.3 Avaliação do desempenho das culturas lácticas em meio formulado com extrato solúvel de soja

O desempenho fermentativo das respectivas cepas de *Lactobacilos* foi verificado por meio do crescimento das células em tubos *falcon* contendo 50 mL de meio formulado com os respectivos extratos de soja, na concentração de 10% (m/v), inoculados com 1,0% (v/v) dos respectivos inóculos e incubados a 37 °C por 36 horas. Amostras foram coletadas em intervalos de 6 horas para caracterização do meio quanto a acidez titulável e pH. Depois de estabilizado o crescimento, amostras foram coletadas para determinação da população de células. Estes experimentos foram realizados em duas repetições.

3.4 Elaboração do Sorvete Probiótico

Para a confecção dos sorvetes probióticos foram empregados os referidos extratos de soja nas formas fermentada e *in natura*. Para tanto, os extratos foram devidamente reconstituídos para conferir uma concentração de 10% (m/v), conforme recomendado pelo fabricante, e esterilizados a 121 °C/20 min.

A mistura para confecção dos sorvetes probióticos teve como base os respectivos extratos de soja devidamente reconstituídos e fermentados (Figura 3) ou *in natura* (Figura 4), suplementados com gordura de palma AGROPALMA[®], açúcar cristal Santa Isabel[®], estabilizante/emulsificante Hexus[®], xarope de glicose de milho desidratado MOR-REX[®] e base para sorvete Algemix maracujá Duas Rodas[®], cuja formulação foi adaptada conforme sugestão do fabricante dos extratos de soja (Tabela 5).

Esta mistura (10 litros), previamente pasteurizada a 70 °C/30 min em fogão doméstico, foi batida em liquidificador industrial com capacidade para 25 litros (Figura 2-A), seguida de resfriamento e maturação a temperatura de 4 °C por $\pm$ 23 horas.

Tabela 5. Formulação dos sorvetes.

Ingredientes	Quantidade (%)	
	ESL	ES60
Água	64,65	62,00
Açúcar cristal	20,00	20,00
Extrato solúvel de soja em pó	5,00	9,00
Gordura de palma	7,00	5,65
Xarope glicose de milho em pó	3,00	3,00
Emulsificante	0,35	0,35
Aromas e corantes	q.s.p	q.s.p.

FONTE: adaptado de Olvebra Industrial S.A.

A calda base maturada foi então transferida para uma máquina produtora de sorvete descontínua (INADAL[®], Figura 2-B) com capacidade para 20 L/12 min, na qual ocorreu o batimento e congelamento rápido a -5 °C.

Figura 2. (A) Liquidificador industrial utilizado no processamento dos sorvetes; (B) Produtora de sorvete descontínua INADAL[®].

(A)

(B)

Fonte: MR Sorvetes.

Os sorvetes probióticos foram então armazenados em embalagens com capacidade de 2 L e estocados em câmara frigorífica a -23 °C, sendo amostras coletadas a cada 30 dias,

por um período de 5 meses, para avaliação da viabilidade celular da respectiva cultura láctica e caracterização físico-química. A avaliação sensorial foi realizada a cada dois meses e a composição centesimal determinada após 5 meses.

3.4.1 Elaboração de sorvetes probióticos à base de extrato solúvel de soja fermentado

Para obtenção dos respectivos extratos de soja fermentados, estes foram reconstituídos a 10% (m/v) e esterilizados a 121 °C/20 min, após o que foram inoculados com 1% (v/v) da cultura de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20 e incubados a 37 °C por 30 horas em Erlenmeyer fechado, visando atingir 10^8 a 10^9 UFC/g de sorvete. Encerrada a fermentação, os extratos fermentados foram armazenados a 4 °C até o momento de seu uso.

Os respectivos extratos de soja, devidamente fermentados, foram adicionados à mistura de ingredientes, previamente pasteurizada e homogeneizada, para constituir a formulação do sorvete (Tabela 5), conforme ilustrado na Figura 3.

3.4.2 Elaboração de sorvetes probióticos à base de extrato solúvel de soja *In Natura*

Para produção do sorvete à base de extrato solúvel de soja *in natura*, as células do *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20 foram ativadas em meio MRS, centrifugadas a $4000 \times g$ /15 min, lavadas com solução salina 0,9% e ressuspensas em 100 mL de extrato de soja reconstituído. Posteriormente, determinado volume desta suspensão foi adicionado à mistura do sorvete (Tabela 5) para conferir uma concentração de células de 10^8 a 10^9 UFC/g de sorvete. Este procedimento foi realizado após o tratamento térmico e resfriamento da mistura base do sorvete, ao final da etapa de maturação, seguido das etapas de batimento e congelamento para confecção do sorvete, conforme ilustrado na Figura 4.

Figura 3. Fluxograma da elaboração dos sorvetes probióticos à base de extrato de soja fermentado.

Fonte: O próprio autor.

Figura 4. Fluxograma da elaboração dos sorvetes probióticos à base de extrato de soja *in natura*.

Fonte: O próprio autor.

3.4.3 Avaliação Sensorial

O presente projeto foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP), das Faculdades Integradas Teresa D'ávila/SP, tendo recebido o

Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) de número: 40750314.5.0000.5431.

Os sorvetes foram submetidos à análise sensorial a cada dois meses no Laboratório de Análise Sensorial da Planta de Bebidas da EEL – USP, onde 100 provadores não treinados receberam as respectivas amostras que foram submetidas aos testes de aceitação por meio da escala hedônica de 9 pontos (Figura 5) e intenção de compra.

Foram avaliados além da impressão global, os atributos aroma, cor, sabor e textura. As amostras foram mantidas refrigeradas dentro de caixas de isopor contendo gelo e foram servidas na mesma sessão, em copos plásticos devidamente codificados numericamente com três dígitos ao acaso, contendo cerca de 20 g de sorvete. Os resultados foram avaliados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (IAL, 2008) por meio do software MINITAB 17.

Figura 5. Modelo de ficha de avaliação sensorial utilizado.

Nome: _____		Idade: _____		Data: _____	
Por favor, avalie as amostras de sorvete codificadas da esquerda para a direita e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou das mesmas.					
		Código da amostra: _____			
9 – gostei extremamente					
8 – gostei muito					
7 – gostei moderadamente					
6 – gostei ligeiramente					
5 – nem gostei / nem desgostei					
4 – desgostei ligeiramente					
3 – desgostei moderadamente					
2 – desgostei muito					
1 – desgostei extremamente					
		Código da amostra: _____			
Assinale qual seria sua atitude quanto à compra do produto.					
5 - eu certamente compraria este produto					
4 - eu provavelmente compraria este produto					
3 - eu tenho dúvidas se compraria ou não este produto					
2 - eu provavelmente não compraria este produto					
1 - eu certamente não compraria este produto					
Comentários: _____					

Fonte: adaptado de IAL (2008).

3.5 Métodos Analíticos

3.5.1 Determinação da população de células viáveis

A população de células (UFC/g) nos sorvetes e nos extratos de soja fermentados foi determinada pela técnica de plaqueamento “pour plate”. Para tanto, 1 g das respectivas amostras foi devidamente diluído em 9 mL de solução salina 0,9% (m/v), seguida de diluições decimais sucessivas. Alíquotas de 1,0 mL da diluição adequada foram transferidas assepticamente, em duplicata, para placas de Petri e adicionadas de 12 mL de Ágar MRS, constituído de caldo MRS acrescido de 15 g/L de ágar, seguido de incubação a 37 °C por 72 horas, para posterior contagem das colônias.

3.5.2 Análises Físico-químicas

3.5.2.1 pH e Acidez Titulável

Os meios fermentados e os respectivos sorvetes probióticos liquefeitos em temperatura ambiente (± 25 °C) foram caracterizados quanto ao pH empregando-se pHmetro digital PG1800 GEHAKA[®], devidamente calibrado.

A acidez titulável foi quantificada por meio da titulação, em duplicata, de 10 g das amostras diluídas em água destilada, com NaOH 0,1 M e expressa em % de ácido láctico, conforme metodologia descrita pela A.O.A.C. (AOAC, 1998).

3.5.2.3 Composição Centesimal

A composição centesimal dos sorvetes probióticos foi determinada no Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras - UFLA, em

conformidade com a metodologia oficial para análise de alimentos proposta pela AOAC International (1998) e consistiu da determinação dos teores de umidade, sólidos totais, proteína, gordura, cinzas e carboidratos, realizadas em duplicata.

a) Umidade

O procedimento foi realizado utilizando-se cápsulas de porcelana previamente identificadas, secas em estufa à temperatura de 105 °C por 24 horas, esfriadas em dessecador por 30 minutos e pesadas. Em seguida, foram pesados 5g das amostras de sorvete probiótico, sendo posteriormente, os conjuntos “cápsula + amostra” submetidos à estufa à temperatura de 105 °C por 2 horas. Após este período, os conjuntos foram esfriados em dessecador por 30 minutos e pesados. Esse procedimento foi realizado até os conjuntos apresentarem peso constante em duas leituras consecutivas, obtendo-se assim, o peso do conjunto “cápsula + amostra seca”. A umidade dos produtos foi obtida a partir da diferença entre o peso das amostras antes e depois do processo de secagem.

b) Gordura

O teor de gordura foi determinado por meio do método ROESE-GOTTLIEB (IAL, 2008). O procedimento foi realizado a partir de 30g das amostras de sorvete liquefeitas e transferidas para um funil de separação. Foram adicionados 10 mL de água destilada e 5 mL de hidróxido de amônio com posterior agitação. Adicionou-se 20 mL de álcool e agitou-se novamente os funis por 1 minuto. Em seguida, adicionou-se 20 mL de éter etílico e agitou-se por 1 minuto. Posteriormente adicionou-se 20 mL de éter de petróleo e agitou-se por 1 minuto, deixando-se os funis em repouso até a separação das camadas. A extração foi repetida por mais duas vezes, e então a camada inferior obtida foi transferida para outro funil de separação onde foram adicionados 2,5g de sulfato de sódio anidro, agitou-se novamente e transferiu-se a camada etérea por meio de sua filtração em um papel de filtro para um béquer, previamente tarado. Foi realizada a evaporação dos extratos reunidos em banho-maria a 70 °C, com posterior secagem do resíduo final para obtenção da gordura em estufa a 105 °C por 24 horas, seguida da pesagem dos béqueres. O teor de gordura foi calculado a partir do peso restante no béquer após secagem do resíduo da extração.

c) Proteínas

O percentual de proteína foi determinado pelo Método Micro-Kjeldahl (AOAC, 1998). O procedimento foi realizado com aproximadamente 5g de amostra diluída previamente em 100 mL de água destilada. As amostras foram digeridas dentro do tubo digestor com a mistura catalítica (K_2SO_4 e Cu_2SO_4) e ácido sulfúrico concentrado. A temperatura foi elevada a taxa de 50 °C por hora até atingir 400 °C. Os tubos permaneceram no bloco digestor até que a amostra mudasse sua coloração de verde a incolor. Em seguida, o tubo foi acoplado juntamente com a amostra digerida ao aparelho de destilação de Kjeldahl, onde foram adicionados 15 mL de hidróxido de sódio ao reservatório apropriado, vertendo-o lentamente dentro do tubo previamente acoplado para proceder à neutralização. A amostra destilada foi recolhida em Erlenmeyer contendo ácido bórico saturado e indicador vermelho de metila, após o que o condensado foi titulado com ácido clorídrico 0,02 N. O teor de proteína das amostras foi calculado de acordo com a Equação 1, considerando o fator de conversão de 6,25 de acordo com a tabela de fatores de conversão de nitrogênio total em proteína.

$$\frac{V \times fc \times 0,14 \times f}{P} = \% \text{ proteínas (m/m)} \quad (1)$$

onde:

V = volume de HCl utilizado na titulação da amostra

fc = fator de correção do HCl

f = fator de conversão (6,25)

P = peso da amostra (g)

d) Cinzas

O teor de cinzas foi determinado pelo método gravimétrico utilizando-se mufla a 550 °C conforme metodologia padrão da A.O.A.C. (AOAC, 1998). O procedimento foi realizado com aproximadamente 10g de amostra, as quais foram pesadas em cadinhos, previamente identificados e secos em estufa a 105 °C por 3 horas, esfriados em dessecador por 30 minutos e pesados. As amostras foram secas em estufa a 105 °C por 24 horas e então incineradas em fogão a gás até encerrar a produção de fumaça, sendo os conjuntos “cadinho + amostra” acondicionados em mufla à temperatura de 550 °C por período de

tempo suficiente para a queima de toda a matéria orgânica (até a amostra adquirir coloração branca ou acinzentada). Posteriormente, estes conjuntos foram esfriados em dessecador por 30 minutos e pesados. O teor de cinzas dos produtos foi obtido como o peso do resíduo restante após a incineração das amostras.

e) **Sólidos Totais**

De acordo com a metodologia oficial (A.O.A.C, 1998), o teor de sólidos totais é realizado em estufa a 105 °C por 24 horas, seguindo a mesma metodologia para determinação da umidade. Como o teor de umidade foi determinado previamente, seguiu-se a alternativa proposta pelo Instituto Adolfo Lutz (2008), onde o resíduo seco foi calculado subtraindo-se a porcentagem de umidade de 100%, resultando na concentração de sólidos totais.

f) **Fibra e Carboidratos**

A composição em carboidratos foi determinada por diferença, sendo a soma dos teores de umidade, cinzas, lipídeos e proteínas foi subtraída de 100%, resultando na concentração de fibras e carboidratos, conforme a resolução RDC nº360 de 2003 da Anvisa (BRASIL, 2014).

3.5.3 Determinação do *Overrun*

Para determinação do *overrun* dos sorvetes, que expressa o aumento do volume da mistura inicial devido à incorporação de ar na mistura do sorvete, foi determinado em uma balança analítica, o peso da calda antes do batimento e após o batimento (sorvete), em um mesmo recipiente de 200 mL. A porcentagem de *overrun* foi calculada conforme proposto por Goff e Hartel (2013), de acordo com a Equação 2.

$$\% \text{ Overrun} = \frac{[\text{Peso da calda} - \text{Peso do sorvete}]}{[\text{Peso do sorvete}]} \times 100 \quad (2)$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação do desempenho das cepas de *Lactobacillus* em meios formulados com extratos solúveis de soja

4.1.1 pH e Acidez titulável

O comportamento das cepas de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus casei* ATCC 7469, *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20, *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338 e *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, em relação ao pH e acidez titulável em função do tempo de fermentação em meio formulado com extrato solúvel de soja ESL encontra-se representado na Figura 6.

Observa-se que o comportamento em relação ao pH do meio e à concentração de ácido láctico começou a mudar a partir de 24 horas de fermentação, sendo que a cultura que produziu a maior concentração de ácido láctico foi o *L. delbrueckii*.

Os resultados demonstram que as cepas avaliadas foram capazes de fermentar os carboidratos presentes no extrato solúvel de soja ESL, reduzindo o pH do meio devido à produção de ácido láctico. Conforme sugerido por Oliveira et al. (2001), o pH do meio em torno de 4,5 é um valor indicativo do término do processo fermentativo.

Os resultados obtidos corroboram com as afirmações de Lahtinen et al. (2011), de que o *L. acidophilus* e *L. delbrueckii* são bactérias homofermentativas produzindo apenas ácido láctico como resultado final da fermentação de carboidratos; sendo *L. casei* e *L. plantarum* classificados como bactérias hetefermentativas facultativas e *L. fermentum* como espécie obrigatoriamente heterofermentativa, capaz de produzir etanol, diacetil e CO₂, além do ácido láctico.

Barbosa (2007) encontrou valores de pH em torno de 4,5 na fermentação de extrato de soja, obtido a partir de grãos de soja, com *L. acidophilus*, o qual produziu ácido láctico na faixa de 0,30-0,50% ao final de 9 horas de fermentação. Machado (2007) estudou a fermentação de extrato de soja a partir de grãos de soja com *L. acidophilus* e observou que o pH do meio atingiu valores próximos de 4,5 com 12 horas de fermentação. Resultados importantes, pois demonstram que é possível obter um produto com fermentação adequada

em períodos significativamente menores que o resultado obtido neste estudo, economizando-se em tempo de fermentação, utilizando-se extrato de soja obtido a partir de grãos de soja.

Figura 6. Comportamento do meio de fermentação do extrato solúvel de soja ESL por cepas de *Lactobacillus* em função do tempo. (A) pH; (B) acidez titulável.

Legenda: LA = *L. acidophilus* ATCC 4356, LC = *L. casei* ATCC 7469, LD = *L. delbrueckii* UFV H2B20, LF = *L. fermentum* ATCC 9338, LP = *L. plantarum* ATCC 8014. Média de 2 repetições.

O comportamento das respectivas cepas de *Lactobacillus* durante a fermentação no meio formulado com extrato solúvel de soja ES60, em relação ao pH e acidez titulável, encontra-se representado na Figura 7.

Observa-se que o comportamento do pH do meio também começou a mudar a partir de 24 horas de fermentação, sendo que o meio de fermentação contendo a cultura de *L. fermentum* apresentou a menor redução no valor de pH.

Figura 7. Comportamento do meio de fermentação do extrato solúvel de soja ES60 por cepas de *Lactobacillus* em função do tempo. (A) pH; (B) acidez titulável.

Legenda: LA = *L. acidophilus* ATCC 4356, LC = *L. casei* ATCC 7469, LD = *L. delbrueckii* UFV H2B20, LF = *L. fermentum* ATCC 9338, LP = *L. plantarum* ATCC 8014. Média de 2 repetições.

Em relação à acidez titulável, observa-se um comportamento distinto apenas para os meios contendo as culturas de *L. fermentum* e *L. plantarum*.

De acordo com os resultados, observa-se que houve maior produção de ácido láctico em meio fermentado de extrato solúvel de soja ES60 para todas as espécies lácticas utilizadas. Tal fato é justificado devido ao extrato solúvel de soja desengordurado ES60 conter o dobro da quantidade de carboidratos do extrato de soja ESL, conforme Tabela 4. Portanto, houve maior fornecimento de carboidratos para os micro-organismos durante a fermentação do extrato de soja ES60.

Mondragón-Bernal (2004) obteve valores de pH inferiores aos obtidos no presente trabalho, nos valores de 4,46 e 4,92 ao final de 24 horas de fermentação de um extrato solúvel de soja desengordurado da Olivebra® a 7,5% (m/v), utilizando *L. acidophilus* em

associação com *B. longum*. Entretanto, o autor observou que o *B. longum* hidrolisou os açúcares presentes na soja como a rafinose e a estaquiose, devido a sua atividade α -galactosidase, hidrolisando-as parcialmente em sacarose e galactose, liberando estes açúcares para os *Lactobacillus*, o que facilitou o seu desenvolvimento, verificando uma simbiose entre estes micro-organismos.

Portanto, o extrato solúvel de soja desengordurado ES60 apresentou melhores condições de fermentação para as bactérias lácticas devido a maior quantidade de carboidratos presentes em sua formulação, resultando uma maior produção de ácido láctico. O *L. delbrueckii* apresentou melhor desempenho durante a fermentação de ambos extratos de soja, com a maior produção de ácido láctico dentre as espécies utilizadas.

4.3 Avaliação dos Sorvetes Probióticos

4.3.1 Caracterização dos extratos de soja fermentados por *L. delbrueckii* UFV H2B20

Os meios formulados com os extratos solúveis de soja Provesol ESL e Provesol ES60 foram inoculados com a cepa *L. delbrueckii* UFV H2B20 e incubados por 30 horas a 37°C. Os resultados relativos à contagem de células, valores de pH e acidez titulável encontram-se apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. População de células de *L. delbrueckii* UFV H2B20, valores de pH e acidez titulável em meio constituído de extratos de soja, com 30 horas de fermentação.

Extrato de Soja	pH	Acidez (% ác. láctico)	log UFC/mL
ESL F	4,37	1,20	9,64
ES60 F	4,72	1,31	9,49

Valores médios de 2 repetições.

Observa-se que os valores de pH e acidez titulável obtidos para ambos os meios demonstram que a bactéria foi capaz de metabolizar os açúcares presentes nos extratos de

soja, produzindo ácido láctico em concentrações equivalentes a 1,20% no meio ESL e 1,31% para o meio ES60 e, consequentemente, reduzindo o pH dos meios para valores de 4,37 e 4,72, respectivamente.

A contagem final de células viáveis obtida nos meios avaliados foi superior a 10^9 UFC/mL. Resultados semelhantes foram reportados por Mondragón-Bernal (2004) na fermentação de extrato solúvel de soja desengordurado Olvebra® com *L. acidophilus* e *B. longum*, que obteve valores de células viáveis superiores a 10^9 UFC/mL para o *Lactobacillus acidophilus* com 24 horas de fermentação.

Estes resultados permitem verificar que os extratos de soja avaliados são adequados para a formulação de meio de fermentação para o desenvolvimento do *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20.

4.3.2 População de células viáveis

A variação da população de *L. delbrueckii* UFV H2B20 durante 150 dias de estocagem dos diferentes tipos de sorvetes avaliados encontra-se na Figura 8.

Figura 8. População de *L. delbrueckii* UFV H2B20 (log UFC/g) nos sorvetes probióticos à base de extrato solúvel de soja nos diferentes tempos de estocagem a -23 °C.

Formulações: ESL = *in natura*, ES60 = *in natura*, ESL F = fermentado, ES60 F = fermentado. Valores médios de 2 repetições.

Observa-se que houve, durante o período de 150 dias de estocagem a -23°C, um decréscimo da população de *L. delbrueckii* UFV H2B20 menor que 1 ciclo logarítmico,

para todas as formulações de sorvetes avaliadas resultando em valores de células viáveis superiores a 10^6 UFC/g no final deste período. Assim, verifica-se que esses valores estão em conformidade com o preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2008), que recomenda o consumo diário de células de micro-organismos probióticos da ordem de 10^8 - 10^9 UFC/dia para que se possa verificar seus efeitos benéficos, o que corresponde ao consumo de 100g de sorvete contendo de 10^6 - 10^7 UFC/g.

Verifica-se também que o sorvete *in natura* elaborado com o extrato ESL apresentou a menor redução da população de células viáveis (0,74 log UFC/g), com um número de células viáveis final de 6,48 log UFC/g. Por outro lado, o sorvete formulado com o extrato ES60 fermentado (ES60 F) apresentou a maior redução de células viáveis ao longo do período de estocagem (0,96 log UFC/g), o que permite inferir que a prévia fermentação do meio provavelmente interferiu na viabilidade das células do *L. delbrueckii*, devido à consequente acidificação do meio de fermentação.

Estes resultados obtidos estão em conformidade com os reportados por Leandro et al. (2013) em sorvetes convencionais sabor baunilha adicionados de *L. delbrueckii* UFV H2B20, que observaram uma redução da contagem de células viáveis inferior a um ciclo logarítmico com 40 dias de armazenamento a $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$, quando variou-se apenas a concentração de gordura na formulação dos sorvetes. Estes resultados demonstraram que o *L. delbrueckii* UFV H2B20 apresenta potencial para ser empregado na confecção de sorvetes probióticos, além de apresentar a capacidade de resistir ao stress ácido em pH 3,0 e sobreviver na presença de sais biliares conforme estudado pelos autores. Além disso, Leandro et al. (2013) concluíram que a redução do teor de gordura na formulação dos sorvetes não comprometeu a viabilidade do micro-organismo.

Salomão et al. (2013) observaram que outras espécies de micro-organismos probióticos se mantiveram praticamente inalteradas em relação a população de células viáveis, com uma redução inferior a um ciclo logarítmico em sorvete convencional de morango adicionado de uma cultura mista contendo *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* armazenado por 90 dias a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por outro lado, Souza et al. (2011) obtiveram resultados inferiores, os quais observaram uma redução de 2 ciclos logarítmicos da população de células viáveis de *L. casei* LC-1 adicionado em sorvete convencional sabor creme armazenado por 98 dias a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Segundo Durso (2012), o Institute of Food Technologists define o prazo de validade como o “período entre a fabricação e compra no varejo de um produto alimentício, durante o qual o produto é de qualidade satisfatória”. Sendo assim, os

fabricantes de sorvete definem comumente o prazo de validade de seus produtos de no máximo um ano.

Portanto, a análise dos resultados do presente trabalho evidencia que para um produto como o sorvete desenvolvido possa ser estocado por aproximadamente doze meses, sugere-se iniciar a população da cepa probiótica em quantidades superiores a 10^8 UFC/g, garantindo assim, que o produto mantenha suas características probióticas ao longo de sua vida de prateleira.

A taxa de sobrevivência do *L. delbrueckii* UFV H2B20 nos sorvetes produzidos, após 150 dias de estocagem a $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$, encontra-se na Figura 9.

Figura 9. Taxa de sobrevivência do *L. delbrueckii* UFV H2B20 nos sorvetes probióticos após 150 dias de estocagem a $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Fonte: O próprio autor.

Observa-se que a cepa avaliada apresentou altas taxas de sobrevivência, sendo que não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre as amostras de sorvete. Nos sorvetes confeccionados com o extrato de soja *in natura*, a taxa de sobrevivência foi de 89,86% na formulação contendo ESL, enquanto o valor mínimo obtido foi de 87,0% quando este extrato foi previamente fermentado (ESL F).

Alamprese et al. (2005) encontraram valores superiores de taxa de sobrevivência de *L. rhamnosus* GG em sorvetes convencionais com formulações contendo diferentes concentrações de gordura (5-10%) e açúcar (15-22%), obtendo taxas de sobrevivência de 100% durante 365 dias de armazenamento a $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$, independente da formulação.

4.3.2 pH e Acidez Titulável

A variação do pH e da acidez titulável, durante o período de estocagem dos sorvetes confeccionados com diferentes extratos solúveis de soja por 150 dias a -23°C , encontra-se na Figura 10.

Figura 10. Comportamento dos sorvetes probióticos confeccionados com extratos solúveis de soja em função do tempo de estocagem a -23°C . (A) pH; (B) acidez titulável.

Fonte: O próprio autor.

Nota-se que os sorvetes confeccionados com os extratos *in natura* apresentaram maiores valores de pH, seguidos do sorvete fermentado ES60 F e do sorvete fermentado ESL F. Desta forma, os sorvetes *in natura* atingiram um valor máximo de pH de 4,15 enquanto o sorvete fermentado ESL F atingiu o valor de 3,74.

Quanto à acidez titulável, é possível observar que os sorvetes fermentados apresentaram os maiores valores de acidez com produção máxima de 1,36% de ácido láctico no período inicial, resultante da fermentação dos carboidratos, enquanto os sorvetes *in natura* apresentaram valores máximos de 0,99% de ácido láctico.

Devido à fermentação de parte dos açúcares presentes na mistura base dos sorvetes fermentados por meio da ação do *L. delbrueckii*, é possível observar uma acidificação do meio originando características similares as de leites fermentados, como a produção de ácido láctico. De acordo com Pereira et al. (2012), essa acidificação pode influenciar diretamente as características físico-químicas e sensoriais dos sorvetes desenvolvidos.

O baixo valor de pH e a alta acidez dos sorvetes eram esperados devido ao aromatizante de maracujá empregado nas formulações, sendo que as diferenças existentes entre as formulações dos sorvetes *in natura* e dos fermentados são devido à fermentação.

Ademais, não existe uma regulamentação que estabeleça valores de pH e acidez titulável para sorvetes. Segundo Tamime e Robinson (2007), *frozen yogurts* comercializados nos Estados Unidos comumente apresentam valores de pH entre 4,37 e 5,70.

Munhoz et al. (2010) no desenvolvimento de sorvetes de soja a partir de grãos de soja utilizando flavorizante de abacaxi, encontraram valores de pH entre 4,22-4,44.

Os resultados reportados por Leandro et al. (2013) demonstraram que o *L. delbrueckii* UFV H2B20 é capaz de resistir ao “stress” ácido quando submetido a tratamento em pH 3,0, o que permite inferir que as condições de pH observadas nos sorvetes probióticos no presente trabalho não interferiram na viabilidade celular desta cepa ao longo do período de armazenamento.

4.3.3 Avaliação da composição centesimal dos sorvetes

A composição centesimal dos sorvetes probióticos encontra-se descrita na Tabela 7, onde pode ser observado que os sorvetes apresentaram teores de sólidos totais, gordura e proteína em conformidade com o padrão mínimo estabelecido na Portaria nº 379 de 1999 da Anvisa (BRASIL, 1999), a qual estabelece as concentrações mínimas de 28% de sólidos totais, 3% de gordura e 2,5% de proteína em sorvetes.

Tabela 7. Composição centesimal dos sorvetes probióticos.

Sorvetes	Umidade (%)	Gordura (%)	Cinzas (%)	Proteína (%)	Carboidratos* (%)	Sólidos Totais (%)
ESL	62,21	5,91	0,42	2,50	27,28	37,79
ES60	64,23	5,34	1,01	2,62	26,81	35,77
ESL F	63,23	6,17	0,35	2,40	27,85	36,77
ES60 F	65,59	5,77	0,41	2,68	25,56	34,41

*Valores obtidos por diferença. Determinações realizadas em duplicata.

Nota-se ainda que apenas a formulação ESL F (sorvete fermentado ESL) apresentou teor de proteína (2,4%), ligeiramente inferior ao padrão estabelecido. Observa-se também que as formulações contendo o extrato de soja desengordurado ES60 (formulações ES60 e ES60 F) apresentaram maior teor de proteínas, que se deve provavelmente à variação do conteúdo de proteínas nas amostras retiradas para análise. O mesmo ocorreu em relação à gordura, nota-se que as formulações contendo os extratos ESL e ESL F apresentaram maior quantidade deste componente, tendo em vista que não houve a etapa de homogeneização durante o processo de fabricação dos sorvetes, resultando na variação da quantidade de gordura nas amostras analisadas.

Os resultados obtidos diferem da composição dos sorvetes comerciais, como o sorvete de soja Cream up Soja que apresenta 2% de proteínas e 7,7% de gordura, de acordo com a informação nutricional obtida no rótulo do produto do fabricante Leve Alimentos[®], enquanto o sorvete à base de proteína de soja Soya Ice sem gordura apresenta 1,67% de proteínas conforme o rótulo do produto fornecido pelo fabricante Amoratto[®]. Segundo a informação contida no rótulo do produto fornecida pela Kibon[®], o sorvete à base de leite, como o Fruttare Mousse de Maracujá, contém em sua composição 2,55% de proteínas e 8,63% de gordura.

Pereira (2010) estudou a substituição parcial do leite em pó desnatado por extrato hidrossolúvel de soja e creme de leite como fonte de gordura na produção de sorvetes e reportou valores próximos de 37% de sólidos totais, 4,5% de proteína e 10% de gordura. Silva et al. (2011) desenvolveram uma formulação de sorvete de morango à base de extrato de soja, que apresentou teores de 5% de proteína e 0,88% de gordura.

4.3.4 Determinação do Overrun

O *overrun* corresponde à quantidade de ar incorporado na massa de sorvete durante o processo de batimento. Na elaboração dos sorvetes probióticos, empregando os extratos solúveis de soja em estudo, a duração da etapa de batimento foi de 12 minutos, sendo os resultados relativos ao percentual de *overrun* representados na Figura 11.

Observa-se que o maior valor de *overrun* obtido foi de 49,35% para o sorvete formulado com o extrato ESL fermentado (ESL F). Nota-se que este valor está dentro dos valores estabelecidos pela legislação, que de acordo com a Resolução RDC nº 266 de 22/09/05 da ANVISA, estabelece um padrão máximo de 110% de *overrun* em gelados comestíveis (BRASIL, 2005).

Segundo Souza et al. (2010), em máquinas produtoras de sorvete descontínuas, o ar é incorporado na massa por meio da agitação no interior da calda à pressão atmosférica, obtendo-se um *overrun* de 50 a 100%. Gon (2014) no desenvolvimento de *frozen yogurt* à base de “leite” de soja obteve uma quantidade de ar incorporada na faixa de 33-34%.

Figura 11. Valores de *overrun* para os sorvetes probióticos formulados com extratos solúveis de soja.

Fonte: O próprio autor.

Oliveira (2013) reportou resultados similares aos do presente estudo, com valores de percentuais de *overrun* de *frozen* à base de leite bovino variando entre 41,5 e 49,4%.

Rechsteiner (2009) salienta que uma das propriedades da gordura é interferir na aeração, sendo que formulações com menor teor de gordura apresentam taxas menores de incorporação de ar em relação aos sorvetes com maior teor de gordura. Assim, os

resultados relativos à composição centesimal dos sorvetes probióticos em estudo (Tabela 7) permitem inferir que estes apresentaram baixo teor de gordura, contendo em média 5,9%. Segundo Souza et al. (2010), a composição média de gordura de sorvetes em geral varia de acordo com a região e os diferentes mercados, apresentando 8-20% de gordura.

Su (2012) estudou diferentes formulações de sorvete tradicional variando a base gordurosa adicionada e obteve resultados de *overrun* de 33,3% para gordura hidrogenada, 28% para gordura low-trans, 31,8% para gordura de palma e 34,1% para gordura de cupuaçu, utilizando a mesma quantidade de gordura em todas as formulações (6%).

4.3.5 Avaliação sensorial dos sorvetes probióticos

Os diferentes tipos de sorvetes confeccionados foram submetidos à análise sensorial a cada 60 dias durante o período de estocagem a -23 °C, por 100 provadores na faixa etária de 15 a 62 anos, os quais avaliaram os sorvetes probióticos considerando os atributos cor, aroma, sabor, textura e impressão global, além de manifestar a sua intenção de compra do produto.

Os resultados mostrados na Figura 12 representam os valores das médias das notas atribuídas aos referidos atributos, revelando que os sorvetes elaborados com os extratos *in natura* não apresentaram diferenças significativas entre si ($P > 0,05$) para todos os atributos avaliados. Nota-se ainda que, considerando os referidos atributos, a fermentação dos respectivos extratos interferiu negativamente na qualidade dos sorvetes. Neste contexto, observa-se que para os atributos aroma e sabor, os sorvetes formulados com os extratos fermentados apresentaram os menores escores de aceitação, compreendendo entre “desgostei moderadamente” e “desgostei ligeiramente”, não apresentando diferenças significativas entre os diferentes tipos de extratos estudados. Nestes atributos, os sorvetes elaborados com os extratos *in natura* obtiveram escores entre “nem gostei/nem desgostei” e “gostei ligeiramente”.

Em relação à cor, somente o sorvete fermentado ES60 F apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) dos demais, obtendo a menor média dos escores (4,44), enquanto o sorvete *in natura* ESL atingiu a maior média no valor de 7,17.

Figura 12. Médias das notas dos atributos da avaliação sensorial dos sorvetes probióticos nos diferentes tempos de estocagem. (A) Tempo inicial; (B) 60 dias; (C) 120 dias.

Fonte: O próprio autor.

Para os atributos aroma e sabor, os sorvetes fermentados ESL F e ES60 F apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos sorvetes *in natura*, apresentando os menores escores entre “desgostei moderadamente” e “desgostei ligeiramente”, porém não apresentaram diferença significativa entre si. Enquanto os sorvetes *in natura* obtiveram escores entre “nem gostei/nem desgostei” e “gostei ligeiramente”, sendo o sorvete *in natura* ESL o de maior média.

Pode-se observar que em relação à textura, os sorvetes fermentados apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) quando comparados aos *in natura* e também apresentaram diferença entre si, sendo que o sorvete fermentado ES60 F obteve os menores escores de aceitação, correspondente a “desgostei moderadamente”.

A partir dos resultados das notas referentes à impressão global para os sorvetes probióticos à base de soja desenvolvidos, observa-se que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os sorvetes *in natura* ESL e ES60, entretanto, os mesmos apresentaram diferença significativa quando comparados com os sorvetes fermentados ESL F e ES60 F, que também apresentaram diferença entre si ($P < 0,05$) em relação às três análises sensoriais realizadas.

No tocante a impressão global (Figuras 12 e 13), observa-se que os sorvetes elaborados com os extratos *in natura* foram avaliados como “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”, sendo que o sorvete formulado com ESL *in natura* obteve a maior nota (7,16) correspondente a “gostei moderadamente”, não sendo observada influência significativa ($P > 0,05$) entre os extratos estudados neste atributo. Por outro lado, o sorvete elaborado com o extrato ESL fermentado (ESL F) obteve escores correspondentes entre “desgostei ligeiramente” e “nem gostei/nem desgostei”, e o sorvete ES60 F como “desgostei moderadamente” e “desgostei ligeiramente”. Desta forma, fica demonstrada a interferência negativa da fermentação sobre a impressão global dos sorvetes avaliados, que se deve provavelmente a maior acidez e a uma série de compostos resultante do metabolismo celular que contribuem negativamente para o sabor e aroma dos sorvetes.

Segundo Alves et al. (2009), a atividade das culturas lácticas resulta mudanças físico-químicas específicas, liberando compostos como ácido láctico e acético, acetaldeído, cetonas e diacetil, que, dependendo da concentração, interferem na percepção do sabor e aroma de produtos fermentados como *frozen yogurt*.

Figura 13. Notas de impressão global para os diferentes sorvetes probióticos avaliados.

Fonte: O próprio autor.

Resultados inferiores aos encontrados no presente trabalho foram reportados por Gon (2014), que estudaram a confecção de *frozen yogurt* de soja, elaborado a partir de extrato solúvel de soja da Olvebra® contendo *L. acidophilus*, *Bifidobacterium*, e *S. thermophilus*, cuja avaliação sensorial revelou escores médios correspondentes entre “nem gostei/nem desgostei” e “gostei ligeiramente”, com notas variando entre 5,0-6,0.

Resultados semelhantes aos do presente estudo foram encontrados por Ambrósio-Ugri e Akashi (2013), no desenvolvimento de sorvete de cupuaçu sem lactose a base de extrato solúvel de soja, o qual apresentou uma média de notas de 6,67, correspondente a “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”.

Pereira (2010) encontrou resultados semelhantes aos do presente estudo, avaliando o extrato solúvel de soja ES60 da Olvebra® em substituição parcial de leite em pó na produção de sorvete, onde avaliou a percepção do sabor da soja com diferentes flavorizantes, como chocolate, abacaxi, morango, coco e maçã. Os resultados revelaram que o flavorizante de chocolate proporcionou maior capacidade de mascarar o sabor característico da soja, e no teste de aceitação do sorvete sabor chocolate, o mesmo obteve notas médias superiores a 6,0, correspondente a “gostei ligeiramente”.

Dutcosky (1996) sugere a seguinte equação para o cálculo do Índice de Aceitabilidade do produto: $IA (\%) = A \times 100 / B$, em que “A” corresponde a nota média obtida para o produto e “B” a nota máxima dada ao produto. O autor afirma que um IA com boa repercussão tem sido considerado superior ou igual a 70%.

No tocante a aceitabilidade dos sorvetes probióticos (Figura 14), observa-se que os sorvetes formulados com os extratos *in natura* apresentaram índice superior a 70%, atingindo um valor máximo de 80% para o sorvete *in natura* ESL, exceto o sorvete ES60 no tempo inicial que apresentou um índice de 69%. Entretanto, os sorvetes fermentados apresentaram índice de aceitabilidade inferior a 57%, comprovando que a fermentação dos extratos afetou negativamente a aceitação dos produtos. Nota-se ainda que o tempo de estocagem pouco interferiu no índice de aceitação dos sorvetes.

Figura 14. Índice de aceitabilidade dos sorvetes probióticos avaliados em diferentes tempos de estocagem.

Fonte: O próprio autor.

No que se refere ao quesito intenção de compra (Tabela 8), observa-se que houve diferença significativa entre os diferentes tempos de estocagem ($P < 0,05$) apenas para o sorvete fermentado ESL F. Nota-se ainda que houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os sorvetes *in natura* e fermentados, onde os sorvetes *in natura* apresentaram os maiores escores, independentemente do tempo de estocagem, correspondendo a “eu tenho dúvidas se compraria este produto” e “eu provavelmente compraria este produto”.

Os sorvetes fermentados apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) entre si, sendo que o sorvete fermentado ESL F apresentou escores de intenção de compra entre “eu certamente não compraria este produto” e “eu tenho dúvidas se compraria ou não este produto”, enquanto o sorvete fermentado ES60 F apresentou escores inferiores, correspondendo entre “eu certamente não compraria este produto” e “eu provavelmente

não compraria este produto”. Demonstrando assim, que a fermentação dos extratos de soja para produção dos sorvetes probióticos interferiu de forma negativa na intenção de compra dos consumidores.

Tabela 8. Valores médios das notas referentes à intenção de compra dos sorvetes probióticos avaliados em diferentes tempos de estocagem.

Tempo de estocagem (dias)	Formulações			
	ESL	ES60	ESL F	ES60 F
Inicial	3,68±1,04 ^{aA}	3,35±1,13 ^{aA}	1,86±1,00 ^{bB}	1,88±1,13 ^{bA}
60	3,79±1,10 ^{aA}	3,50±1,13 ^{aA}	2,45±1,21 ^{bA}	1,95±1,10 ^{cA}
120	3,86±1,04 ^{aA}	3,33±1,14 ^{aA}	2,36±1,18 ^{cA}	1,84±1,01 ^{dA}

Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma linha e médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de média de Tukey.

Entretanto, é possível sugerir que a diferença na intenção de compra entre as amostras pode ser devido ao prévio conhecimento dos provadores em relação aos sorvetes serem derivados da soja, o que pode ter influenciado na avaliação e aceitação dos mesmos. Além disso, não foram os mesmos provadores que participaram de todas as análises sensoriais.

Os resultados de intenção de compra do sorvete formulado com extrato solúvel de soja produzido por Pereira (2010) revelaram que a maior frequência de respostas situou-se entre os termos “certamente compraria” e “possivelmente compraria”, indicando assim, uma avaliação positiva dos provadores em relação as formulações avaliadas.

Silva et al. (2011) na avaliação sensorial de sorvete de morango à base de extrato de soja, observaram que 73,0% das avaliações corresponderam ao termo “gostei muito”, utilizando uma escala hedônica de cinco pontos, e que mais de 70,0% dos participantes declararam que “certamente comprariam” o produto desenvolvido.

Lima et al. (2011) desenvolveram sorvetes de soja elaborados a partir de “leite” de soja, creme de soja e condensado de soja, utilizando polpa de manga e maracujá. O sorvete de soja sabor manga foi aprovado por 84,8% dos provadores não treinados e rejeitado por 13%, enquanto o sorvete de soja sabor maracujá foi aprovado por apenas 39,2% e rejeitado por 56,5% dos provadores.

5 CONCLUSÕES

As cepas de *Lactobacillus* estudadas apresentaram desempenho fermentativo satisfatório em meio formulado com os diferentes extratos de soja avaliados, com destaque para o extrato de soja desengordurado ES60.

A cepa *L. delbrueckii* UFV H2B20 manteve-se viável por 150 dias a -23 °C nos sorvetes formulados com os extratos solúveis de soja ES60 e ESL, com uma população de 10^6 UFC/g de sorvete.

Os sorvetes probióticos formulados com os extratos solúveis de soja ES60 e ESL apresentaram características físico-químicas em conformidade com os padrões mínimos estabelecidos pela legislação de sorvetes.

A análise sensorial dos sorvetes probióticos confeccionados com os extratos solúveis de soja ES60 e ESL, *in natura* e fermentados, revelou que houve aceitação dos provadores pelos sorvetes *in natura* e que a fermentação interferiu negativamente nos atributos avaliados.

O levantamento sobre a intenção de compra dos sorvetes desenvolvidos revelou que os provadores manifestaram que “provavelmente compraria” e “tem dúvidas se compraria ou não” os sorvetes formulados com os extratos de soja *in natura*.

É possível desenvolver um sorvete probiótico à base de extrato solúvel de soja, o qual pode ser classificado como um alimento funcional devido às suas características probióticas e à presença de compostos da soja.

Sorvete probiótico à base de soja é uma ótima alternativa para os consumidores intolerantes à lactose.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliar a viabilidade de outras bactérias probióticas em sorvete à base de extrato solúvel de soja.

Avaliar a substituição do açúcar da formulação por outros edulcorantes.

Avaliar outros aromatizantes com vistas a melhorar a sua aceitação.

Estudar diferentes formulações com extrato solúvel de soja fermentado visando avaliar o desempenho de diferentes cepas probióticas e melhorar a aceitação por parte dos consumidores.

REFERÊNCIAS

ABIS. Associação Brasileira das Indústrias e do Setor de Sorvetes – Estatística – **Produção e consumo de sorvetes.** Disponível em <http://www.abis.com.br/estatistica_producaoconsumodesorvetesnobreasil.html>. Acesso em setembro de 2013.

AKIN, M.B; AKIN, M.S.; KIRMACI, Z. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. **Science Direct, Food Chemistry**, v. 104, p. 93-99, 2006.

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

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

AMBROSIO-UGRI, M. C. B.; AKASHI, M. S. Sensory acceptance of ice cream cupuaçu with low lactose. **Revista Tecnológica**, v.22, p.53-60, Maringá, 2013.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 16th ed. Arlington, USA, 1998.

ARAÚJO, E. A.; CARVALHO, A. F.; LEANDRO, E. S.; FURTADO, M. M.; MORAES, C. A. Development of a symbiotic cottage cheese added with *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20 and inulin. **Journal of Functional Foods**, p.85-89, 2010.

BARBOSA, E. G. **Prevalência de bactéria probiótica *Lactobacillus acidophilus* – NCFM em extrato de soja fermentado e saborizado com sacarose e polpa de pêsego.**

2007. 58f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, 2007.

BEHRENS, J.H.; SILVA, M.A.A.P. Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.3, p.431-439, 2004.

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

BERNAT, N.; CHAFER, M.; CHIRALT, A.; GONZALEZ-MARTINEZ, C. Hazelnut *milk* fermentation using probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and inulin. **International Journal of Food Science & Technology**. 49: 2553-2562, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução CNNPA nº 14, de 28 de junho de 1978. Regulamento Técnico que Estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade para Farinha Desengordurada de Soja, Proteína Texturizada de Soja, Proteína Concentrada de Soja, Proteína Isolada de Soja e Extrato de soja. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, 1978. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/resol/14_78.htm> Acesso em maio de 2013.

BRASIL. Ministério de Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução ANVS/MS n.º 18, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Republicada no **Diário Oficial da União**, Brasília, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. Regulamento Técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, p. 191, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2003.

Disponível em <
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ec3966804ac02cf1962abfa337abae9d/Resolucao_RDC_n_360de_23_de_dezembro_de_2003.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em agosto de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 266 de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico para Gelados Comestíveis e Preparados para Gelados Comestíveis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2005. Disponível em <
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f5d552004a9bdc469832dc4600696f00/Resolucao_RDC_n_266_de_22_de_setembro_de_2005.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em setembro de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Comissões e Grupos de Trabalho. Comissão Técnico-científica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. IX - Lista de Alegações de propriedade funcional aprovadas. 2008. Disponível em <
http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm> Acesso em agosto de 2013.

BREN, E.; SANTOS, L.; ALMEIDA, J.V.P. Development of probiotic beverage from soybean milk. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. Paraná, v. 04, n. 01, p. 100-108, 2010.

CARVALHO, G.A. **Enriquecimento de sorvete com microorganismos probióticos**. 2006, 50f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

CÉSPEDES, M.; CÁRDENAS, P.; STAFFOLANI, M.; CIAPPINI, M. C.; VINDEROLA, G. Performance in nondairy drinks of probiotic *L. casei* strains usually employed in dairy products. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 5, 2013.

CICHOSZ, G.; ALJEWICZ, M.; NALEPA, B. Viability of the *Lactobacillus rhamnosus* HN001 probiotic strain in Swiss- and Duch-type cheese and cheese-like products. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 6, 2014.

CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos**, v.2 – Safra 2014/15, n.4 – Quarto levantamento, Brasília, p. 1-90, jan. 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_01_09_09_00_21_boletim_graos_janeiro_2015.pdf>. Acesso em janeiro de 2015.

DALEPRANE, J.B.; PACHECO, J.T.; BOAVENTURA, G.T. Evaluation of protein quality from genetically modified an organic soybean in two consecutives generations of wistar rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n.4, 841-847, 2009.

DIXIT, A.K.; ANTONY J.I.X.; SHARMA, N.K.; TIWARI, R.K. **Soybean constituents and their functional benefits**. In: opportunity, challenge, and scope of natural products in medicinal chemistry, (ed.) V. Tiwari and B. Mishra. Kerala, India: Research Signpost, 2011. p. 367-383.

DRAGO, L.; GISMONDO, M.R.; LOMBARDI, A.; HAEN, C.; GOZZONI, L. Inhibition of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 153, p.455–63, 1997.

DURSO, F. M. **Fatores que afetam a vida de prateleira de sorvetes de massas artesanais: um estudo baseado nas atividades praticadas atualmente nas sorveterias artesanais de cidade de São Paulo**. 2012. 45p. Monografia (Especialização em Engenharia de Alimentos) – Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 2012.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: DA Champagnat, 1996. 123p.

EARLY, R. **Tecnologia de los productos lácteos**. Zaragoza: Acribia, 2000. 459p.

ESTEVEES, T.C.F. **Desenvolvimento de alimento fermentado de soja tipo “iogurte”: avaliação da estabilidade física**. 2011. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

FAO/WHO. 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**. Cordoba, Spain: Food and Agriculture Organization of the United ´ Nations, World Health Organization. 2001. 34 p. Disponível em: < ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf> Acesso em agosto de 2013.

FAVARO-TRINDADE, C.S.; BAILERO, J.C.C; DIAS, P.F.; SANINO, F.A; BOSCHINI, C. Effects of culture, pH and fat concentration on melting rate and sensory characteristics of probiotic fermented yellow mombin (*Spondias mombin L*) ice creams. **Food Science and Technology International**, p. 285-291, 2007.

FERRAZ, J. L.; CRUZ, A. G.; CADENA, R. S.; FREITAS, M. Q.; PINTO, U. M.; CARVALHO, C. C.; FARIA, J. A. F.; BOLINI, H. M. A. Sensory acceptance and survival of probiotic bacteria in ice cream produced with different overrun levels. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 1, 2012.

FRANCO, G. **Tabela de Composição Química dos Alimentos**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 307 p.

FRIGHETTO, J.M. **Produção de sorvetes com características simbióticas e avaliação da sobrevivência de *Lactobacillus paracasei* em condições gastrointestinais simuladas**. 2012. 69f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2012.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365–78, 1989.

GAINO, V. O.; VOLTARELLI, V. P.; RENSIS, C. M. V. B.; VIANNA, P. C. B. Probiotic “requeijão cremoso”: evaluation of *Lactobacillus casei* viability, physical-chemical

composition and sensory acceptance. **Semina: Ciências Agrárias - UEL**, v. 33, p. 3133-3142, 2012.

GOFF, H.D.; HARTEL, R.W. **Ice cream**. 7th ed., New York: Springer Science & Business Media. New York, 2013. 455p.

GON, R. L. R. **Aplicação e viabilidade de *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* e *S. thermophilus* microencapsulados em frozen yogurt de soja**. 2014. 53p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2014.

GONÇALVES, A.A.; EBERLE, I.R. Frozen yogurt with probiotic bacteria. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.3, p. 291-297, 2008.

GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; CRUZ, G. A.; FARIA, J. A.; SHAH, N. P. Probiotic dairy products as functional foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, p.455-470, 2010.

HAULY, M.C.O; FUCHS, R.H.B.; PRUDENCIO-FERREIRA, S.H. Soymilk yogurt supplemented with fructooligosaccharides: probiotic properties and acceptance. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 5, p. 613-622, 2005.

HIRAOKA, N.K.; BONFLEUR, M.L. **A importância do uso da soja na alimentação**. Local: Secretaria de Estado da Educação - Superintendência da Educação, Assis Chateaubriand, 2008.

HOWES, L.G.; HOWES, J.B.; KNIGHT, D.C. Isoflavone therapy for menopausal flushes: a systematic review and meta-analysis. **Science Direct**, p. 203-211, 2006.

IICA. Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura. **Caderno de Estatísticas do Agronegócio Brasileiro**, 4º trimestre, 2009. 101p., 2009. Disponível em <http://www.iica.org.br/Docs/Publicacoes/Agronegocio/CadernoEstatisticas_12-2009.pdf> Acesso em agosto de 2013.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo, 2008. 532 p.

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.

KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.44, n.3, p. 329-347, 2008.

KOPPER, A.; RIZZOTO, C.; HISTER, L. **Sorvete à base de leite e sorvete à base de extrato de soja reconstituído, fermentados com cepas de *L. acidophilus***. Monografia (Curso Superior em Tecnologia em Alimentos) - CEFET. Medianeira, 2006.

LAGARI, V.S.; LEVIS, S. Phytoestrogens and bone health. **Current opinion in endocrinology, diabetes and obesity**. p. 546-553, 2010.

LAHTINEN, S.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S.; WRIGHT, A. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 4th ed., Florida, USA: CRC Press, 2011.

LAZZARI, R. Diferentes fontes proteicas para a alimentação do jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 240-246, 2006.

LEANDRO, E. S.; ARAÚJO, E. A.; CONCEIÇÃO, L. L.; MORAES, C. A.; CARVALHO, A. F. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* H2B20 in ice cream produced with diferente fat leves and after submission to stress acid and bile salts. **Journal of Functional Foods**, p.503-507, 2013.

LEE, Y.K.; SALMINEN, S. The coming age of probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p.241-5, 1995.

LILLEY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, p. 747–8, 1965.

LIMA, V. B. S.; LIMA, V. B. de S.; GOMES, T. F.; CAMPOS, M.; AZEVEDO, M. L. X.; ARAÚJO, R. S. R. M. Análise sensorial de sorvete de frutas elaborado à base de soja. **Journal of Agronomy and Veterinary Sciences**, 2011.

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

MACHADO, M.R.G. **Bebida de soja fermentada com *Lactobacillus acidophilus*: viabilidade celular, avaliação sensorial, armazenamento e resposta funcional**. 2007. 117f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, 2007.

MAGARIÑOS, H.; SELAIVE, S.; COSTA, M.; FLORES, M.; PIZARRO, O. Viability of probiotic micro-organisms (*Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* Bb-12) in ice cream. **International Journal of Dairy Technology**, p. 128-134, 2007.

MARSHALL, R.T.; GOFF, H.D.; HARTEL, R.W. **Ice cream**. 6th ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publi., 2003. 366p.

MATIAS, N. S. **Desenvolvimento de alimento probiótico à base de soja com polpa de fruta**. 2011. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MERCENIER, A.; PAVAN, S.; POT, B. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, p. 99 –110, 2002.

MESSINA, M.; LANE, B. **Soy protein, soybean isoflavones, and coronary heart disease risk**: where do we stand? *Future Lipidology*, p. 55-74, 2007.

MIGUEL, D.P. **Desenvolvimento de sorvete “iogurte” simbiótico à base de extrato aquoso de soja e de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) fermentado com *Lactobacillus***

acidophilus CRL 1014. 2009. 117f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

MONDRAGÓN-BERNAL, O.L. **Desenvolvimento de uma bebida fermentada a partir de extrato hidrossolúvel de soja, contendo agentes probióticos e prebióticos.** 2004. 103f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

MOROTI, C.; MAGRI, L. F. S.; SOUZA, J. C. B.; MATOS, D. B. S.; COSTA, M. R.; SIVIERI, K. Potencial da utilização de alimentos probióticos, prebióticos e simbióticos na redução de colesterol sanguíneo e glicemia. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 11, n. 4, p. 63-67, 2009.

MOSQUIM, M. C. A. **Fabricando sorvete com qualidade.** São Paulo: Varela, 1999. 62 p.

MUNHOZ, C. L.; SILVA, T. V.; TELEGINSKI, F.; POPOSKI, M.; SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J. Elaboração de sorvete de soja e de uma cobertura crocante a partir de okara. **Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v.6, n.3, 2010.

MÜCKE, L.R. **Desenvolvimento de sorvete à base de extrato hidrossolúvel de soja adicionado de soro de leite em pó e semente de linhaça.** 2010. 30f. Programa Institucional de Iniciação Científica (CNPq) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná, 2010.

NEUMANN, E.; OLIVEIRA, M. A.; CABRAL, C. M.; MOURA, L. N.; NICOLI, J. R.; VIEIRA, E. C.; CARA, D. C.; PODOPRIGORA, G. I.; VIEIRA, L. Q. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV H2B20 stimulates the immune defence mechanisms of germfree mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, p. 1565-1573, 1998.

OLIVEIRA, M. N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; CORRIEU, G. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability milks containing probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, 2001.

OLIVEIRA, R. R. de. **Desenvolvimento de frozen yogurt funcionais linha “clean label” adicionados de corantes naturais de betalaína e bixina**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso Superior de Engenharia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2013.

OMGE. Organização Mundial de Gastroenterologia. **Guias práticas da OMGE: Probióticos e prebióticos**, 2008. Disponível em: <http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/pt/pdf/guidelines/19_probiotics_prebiotics_pt.pdf> Acesso em outubro de 2013.

PARKER, R.B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition and Health**, p. 29-48, 1974.

PEREIRA, C.A.S.; OLIVEIRA, F.B. **Soja, alimento e saúde: valor nutricional e preparo**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 102p.

PEREIRA, G. G. **Utilização de extrato hidrossolúvel de soja na produção de sorvete**. 2010. 166p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

PEREIRA, G. G.; RAFAEL, L. M.; GAJO, A. A.; RAMOS, T. M.; PINTO, S. M.; ABREU, L. R.; RESENDE, J. V. Influence of pH on the physicochemical and sensorial characteristics of strawberry frozen yogurt. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.2, 2012.

PIMENTEL, B. M. V.; FRANCKI, M.; GOLLÜCKE, B. P. **Alimentos funcionais: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 2005. 14p.

PORTO, O.L. Uma importante etapa na produção perfeita do sorvete: homogeneização. **Sorveteria Brasileira**, v. 122, p. 37-38, 1998.

RECHSTEINER, M. S. **Desenvolvimento de amidos fosfatados de batata-doce e mandioca e aplicação como substitutos de gordura em sorvetes**. 2009. 152p. Tese

(Doutorado em Agronomia), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas. Botucatu, 2009.

RODRIGUES, R. S. **Caracterização de extratos de soja obtidos de grãos, farinha integral e isolado protéico visando a formulação e avaliação biológica (em coelhos) de bebida funcional à base de extrato de soja e polpa de pêssegos**. 2003. 177p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

ROMANO, C. C.; SEREIA, M. J.; OLIVEIRA, R. R.; OLIVEIRA, T. P.; VIEIRA, M. E. S. Influência da inulina nas características químicas, sensoriais e sobrevivência do *L. acidophilus* em *frozen yogurt* simbiótico com teor reduzido de lactose. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v.3, n.1, 36-43p., 2012.

ROSSI, E.A.; MIGUEL, D.P. Viability of lactic acid bacteria in frozen yogurt during the period of storage. **Alimentos e Nutrição**, v.14, n.1, p. 93-96, 2003.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; MATTO, J.; MATTLA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p.197–215, 2000.

SALOMÃO, J.; WALTER, E. H. M.; CARDOSO, L. C. D.; PAULA BARROS, E. B.; LEITE, S. G. F. Elaboração de sorvete de morango com características probióticas e prebióticas. **Tecnologia, Sustentabilidade e Saúde**, v.25, Bahia, 2013.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, v. 61, p. 91–9, 2003.

SANTINI, M. S. S.; KOGA, E. C.; ARAGON, D. C.; SANTANA, E. H. W.; COSTA, M. R.; COSTA, G. N.; ARAGON-ALEGRO, L. C. Dried tomato-flavored probiotic cream cheese with *Lactobacillus paracasei*. **Jornal of Food Science**. v. 77, n. 11, 2012.

SENAI. **Guia para elaboração do plano APPCC: laticínios e sorvetes**. 2ª ed. Brasília: SENAI/DN, 2000. 162 p.

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

SILVA, A. C. A. S.; RANGEL, C. I.; PINTO, F. R.; PEREIRA, G. R.; MANTOANO, R. A. C. O.; CARDOZO, T. S. F.; ALVES, M. A. R. Sorvete de morango à base de extrato de soja. **Revista Saúde & Ambiente**, v.6, n.2, 2011.

SOUZA, J.C.B.; COSTA, M.R.; DE RENSIS, C.M.V.B.; SIVIERI, K. Ice cream: composition, processing and addition of probiotic. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 21, n.1, p. 155-165, 2010.

SOUZA, J. C. B.; GUERGOLETTTO, K. B.; GARCIA, S.; SIVIERI, K. Viability of *Lactobacillus casei* (LC-1) protected by trehalose and acacia gum ice cream. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 22, n.2, p.231-237, 2011.

SU, F. **Comportamento estrutural de formulações de gelado comestível com variações da base gordurosa**. 2012. 114p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SUMITA, T. C. **Caracterização de cepas de *Lactobacillus* isolados de fezes humanas quanto à propriedade probiótica**. 2007. 93f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

TACO. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. 4ª ed. Campinas: Unicamp, 2011.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yoghurt Science and technology**. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.

TIBANQUIZA, J.R.G. **Utilización de probióticos (*Lactobacillus plantarum*) en la elaboración de una bebida de soya**. 2011. 157f. Monografia do Curso de Engenharia de Alimentos – Universidad Técnica de Ambato – Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Equador, 2011.

TSENG, Y.-C., XIONG, Y. L. Effect of inulin on the rheological properties of silken tofu coagulated with glucono- δ -lactone. **Journal of Food Engineering**, p.511-516, 2009.

USB. United Soybean Board. **Consumer attitudes about nutrition:** Insights into nutrition, health and soyfoods. 2013. Edition. Disponível em <http://www.soyconnection.com/sites/default/files/Soy_Connection_Consumer_Attitudes.pdf>. Acesso em julho de 2013.

VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. **Leche y productos lácteos:** tecnologia, química e microbiologia. Zaragoza: Acribia, 1994. 476p.

WU, A.H.; YU, M.C.; TSENG, C.C; PIKE, M.C. Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk. **Br. J. Cancer**. p. 9-14, 2008.

YAN, L.; SPITZNAGEL, E.L. Soy consumption and prostate cancer risk in men: a revisit of a meta-analysis. **American Journal of Clinical Nutrition**, p. 1155- 1163, 2009.

APÊNDICE A

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

O Sr.(a) está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa “Desenvolvimento de Sorvetes Probióticos a Base de Extrato Solúvel de Soja”. Neste estudo pretendemos avaliar o desempenho e a viabilidade do micro-organismo *Lactobacillus delbrueckii* em meios formulados à base de extrato solúvel de soja e a utilização destes como meios de formulação da calda base para fabricação de sorvete sabor maracujá, além de avaliar a aceitação sensorial do produto final. As amostras de sorvete probiótico que lhe serão fornecidas para avaliação contêm corante tartrazina e não contêm lactose.

Para participar deste estudo você não terá qualquer custo ou vantagem financeira. Você será esclarecido(a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e sua recusa não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que será atendido pelo pesquisador.

O pesquisador irá tratar sua identidade com padrões profissionais de sigilo.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

O(a) Sr.(a) não será identificado em qualquer publicação que possa resultar deste estudo.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, no Laboratório de Probióticos da Escola de Engenharia de Lorena e a outra será fornecida a você.

Eu, _____, portador do Documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos do estudo “Desenvolvimento de Sorvetes Probióticos à Base de Extrato Solúvel de Soja”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar deste estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Lorena, _____ de _____ de 2014.

Assinatura do Participante

Assinatura do Pesquisador

APÊNDICE B

Resultados das duas repetições das fermentações dos extratos de soja ESL e ES60 com as diferentes cepas de *Lactobacillus*.

Tabela I. Valores de pH das fermentações do extrato de soja ESL com as diferentes cepas de *Lactobacillus*.

Micro-organismo	Tempo de fermentação (horas)						
	pH						
	Inicial	6	12	18	24	30	36
LA1	6,51	6,10	5,93	5,49	4,48	4,15	4,14
LA2	6,80	6,20	5,88	5,81	5,76	5,16	4,56
LC1	6,90	6,43	5,96	5,84	5,81	5,20	4,61
LC2	6,78	6,30	5,97	5,86	5,75	5,30	4,38
LD1	6,87	6,30	6,02	5,80	4,76	4,24	4,16
LD2	6,70	6,21	5,93	5,56	4,81	4,40	4,34
LF1	6,75	6,39	6,01	5,97	5,89	5,98	5,82
LF2	6,70	6,29	6,01	6,04	6,00	5,98	5,91
LP1	6,67	6,29	5,86	5,83	5,83	5,67	5,66
LP2	6,73	6,29	5,95	5,85	5,72	5,55	5,35

LA = *L. acidophilus* ATCC 4356, LC = *L. casei* ATCC 7469, LD = *L. delbrueckii* UFV H2B20, LF = *L. fermentum* ATCC 9338, LP = *L. plantarum* ATCC 8014.

Tabela II. Valores de acidez das duas repetições das fermentações do extrato de soja ESL com as diferentes cepas de *Lactobacillus*.

Micro-organismo	Tempo de fermentação (horas)						
	Acidez (% ác. láctico)						
	Inicial	6	12	18	24	30	36
LA1	0,17	0,19	0,22	0,26	0,42	0,56	0,64
LA2	0,13	0,17	0,21	0,24	0,23	0,31	0,45
LC1	0,13	0,16	0,21	0,22	0,22	0,30	0,47
LC2	0,13	0,17	0,22	0,22	0,24	0,32	0,44
LD1	0,15	0,19	0,21	0,24	0,43	0,61	0,61
LD2	0,13	0,20	0,23	0,24	0,42	0,56	0,58
LF1	0,13	0,16	0,19	0,20	0,20	0,20	0,20
LF2	0,13	0,17	0,19	0,22	0,23	0,30	0,14
LP1	0,13	0,17	0,22	0,25	0,29	0,30	0,29
LP2	0,14	0,18	0,24	0,29	0,37	0,39	0,42

LA = *L. acidophilus* ATCC 4356, LC = *L. casei* ATCC 7469, LD = *L. delbrueckii* UFV H2B20, LF = *L. fermentum* ATCC 9338, LP = *L. plantarum* ATCC 8014.

Tabela III. Valores de pH das fermentações do extrato de soja ES60 com as diferentes cepas de *Lactobacillus*.

Micro-organismo	Tempo de fermentação (horas)						
	pH						
	Inicial	6	12	18	24	30	36
LA1	6,69	6,40	6,27	5,90	4,72	4,48	4,53
LA2	6,84	6,48	6,27	6,13	5,64	4,89	4,67
LC1	6,89	6,67	6,28	5,96	5,03	4,60	4,48
LC2	6,86	6,61	6,29	5,92	5,04	4,51	4,59
LD1	6,99	6,73	6,34	6,12	5,39	4,82	4,59
LD2	6,81	6,63	6,13	5,99	5,38	4,69	4,67
LF1	6,86	6,86	6,35	6,14	6,13	6,17	5,82
LF2	6,83	6,67	6,13	6,14	6,06	6,23	6,06
LP1	6,77	6,60	6,13	6,01	5,73	5,79	5,75
LP2	6,86	6,65	6,38	5,97	4,93	4,62	4,59

LA = *L. acidophilus* ATCC 4356, LC = *L. casei* ATCC 7469, LD = *L. delbrueckii* UFV H2B20, LF = *L. fermentum* ATCC 9338, LP = *L. plantarum* ATCC 8014.

Tabela IV. Valores de acidez das fermentações do extrato de soja ES60 com as diferentes cepas de *Lactobacillus*.

Micro-organismo	Tempo de fermentação (horas)						
	Acidez (% ác. láctico)						
	Inicial	6	12	18	24	30	36
LA1	0,25	0,29	0,29	0,31	0,70	0,87	0,86
LA2	0,21	0,22	0,28	0,31	0,45	0,74	0,84
LC1	0,19	0,22	0,27	0,32	0,61	0,80	0,83
LC2	0,20	0,23	0,29	0,29	0,71	0,88	0,90
LD1	0,22	0,25	0,27	0,29	0,56	0,88	0,91
LD2	0,20	0,24	0,31	0,31	0,58	0,88	0,90
LF1	0,19	0,22	0,26	0,25	0,19	0,24	0,45
LF2	0,21	0,23	0,29	0,26	0,35	0,41	0,39
LP1	0,20	0,22	0,31	0,42	0,45	0,42	0,47
LP2	0,23	0,25	0,33	0,44	0,71	0,85	0,90

LA = *L. acidophilus* ATCC 4356, LC = *L. casei* ATCC 7469, LD = *L. delbrueckii* UFV H2B20, LF = *L. fermentum* ATCC 9338, LP = *L. plantarum* ATCC 8014.

Resultados das duas repetições das análises físico-químicas e microbiológicas dos extratos de soja fermentados e dos sorvetes probióticos.

Tabela V. Valores de pH, acidez e contagem de células viáveis dos extratos de soja fermentados.

Análises	Extratos de soja fermentados			
	ESL F1	ESL F2	ES60 F1	ES60 F2
pH	4,09	4,64	4,4	5,04
Acidez (% ác. láctico)	1,46	0,95	1,46	1,15
Log UFC/mL	3,45x10 ⁹	5,25x10 ⁹	4,60x10 ⁹	1,61x10 ⁹

Tabela VI. Valores de pH e acidez dos sorvetes probióticos.

Tempo (dias)	Acidez (% ác. láctico)							
	ESL1	ESL2	ES601	ES602	ESL F1	ESL F2	ES60 F1	ES60 F2
Inicial	0,93	0,97	1,00	0,98	1,36	1,35	1,33	1,39
30	0,90	1,01	1,00	0,93	1,36	1,33	1,25	1,36
60	0,85	0,87	0,91	0,87	1,28	1,27	1,18	1,28
90	0,79	0,86	0,86	0,85	1,29	1,21	1,18	1,22
120	0,82	0,90	0,89	0,87	1,29	1,27	1,21	1,27
150	0,84	0,91	0,92	0,89	1,31	1,27	1,27	1,28

Tempo (dias)	pH							
	ESL1	ESL2	ES601	ES602	ESL F1	ESL F2	ES60 F1	ES60 F2
Inicial	3,93	3,87	3,86	3,92	3,41	3,50	3,56	3,80
30	4,02	4,01	4,02	4,02	3,60	3,67	3,70	3,89
60	4,10	4,10	4,10	4,07	3,62	3,72	3,75	3,96
90	4,19	4,11	4,12	4,14	3,71	3,77	3,81	3,96
120	4,14	4,10	4,16	4,06	3,66	3,66	3,68	3,84
150	4,15	4,10	4,10	4,10	3,68	3,78	3,77	3,95

Tabela VII. Valores médios da composição centesimal dos sorvetes probióticos.

Formulações	Composição (%)					Sólidos totais
	Umidade	Gordura	Cinzas	Proteína	Carboidratos	
ESL 1	62,83	6,58	0,50	2,69	27,40	37,17
ES60 1	64,23	5,87	0,32	2,76	26,83	35,77
ESL F1	63,17	6,35	0,31	2,53	27,64	36,83
ES60 F1	66,75	5,80	0,44	3,01	24,00	33,25
ESL 2	61,59	5,23	0,35	2,32	30,51	38,41
ES602	64,22	4,82	1,69	2,48	26,78	35,78
ESL F2	63,29	6,00	0,38	2,27	28,05	36,71
ES60 F2	64,43	5,73	0,38	2,34	27,12	35,57

Valores médios de duplicatas.

Tabela VIII. Valores obtidos dos pesos das caldas e dos sorvetes para cálculo do *overrun*.

Formulações	Peso calda (g)	Peso sorvete (g)	<i>Overrun</i> (%)
ESL 1	260	172	51,2
ESL 2	236	160	47,5
ES60 1	252	170	48,2
ES60 2	248	168	47,6
ESL F1	283	200	41,5
ESL F2	262	183	44,2
ES60 F1	274	190	43,2
ES60 F2	284	196	44,9

Tabela IX. Valores da contagem de células viáveis dos sorvetes probióticos.

Tempo (dias)	UFC/g							
	ESL 1	ESL 2	ES60 1	ES60 2	ESL F1	ESL F2	ES60 F1	ES60 F2
Inicial	2,49x10 ⁷	8,05x10 ⁶	1,94x10 ⁷	1,75x10 ⁷	1,71x10 ⁷	5,50x10 ⁶	5,70x10 ⁷	3,60x10 ⁷
30	1,60x10 ⁷	7,75x10 ⁶	1,18x10 ⁷	1,59x10 ⁷	1,04x10 ⁷	5,30x10 ⁶	5,25x10 ⁷	2,04x10 ⁷
60	1,58x10 ⁷	6,90x10 ⁶	1,12x10 ⁷	5,55x10 ⁶	5,15x10 ⁶	3,95x10 ⁶	2,44x10 ⁷	7,70x10 ⁶
90	9,05x10 ⁶	6,15x10 ⁶	8,35x10 ⁶	4,50x10 ⁶	4,10x10 ⁶	3,55x10 ⁶	1,87x10 ⁷	4,95x10 ⁶
120	7,95x10 ⁶	4,05x10 ⁶	6,00x10 ⁶	4,35x10 ⁶	2,06x10 ⁶	3,80x10 ⁶	1,31x10 ⁷	4,75x10 ⁶
150	4,35x10 ⁶	1,76x10 ⁶	3,95x10 ⁶	1,42x10 ⁶	1,13x10 ⁶	1,61x10 ⁶	6,80x10 ⁶	3,40x10 ⁶

Tabela X. Notas médias e máximas da impressão global e índice de aceitabilidade dos sorvetes probióticos nos diferentes tempos de estocagem.

Tempo (dias)	Notas obtidas	ESL	ES60	ESL F	ES60 F
Inicial	Nota máxima	9	9	9	9
	Nota média	6,48	6,24	4,31	3,65
	IA (%)	72	69	48	41
60	Nota máxima	9	9	9	9
	Nota média	7,16	6,82	5,1	4,28
	IA (%)	80	76	57	48
120	Nota máxima	9	9	9	9
	Nota média	7	6	5	4
	IA (%)	77	70	54	41

IA = Índice de aceitabilidade.