



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Departamento de Nutrição

BRUNA ANTUNES VANUZZI BAHIA CAMARGOS

***SOBREVIVÊNCIA DE LACTOBACILLUS PARACASEI SUBSP
PARACASEI LBC 81 EM FROZEN DE MOUSSE DE TAMARINDO
VEGANO ELABORADO COM STEVIA***

Brasília – DF

2019

Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Departamento de Nutrição

BRUNA ANTUNES VANUZZI BAHIA CAMARGOS

***SOBREVIVÊNCIA DE *LACTOBACILLUS PARACASEI* SUBSP
PARACASEI LBC 81 EM *FROZEN* MOUSSE DE TAMARINDO
VEGANO ELABORADO COM STEVIA***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Nutrição da UnB como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Nutrição.
Orientadora: Prof^ª Dr^ª Eliana dos Santos Leandro

Brasília – DF

2019

BRUNA ANTUNES VANUZZI BAHIA CAMARGOS

**SOBREVIVÊNCIA DE *LACTOBACILLUS PARACASEI* SUBSP
PARACASEI LBC 81 EM *FROZEN* MOUSSE DE TAMARINDO
VEGANO ELABORADO COM STEVIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Nutrição da UnB como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Nutrição.
Orientadora: Prof^a Dr^a Eliana dos Santos Leandro

Aprovado em: 06/12/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Eliana dos Santos Leandro (Orientadora)

Prof^a. Dr^a Sascha Habú

Msc. Marília Cavalcante

Dedicatória:

Em primeiro lugar, agradeço a Deus que me iluminou durante essa caminhada. Agradeço à professora Eliana por ter me orientado e confiado em mim, além de toda a paciência e ajuda para a conclusão desse trabalho. Também sou grata a todos os professores que contribuíram para a minha formação. Dedico esse trabalho ao Pedro, pela paciência e por sempre estar ao meu lado e à minha família e amigos, por sempre terem uma palavra de incentivo.

RESUMO

Introdução: A demanda por alimentos funcionais tem crescido nos últimos anos em todo o mundo. Dentro dos alimentos funcionais, temos aqueles com alegações probióticas. O sorvete pode ser utilizado como alimento funcional quando adicionado de probióticos. Entretanto, a viabilidade das bactérias ácido lácticas podem sofrer danos quando congeladas. **Objetivo:** Analisar a sobrevivência de *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 em *frozen* de mousse de tamarindo vegano elaborado com stevia. **Materiais e métodos:** estudo de caráter experimental qualitativo e quantitativo, com a elaboração das diferentes formulações de mousse e determinação da viabilidade dos probióticos. **Resultados/Discussão:** Observou-se que o *frozen* sem adição de tamarindo apresentou maior viabilidade do que os demais com diferentes percentuais de polpa de tamarindo adicionado. Apesar desta diferença, do ponto de vista de funcionalidade, o fator tempo de estocagem não é considerado um fator de comprometimento da funcionalidade, visto que o produto contém uma população microbiana adequada para proporcionar benefícios à saúde do consumidor. Nos ciclos de congelamento e descongelamento observou-se que o *frozen* mousse sem adição de tamarindo foi o que permitiu significativamente ($P < 0,05$) maior viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 nos diferentes ciclos. **Considerações finais:** A estabilidade da viabilidade de *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 durante o período de estocagem foi observada no *frozen* de mousse de tamarindo vegano elaborado com stevia. É necessário em estudos futuros avaliar este produto em condições de estocagem a -18°C , de modo avaliar a estabilidade da viabilidade de *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 em condições normalmente adotadas em ambiente doméstico e comercial.

Palavras-chaves: probiótico; tamarindo; stevia; vegano; *frozen*.

ABSTRACT

Introduction: The demand for functional foods has grown in recent years around the world. Within functional foods, we have those with probiotic claims. Ice cream can be used as a functional food when adding probiotics. However, the viability of lactic acid bacteria can be damaged when *frozen*. **Objective:** Analyze the survival of probiotics in *frozen* vegan elaborated with stevia and different concentrations of tamarindo. **Materials and methods:** experimental qualitative and quantitative study, with the elaboration of the different mousse formulations and determination of the viability of probiotics. **Results/Discussion:** It was observed that *frozen* without added tamarindo presented higher viability than the others with different percentages of added tamarind pulp. Despite this difference, from a functionality point of view, the storage time factor isn't considered a functionality impairment factor, since the product contains an adequate microbial population to provide benefits to the consumer's health. In the freezing and thawing cycles it was observed that the *frozen* mousse without tamarind addition was allowed significantly ($P < 0.05$) greater viability of *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 in the different cycles. **Conclusions:** The viability stability of *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 during the storage period was observed in stevia vegan tamarindo mousse *frozen*. It is necessary in future studies to evaluate this product under storage conditions at -18°C in order to evaluate the stability of viability of *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 under conditions normally adopted in the domestic and commercial environment.

Key words: probiotic; tamarind; stevia; vegan; *frozen*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sobrevivência de <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> LBC 81 em <i>frozen</i> de mousse vegano elaborado com <i>stevia</i> e diferentes percentuais de tamarindo durante o período de estocagem.....	27
Tabela 2 – Equações de regressão e coeficientes de determinação para a viabilidade de <i>L. paracasei</i> LBC 81 em <i>frozen</i> com diferentes percentuais de tamarindo.....	29
Tabela 3 - Sobrevivência de <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> LBC 81 em <i>frozen</i> de mousse de tamarindo elaborado com <i>stevia</i> e diferentes percentuais de tamarindo submetidos a ciclos de congelamento e descongelamento.	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	11
3. REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1. Bactérias lácticas e probióticos.....	12
3.2. Produtos probióticos congelados	15
3.3. Produtos probióticos elaborados com substituto do açúcar	17
3.4. Edulcorante de <i>Stevia</i>	18
3.4.1. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	18
3.5. Tamarindo	19
3.6. Efeitos benéficos do tamarindo.....	20
3.7. Alimentos funcionais	20
4. OBJETIVOS.....	21
4.1. Objetivo Geral.....	21
4.2. Objetivos Específicos	21
5. METODOLOGIA	22
5.1. Caracterização do Estudo.....	22
5.2. Elaboração da mousse.....	22
5.2.1. Despolpa do tamarindo	22
5.2.2. Extrato de amêndoas.....	23
5.2.3. Base da mousse.....	23
5.2.4. Preparação da mousse com diferentes concentrações de tamarindo	23
5.3. Obtenção do concentrado de células.....	23
5.3.1. Obtenção da cultura estoque.....	23
5.3.2. Preparo do concentrado de células e ativação da cultura	24
5.3.3. Incorporação do concentrado de células à mousse	24
5.4. Análise microbiológica	25
5.5. Ciclos de congelamento e descongelamento	25

5.6. Análise Estatística.....	26
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
8. Referências Bibliográficas	32

1. INTRODUÇÃO

A dieta desempenha um papel importante na saúde humana (CRISCIO et al., 2010). O crescimento da incidência de doenças crônicas não-transmissíveis no mundo é causado, em grande parte, por fatores modificáveis como os hábitos alimentares. A alimentação tem papel importante como fator de risco de doenças crônicas não-transmissíveis em decorrência da relação entre o risco de diabetes, doença cardiovascular e hipertensão com o aumento do peso corporal (SANTOS, 2009).

Diante disso, em todo o mundo, a demanda por alimentos funcionais está crescendo rapidamente devido ao aumento da conscientização dos consumidores do impacto dos alimentos na saúde. Nos últimos anos, uma atenção especial foi dedicada à produção de alimentos funcionais (CRISCIO et al., 2010). O objetivo primário dos alimentos funcionais é melhorar, manter e reforçar a saúde dos consumidores via alimentação (OLIVEIRA et al., 2002).

Dentro dos alimentos funcionais, temos aqueles com alegações probióticas, os quais quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do consumidor (FAO; 2002). Alguns dos benefícios incluem redução na incidência de constipação, diarreia e câncer de intestino e estimulação do sistema imunológico (HEENAN et al., 2004).

Contudo, o desafio na preparação de um veículo de entrega de probiótico é assegurar um número suficiente de células viáveis até o momento do consumo. As estirpes usadas em alimentos probióticos e fórmulas alimentares precisam ser resistentes a condições severas de armazenamento e sucos digestivos, além de sais biliares (ARSLAN et al., 2016).

Os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os probióticos mais comumente usados em alimentos para consumo humano, dado os benefícios significativos à saúde associados à ingestão desses microrganismos (ROSS et al., 2005).

Os produtos probióticos são geralmente comercializados sob a forma de leites e iogurtes fermentados. Contudo, com o aumento do vegetarianismo do consumidor nos países desenvolvidos, existe uma demanda por produtos probióticos veganos. Os produtos probióticos veganos devem estar isentos de ingredientes de origem animal (HEENAN et al., 2004).

O sorvete pode ser uma alternativa de inclusão de probióticos na dieta humana, apresentando-se como um veículo adequado para esse tipo de microrganismo. Alguns estudos

têm demonstrado que é possível a produção de sorvete inoculado (SOUZA et al., 2010). Entretanto, a viabilidade das bactérias ácido lácticas durante o armazenamento é influenciada por sua resistência à temperatura de armazenamento. Na temperatura congelada, cristais de gelo são formados e atrapalham o crescimento das bactérias ácido lácticas, além de diminuir a viabilidade (SETYAWARDANI; SUMARMONO; WIDAYAKA, 2019).

Importante destacar que as frutas, quando incorporadas nesses alimentos, podem potencializar os efeitos benéficos do produto. Um exemplo é o tamarindo, que possui componentes bioativos importantes que auxiliam no combate contra doenças e na sua composição existem relatos de ácido tartárico, carboidratos, pectinas, pirazinas e tiazóis. Além disso, apresenta características tecnológicas e nutricionais importantes. No entanto, é um produto pouco utilizado pela indústria de alimentos (ABEBE, 2002; SANTOS et al., 2010).

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O estudo em questão tem o objetivo de analisar a viabilidade de *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 em *frozen* de mousse de tamarindo vegano elaborado com edulcorante *stevia*. Diante do aumento do número de pessoas optando por uma dieta com característica vegetariana ou vegana, com intolerância a lactose, alergia à proteína do leite de vaca e Diabetes *Mellitus*, um alimento do tipo *frozen*, adoçado com edulcorante e enriquecido com probiótico, torna-se uma opção interessante para esse público, visto que os produtos probióticos, na sua maioria, encontram-se em alimentos lácteos. Entretanto, é importante verificar o tempo de viabilidade dos microrganismos ao longo do período de congelamento para que o tempo de prateleira seja estabelecido.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Bactérias lácticas e probióticos

O grupo de bactérias do ácido láctico (BAL), é reconhecido como um dos mais importantes para o homem, tanto pelo papel que exerce na produção e preservação dos alimentos quanto pelo envolvimento em diferentes aspectos da saúde humana (FERREIRA, 2012).

São bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos, microaerofílicas ou anaeróbicas que produzem ácido láctico como o principal produto final da fermentação do açúcar. As BAL são tipicamente catalase e citocromo negativo aerotolerante e tolerante ao meio ácido. Os gêneros mais comum de BAL relacionados aos alimentos são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium* e *Weissella* (PAPADIMITRIOU et al., 2016).

As espécies de BAL tornaram-se um grupo industrialmente importante de bactérias usadas para a produção de alimentos fermentados, como iogurte, queijo e manteiga. Além disso, são microrganismos cruciais presentes em muitos processos usados para transformar e preservar os alimentos (EVIVIE et al., 2017).

Dentro das inúmeras estirpes das BAL, algumas são consideradas probióticos. A palavra “probiótico” deriva do grego e significa “para a vida”. Embora o termo e a definição precisa de probiótico tenham origem nos anos 90, o interesse por microrganismos potencialmente benéficos à saúde é de tempos remotos (RAIZEL et al., 2011). De acordo com a FAO (2002), probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do consumidor.

Os produtos alimentícios suplementados com probióticos podem conter uma ou várias estirpes bacterianas diferentes. Embora várias estirpes de bactérias e leveduras tenham sido caracterizadas até o momento como potencialmente probióticas, os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* constituem os principais representantes, sendo os mais comumente estudados (TERPOU et al., 2019).

Efeitos benéficos de culturas probióticas sobre a saúde do hospedeiro merecem destaque como é o caso das bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* que podem colaborar na digestão da lactose em indivíduos com intolerância a esse dissacarídeo, reduzir a

constipação e a diarreia, ajudar na resistência a infecções por patógenos indesejáveis, prevenir a "diarreia do viajante" e aliviar a síndrome do intestino irritável. O gênero *Bifidobacterium* é conhecido por estimular o sistema imunológico, produzir vitamina B, inibirem a multiplicação de patógenos, reduzir a concentração de amônia e colesterol no sangue e ajudarem a restabelecer a microbiota normal após tratamento com antibióticos. Assim sendo, esses microrganismos são comumente utilizados em intervenções dietéticas que visam à melhoria da saúde dos indivíduos (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

Para garantir efeitos de promoção da saúde foi afirmado que o nível "terapêutico mínimo" de microrganismos probióticos viáveis deve ser de pelo menos 10^6 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/grama (g) de células viáveis durante o prazo de validade do produto (TERPOU et al., 2019).

De acordo com a ANVISA (2007), a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove a sua eficácia. Karimi et al (2011) afirmaram que aproximadamente 100 g/dia de produtos probióticos devem ser consumidos para fornecer cerca de 10^9 células viáveis ao intestino diariamente.

No entanto, a viabilidade elevada não garante a sobrevivência do microrganismo durante a passagem pelo trato gastrointestinal até a chegada ao intestino, local de sua atuação. A secreção gástrica, contendo HCl e pepsina, representa um dos principais mecanismos de defesa do organismo humano contra a ingestão de microrganismos. Poucas bactérias lácticas conseguem resistir à passagem gástrica (SANTOS et al., 2016).

Os produtos probióticos baseados em alimentos representam um grande número de preparações e podem ser divididos em duas categorias distintas: laticínios, como queijos, iogurtes, sorvetes, leites e cremes acidificados e produtos não lácteos, como pão, chocolates, sucos e outras preparações de frutas. A vasta disponibilidade de produtos alimentares os torna um sistema transportador bom e potencialmente eficaz para a entrega de probióticos (TERPOU et al., 2019).

Na literatura, existem muitos estudos sobre o desenvolvimento de preparações com probióticos. Ong e Shah (2009) mostraram que o queijo Cheddar pode ser um veículo eficaz para carrear estirpes de *Bifidobacterium longum* 1941, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

LAFTI®B94 (B94), *Lactobacillus casei* 279, *Lb. casei* LAFTI®L26 (L26), *Lactobacillus acidophilus* 4962 ou *Lb. acidophilus* LAFTI® L10. L10 (L10). O queijo fresco também foi considerado um veículo adequado para a administração oral de *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *L. acidophilus* e *L. paracasei* (MEDICI; VINDEROLA; PERDIGÓN, 2004). Dimitrellou et al. (2019) mostraram que a análise feita com leite fermentado revelou que o uso de diferentes tipos de leite não afeta a viabilidade de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus casei*.

Os resultados de um estudo com chocolate realizado por Possemiers *et al.* (2010) mostraram uma sobrevivência significativa das células bacterianas de *Lactobacillus helveticus* e *Bifidobacterium longum*, levando à crença de que o chocolate pode ser usado para fornecer probióticos. Davidson *et al.* (2000) observaram que o *frozen yogurt* revelou-se um excelente veículo para a incorporação de bactérias probióticas e que o armazenamento sob congelamento teve pouca influência sobre a sobrevivência de *L. delbrueckii* ssp. e *S. thermophilus*.

Aragon-Alegro *et al.* (2007) desenvolveram uma mousse probiótica e simbiótica de chocolate, verificando a sobrevivência de *L. paracasei* ssp. *paracasei* LBC 81 ao longo de seu armazenamento refrigerado. O sorvete, como veículo de probióticos também foi estudado por Basyigit, Kuleasan, Karahan (2006). Os autores testaram uma mistura de estirpes de *Lactobacillus acidophilus*, *L. agilis* e *L. rhamnosus* de origem humana e verificaram que a viabilidade dos probióticos não foi alterada durante o armazenamento de sorvete por até 6 meses, independentemente da presença de açúcar ou aspartame como edulcorantes (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

Os produtos lácteos fermentados são geralmente boas matrizes alimentares para probióticos, mas o consumo desses produtos é limitado devido ao crescente vegetarianismo e ao grande número de indivíduos que são intolerantes à lactose ou em dietas restritas ao colesterol. Assim, o desenvolvimento de produtos probióticos não lácteos, incluindo matrizes alimentares à base de frutas, vegetais e cereais, tem sido amplamente estudado (MARTINS et al., 2013).

3.2. Produtos probióticos congelados

Sorvete é um alimento processado que é consumido em todo o mundo por pessoas de todas as idades. Os principais componentes estruturais do sorvete são glóbulos de gordura, ar e cristais de gelo que são dispersos em uma solução congelada e concentrados com proteínas, sais e polissacarídeos (MUSE; HARTEL, 2004). Atualmente, dentre as inovações encontradas em sorvetes pode-se destacar a adição de microrganismos probióticos (SOUZA et al., 2010).

O sorvete representa uma matriz interessante e diferente para carrear probióticos. Ao contrário do leite fermentado, onde a viabilidade probiótica é medida em semanas ou, em casos ideais, meses, o sorvete é capaz de garantir a estabilidade de estirpes probióticas em níveis clínicos por mais de um ano. Quando armazenado adequadamente (-18°C ou menos), o sorvete pode garantir a estabilidade de probióticos por mais tempo do que qualquer outra aplicação láctea (1 ano ou mais) devido ao seu formato congelado (FENSTER et al., 2019).

Outros fatores tipicamente associados ao sorvete que auxiliam na estabilidade probiótica incluem pH neutro (ou mais próximo do neutro), alto teor de sólidos totais e, principalmente, conteúdo de gordura (FENSTER et al., 2019). Além disso, a incorporação de bactérias probióticas na formulação do sorvete não afeta a qualidade global do produto quando comparado com um sorvete convencional (CRUZ et al., 2009).

Com base nas práticas de fabricação, o pH do sorvete probiótico pode variar de 4,5 a 6,3 para formulações totalmente fermentadas e não fermentadas, respectivamente. Está bem estabelecido que os *Lactobacillus* são mais tolerantes aos ácidos que as *Bifidobactérias*; conseqüentemente, um pH de 5,0 ou 5,5 e superior, é geralmente recomendado para sorvetes probióticos, respectivamente (SOUKOULIS; LEBESI; TZIA, 2009).

No entanto, existem obstáculos a serem superados antes que a inclusão bem sucedida de probióticos seja alcançada nos sorvetes. A saturação, que areja a mistura de sorvete antes da embalagem, pode causar uma queda na contagem de células viáveis devido ao aumento da incorporação de oxigênio. Além disso, o sorvete pode ser usado como veículo para administração de probióticos e prebióticos se o congelamento e o descongelamento não causarem danos às células e se as características finais do produto forem preservadas (CRISCIO et al., 2010).

Em cada estágio, as células probióticas são submetidas a diferentes fatores de estresse, incluindo compostos químicos prejudiciais na fórmula do produto (por exemplo, pH, acidez titulável e teor de açúcar), lesões de congelamento e toxicidade de oxigênio. Durante o processo de congelamento, as células probióticas podem ser letalmente feridas por danos às paredes ou membranas celulares causada pelas tensões mecânicas dos cristais de gelo formados em meio externo ou no interior das células, por lesões causadas pelo frio e diminuição da temperatura. Diante disso, o tamanho dos cristais de gelo aumentam à medida que a taxa de congelamento diminui e conseqüentemente, maiores cristais de gelo intracelulares causam maiores danos às células (MOHAMMADI et al., 2011).

Para minimizar essa ameaça, pode ser aconselhável empregar uma etapa de congelamento rápido para controlar a formação de pequenos cristais de gelo no produto e nas células bacterianas, o que conferem o aspecto cremoso característico do sorvete (NARAIN et al., 2006; FENSTER et al., 2019).

Além disso, o congelamento rápido do sorvete após a inoculação das bactérias probióticas contribui para a manutenção das populações desses microrganismos no produto. Sendo assim, durante o armazenamento congelado, oscilações de temperatura que levam a fusão parcial periódica e recongelamento devem ser evitados (MOHAMMADI et al., 2011).

Diversas investigações tem mostrado que culturas de probióticos podem manter a sua estabilidade melhor em nível de alimentos congelados em comparação com leites fermentados com probióticos (ALAMPRESE et al., 2002). No estudo de Souza et al. (2013), o sorvete mostrou ser um bom veículo para a adição de microrganismo probiótico, especificamente o *L. casei*. O *L. casei* se manteve viável durante a vida de prateleira, podendo o sorvete ser considerado um produto funcional durante 28 dias de armazenamento.

Akalin et al. (2017) obtiveram contagens viáveis de *L. acidophilus* entre 10^6 e 10^7 UFC/g nas amostras de sorvete controle e sorvete probiótico enriquecido com fibra de trigo durante o armazenamento por 180 dias. Phuapaiboon (2016) relatou que, após 50 dias de armazenamento de sorvete, em estudo de imobilização de bactérias probióticas com farinha de banana, chegou a resultados do número de *L. casei* e *L. acidophilus* acima de 10^8 e 10^7 UFC/g, respectivamente. Estes resultados mostram que o sorvete é um veículo adequado para incorporação probiótica (PRATA et al, 2018).

3.3. Produtos probióticos elaborados com substituto do açúcar

Recentemente, a crescente demanda dos consumidores por alimentos saudáveis e funcionais levou à produção de sorvete contendo ingredientes especiais com propriedades nutricionais e fisiológicas (ABOULFAZLI et al. 2016).

Na formulação de sorvete, o principal adoçante usado é a sacarose, embora outros açúcares podem ser usados, como glicose, frutose e açúcares álcoois. Entretanto, maior ingestão de açúcares adicionados está associada com maior consumo de energia e menor qualidade da dieta, o que pode aumentar o risco de obesidade, pré-diabetes, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (CAILLET et al., 2003).

Diante disso, a indústria alimentícia tem utilizado alternativas para reduzir o teor de açúcar em seus produtos, como adoçantes naturais e artificiais (ACADEMY OF NUTRITION AND DIETETICS, 2012), tendo em vista que os adoçantes têm conteúdo calórico desprezível, mas geralmente possuem doçura muitas vezes maior que a da sacarose. Portanto, pequenas quantidades no produto final costumam ser suficientes (SOUKOULIS; FISK; BOHN, 2014).

Os adoçantes contribuem para a redução do ponto de congelamento, aumentam a viscosidade, melhoram o corpo tornando-o mais cremoso, e intensificam o sabor das frutas adicionadas, além de influenciarem na cristalização e formação do tamanho do cristal (MOSQUIM, 1999).

No entanto, eliminar o açúcar na formulação de sorvete não é tão simples, pois pode resultar em um produto sem características sensoriais adequadas (MARSHALL et al., 2003). A redução de açúcar normalmente causa alterações nas propriedades coligativas do sorvete e nas propriedades reológicas devido à alteração no tamanho e forma dos cristais (SOUKOULIS; LEBESI; TZIA, 2009). Além disso, açúcares, que são usados como ingredientes-chave em sobremesas e sorvetes, tem efeitos complexos na viabilidade de probióticos em produtos congelados (MOHAMMADI et al., 2011).

Embora eles possam reduzir a sobrevivência dos probióticos porque o estresse osmótico pode afetar a viabilidade celular (JAY et al. 2006), eles podem ao mesmo tempo aumentar a viabilidade probiótica atuando como crioprotetor (CHAMPAGNE, 2009). O efeito final pode depender do tipo e concentração de açúcares, tipo de

probiótico, temperatura de congelamento, bem como do tempo de armazenamento (MOHAMMADI et al., 2011).

Algumas pesquisas tem estudado a substituição da sacarose por edulcorantes nos produtos probióticos congelados. Soukoulis; Fisk; Bohn (2014) viram que a presença de sacarose ou aspartame no sorvete acidificado não afetou as contagens viáveis de uma mistura simbiótica/ probiótica composta por *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* durante 180 dias a -20°C. Alizadeh et al (2014) descobriram que a substituição da sacarose pela stevia melhora a aceitação sensorial da amostra de sorvete.

3.4. Edulcorante de *Stevia*

3.4.1 *Stevia rebaudiana* Bertoni

Os edulcorantes são considerados aditivos alimentícios e precisam ser solúveis em água e estáveis na presença dos demais ingredientes de uma preparação alimentícia, de forma a assegurar a estabilidade do produto final e conseqüentemente a sua vida de prateleira (SHEET et al., 2014). Esses compostos são utilizados para adoçar os alimentos especialmente elaborados para diabéticos ou para pessoas com sobrepeso, que desejam a ingestão de alimentos com densidade calórica reduzida. Edulcorantes podem ser não calóricos ou de baixa caloria (ARAÚJO et al., 2016).

O esteviosídeo é um glicosídeo diterpênico extraído de uma planta conhecida como *Stevia rebaudiana* Bertoni; seu gosto doce é seguido de um forte gosto amargo residual. A sua propriedade edulcorante já era conhecida pelos índios guaranis, que o usavam para edulcorar chás e bebidas medicamentosas. Desde 1970 o esteviosídeo é utilizado no Japão como agente edulcorante e em bebidas, tendo sido aprovado no Brasil em meados de 1987 como agente flavorizante e edulcorante em várias classes de alimentos e, nos Estados Unidos, em 1996, para ser utilizado como ingrediente para suplementos dietéticos (ARAÚJO et al., 2016).

As folhas da planta da *Stevia rebaudiana* contêm nove substâncias doces distintas que se encontram em derivados de formas distintas no grupo hidroxila e no grupo carboxila do ácido hidroxil terpênico esteviol. O edulcorante de *stevia* comercial geralmente é uma fonte de esteviosídeos e rebausídeos. Enquanto o esteviosídeo exibe amargor e sabor residual

indesejável, o rebaudiosídeo A apresenta o melhor perfil de sabor da mistura (ARAÚJO et al., 2016).

Além de seu baixo índice glicêmico, os adoçantes à base de esteviosídeo também são caracterizados por boa estabilidade ao calor (até 140°C) e baixa degradação em ambientes ácidos e alcalinos (pH na faixa de 2 a 10), e agem de forma protetora contra a degradação de vitaminas hidrossolúveis, como o ácido ascórbico (KROYER, 2010), presente em sorvetes contendo polpa de frutas ricas em ácido ascórbico (SOUKOULIS; FISK; BOHN, 2014).

Jooken et al. (2012), investigando a estabilidade dos glicosídeos de esteviol em diferentes alimentos, incluindo sorvetes, não relatou degradação detectável dos glicosídeos de esteviol em sorvetes armazenados a -18°C por 12 semanas. No entanto, os glicosídeos de esteviol não podem substituir totalmente a sacarose (devido a efeitos adversos nas características de textura, sabor e sabor), embora permitam reduzir o teor de açúcar em até 30% (SOUKOULIS; FISK; BOHN, 2014).

3.5. Tamarindo

O tamarindo (*Tamarindus indica* L.) é um fruto originário da África Tropical, de onde se dispersou por todas as regiões tropicais do mundo. No Brasil, as plantas foram introduzidas da Ásia, e mostram-se bem adaptadas e subespontâneas em vários estados. Atualmente é encontrada nas Regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, em plantações não organizadas e dispersas, devido à pouca ou quase nenhuma atenção dada à cultura (SILVA et al., 2000).

O tamarindeiro (*Tamarindus indica* L.) é uma árvore frutífera bastante decorativa, pertencente à família Leguminosae, podendo alcançar até 25 m de altura. Seu fruto é uma vagem alongada, com 5 a 15 cm de comprimento, com casca pardo-escura, lenhosa e quebradiça, contendo três a oito sementes envolvidas por uma polpa parda e ácida (DONADIO et al., 1988).

A polpa desta fruta é acidulada, sendo consumida fresca ou cristalizada, também usada no preparo de refrescos, sorvetes, pastas, doces e licores (DONADIO et al., 1998). Entretanto, na Índia, a polpa é consumida crua e adoçado com açúcar. Na Ásia, no entanto, as vagens

verdes imaturas são frequentemente comidos por crianças e adultos e mergulhadas em sal como um lanche (SINGH; WANGCHU; MOOND, 2007).

3.6. Efeitos benéficos do tamarindo

Alguns estudos preliminares sobre o tamarindo revelaram que este fruto possui características tecnológicas e nutricionais importantes para a indústria de alimentos como a pectina. Além da presença das fibras solúveis (4,5g/100g) e insolúveis (6,4g/100g), este fruto apresenta teores elevados de minerais como potássio (723mg/100g), cálcio (37mg/100g), magnésio (59mg/100g), fósforo (55mg/100g), manganês (0,34mg/100g) e zinco (0,7mg/100g) (SANTOS et al., 2010).

Outra característica importante para o uso do fruto como matéria-prima para a indústria é a sua baixa umidade (22,0%) e elevada acidez (pH=2,2 a 2,4), propriedades que favorecem a sua conservação e de seus derivados. Soma-se a estes fatores o sabor pronunciado do fruto, bastante característico e apreciado (FERREIRA et al, 2010; SANTOS et al., 2010).

A literatura traz relatos sobre compostos de tamarindo, tendo em vista que eles são ricos em ácidos orgânicos como tartárico, cítrico, málico e ascórbico (VIEIRA NETO, 2002), sendo destaque como o mais azedo de todos os frutos (WATANABE, 2007).

Além disso, o tamarindo é um antioxidante. A atividade antioxidante está geralmente relacionada à presença de compostos fenólicos que mostram estruturas comuns específicas que lhes permitem ser agentes redutores, doadores de hidrogênio e captadores de oxigênio (MENEZES et al., 2016). No nível celular, vários compostos antioxidantes são conhecidos por ser capaz de estabilizar ou destruir os radicais livres, desse modo evitando danos às estruturas celulares (MENEZES et al.,2016).

3.7. Alimentos funcionais

A ideia de que alimentos poderiam prevenir doenças e serem usados como tratamento surgiu há milênios. Hipócrates dizia: “Que o teu remédio seja o teu alimento e o teu alimento

seja o teu remédio”. Porém o termo alimento funcional foi empregado só em meados de 80, introduzidos pelos japoneses, que o definiram como “alimentos utilizados como parte de uma dieta normal, e que demonstram benefícios fisiológicos e/ou reduzem o risco de doenças crônicas, além de suas funções básicas nutricionais” (RAIZEL et al., 2011).

Dentre as definições, a mais usual é a contida na resolução nº 2 de 07/01/2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a qual descreve alimento funcional como “todo alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido na dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica”.

É sabido que muitos nutrientes possuem propriedades funcionais como os probióticos, simbióticos e prebióticos, entretanto estes têm efeitos benéficos ao organismo contribuindo, em especial, com a melhoria da flora intestinal do cólon, o que é um fator imprescindível no equilíbrio e manutenção da saúde (RAIZEL et al., 2011).

Entretanto, os alimentos funcionais comerciais no mercado de alimentos são principalmente produtos lácteos, embora os consumidores exijam cada vez mais novos produtos funcionais que não são lácteos. Com o aumento da intolerância à lactose e alergias, foram feitas tentativas para desenvolver alimentos à base de frutas como uma alternativa aos alimentos funcionais lácteos tradicionais (PRADO et al., 2008).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar a sobrevivência de *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 em *frozen* de mousse de tamarindo vegano elaborado com stevia.

4.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver um *frozen* de mousse de tamarindo probiótico vegano elaborado com stevia;

- Avaliar a sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 em *frozen* de mousse de tamarindo vegano elaborado com stevia durante o período de estocagem;
- Analisar a sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 em *frozen* de mousse de tamarindo vegano exposto à ciclos de congelamento e descongelamento.

5. METODOLOGIA

5.1. Caracterização do Estudo

O presente trabalho trata-se de um estudo de caráter experimental quantitativo e qualitativo, realizado entre os meses de abril a julho de 2019, em Brasília, Distrito Federal.

5.2. Elaboração da mousse

A mousse vegana de tamarindo foi preparada como meio base para incorporação do potencial probiótico *Lactobacillus paracasei* LBC 81. A mousse foi elaborada baseada na ficha técnica de preparação elaborada por MAGALHÃES e SILVA (2018), exceto a adição de açúcar que foi substituída por edulcorante. A mousse foi elaborada com mandioca, amêndoas, polpa de tamarindo caseira e edulcorante *stevia*. A mousse foi executada em quatro etapas distintas, sendo a primeira a despolpa caseira do tamarindo, em seguida o preparo do extrato de amêndoas, depois a base da mousse, e por último, a preparação da mousse com diferentes concentrações da fruta, sendo 0% (controle), 20%, 33% e 42%.

5.2.1. Despolpa do tamarindo

O tamarindo foi submerso em uma vasilha com água fria por 3 minutos para a casca amolecer e ser retirada manualmente. Em seguida, o tamarindo foi colocado no liquidificador Philips Walita® e ligado no modo “pulsar” por quatro vezes com o objetivo desprender a polpa da semente. A despolpa foi finalizada manualmente.

5.2.2. Extrato de amêndoas

No Thermomix® (Vorwerk®) foram trituradas 44 g de amêndoas sem casca, por 30 segundos. Logo após, foi aquecido no microondas 220 mL de água, por 1 minuto e 30 segundos. Foi adicionado 14,4g de edulcorante *stevia* à água quente e amêndoas trituradas.

Os três ingredientes - água quente, amêndoas trituradas e edulcorante *stevia* - foram batidos no liquidificador por 3 minutos até homogeneizar. O extrato foi condensado no fogão, em fogo médio, por 28 minutos, com a finalidade de reduzir $\frac{1}{3}$.

5.2.3. Base da mousse

Na panela de pressão foi cozida 168g de mandioca com água, por 30 minutos, após iniciar a pressão. Escorreu a mandioca cozida e colocou no Thermomix® para ficar na consistência de purê (creme), onde usou o modo pulverização (sorvete), por 1 minuto. Em seguida, foi adicionado ao purê, que encontrava-se no Thermomix®, o extrato de amêndoas e misturado ao purê de mandioca no modo pulverização (sorvete), por 1 minuto.

5.2.4. Preparação da mousse com diferentes concentrações de tamarindo

Os ingredientes utilizados em cada mousse foram pesados em uma balança digital. Foram distribuídos em copos de plástico 90g da base da mousse (purê) e, posteriormente, foi adicionado 22,5g, 45g, 67,5g de polpa de tamarindo em cada copo, correspondendo às concentrações 20%, 33% e 42%, respectivamente. Exceto na controle, que é composta apenas pela base da mousse, sem tamarindo. Todas as preparações foram homogeneizadas no final e permaneceram na geladeira por 12 horas.

5.3. Obtenção do concentrado de células

5.3.1. Obtenção da cultura estoque

A cultura de *Lactobacillus paracasei* LBC 81 armazenada no freezer a temperatura - 80°C, foi ativada em meio caldo MRS e incubada em estufa bacteriológica a 37°C, por aproximadamente 16 horas. Uma alíquota de 200µL da cultura ativa foi adicionada em 10 ml

de caldo MRS e incubada nas mesmas condições mencionadas anteriormente para ser analisada no dia seguinte.

5.3.2. Preparo do concentrado de células e ativação da cultura

Antes do concentrado de células ser incorporado ao mousse, a cultura foi reativada. Para isso, 0,6 ml da cultura ativa foi adicionada em quatro tubos falcon contendo 30 ml de caldo MRS.

Os tubos falcon com 30 ml com meio caldo MRS foram centrifugados a 5.000 rpm por 5 minutos, lavados com 3 ml de solução salina 0,85%, agitados no Vortex e o sobrenadante eliminado. Essa operação foi repetida por duas vezes.

Após a centrifugação, o concentrado de células obtido foi ressuspenso em 3 ml de solução salina 0,85%, homogeneizados, diluídos e plaqueados pela técnica de microgotas em triplicata a 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} . Em seguida, foi centrifugado novamente a 5.000 rpm por 5 minutos, lavados com 3 ml de solução salina 0,85% e o sobrenadante foi eliminado. Dessa forma, obteve-se o concentrado de células

5.3.3. Incorporação do concentrado de células à mousse

Foram pesados 35g de cada mousse com concentração de 0%, 20%, 33% e 42% de polpa de tamarindo e reservados na bancada. Posteriormente, foram adicionados 1 ml de solução salina 0,85% no tubo Falcon contendo o concentrado de células para dissolvê-las e desgrudá-los do fundo. Então, com uma espátula flambada, o concentrado de células foi incorporado a cada mousse.

Em seguida, foram identificados 40 sacos transparente com fecho do tipo *ziplock*, sendo 10 unidades para cada concentração, e adicionado 1g de mousse com concentrado de células em cada. A quantidade que sobrou foi acondicionada em outros sacos extras, sendo esses com maior quantidade.

Uma amostra de cada concentração de mousse foi armazenada na geladeira para ser analisada no dia seguinte. As demais amostras foram estocadas em *freezer* a - 80°C para que a

viabilidade da mousse com probióticos fossem avaliadas em um período de tempo pré determinado.

5.4. Análise microbiológica

As amostras contendo 1g de alimento foram separadas e, então, realizadas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-6} . Sendo assim, foram selecionadas tais diluições para realizar o plaqueamento pela técnica de microgotas em triplicata para a determinação da viabilidade dos potenciais probióticos. As placas foram incubadas a 37°C , pelo período de 24 horas. Após esse período, foi selecionado para contar as microgotas que estavam entre a faixa de 18 a 80 colônias para determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

As demais análises microbiológicas foram realizadas da mesma forma, porém, as amostras de mousse estavam congeladas a -80°C , e por isso, era necessário aguardar o descongelamento em temperatura ambiente para iniciar o processo. A partir do 5º dia de incorporação dos microrganismos na mousse, as análises aconteceram a cada 15 dias.

5.5. Ciclos de congelamento e descongelamento

Após 53 dias da elaboração e congelamento das mousses de tamarindo e das primeiras seis análises microbiológicas do produto, foram realizadas mais cinco análises em dias consecutivos, com a mesma técnica de microgotas em triplicata, em placas de Petri contendo meio ágar MRS.

As mousses em diferentes concentrações de tamarindo e o controle (sem tamarindo) passaram por ciclos de congelamento e descongelamento, onde foram diariamente descongeladas em temperatura ambiente e congeladas novamente.

Importante ressaltar que no primeiro ciclo de descongelamento as amostras estavam armazenadas a -80°C e a partir do segundo ciclo estavam em congelador a -6°C . A análise microbiológica foi realizada com a metodologia descrita no item 5.4.

5.6. Análise Estatística

Para a análise da viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 durante o período de estocagem foi utilizado o esquema fatorial 4x6 (quatro níveis de tamarindo e seis períodos de estocagem). Os dados foram analisados em esquema fatorial, em delineamento inteiramente casualizado. Os níveis de tamarindo, os períodos de estocagem, bem como, as interações entre os fatores, foram considerados efeitos fixos.

Após análise de variância, as interações significativas entre os fatores foram desdobradas por meio de análise de regressão e pelo teste *Tukey*. As equações foram escolhidas com base nos seus coeficientes de determinação e na significância dos coeficientes de regressão. Adotou-se 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I, por intermédio do PROC MIXED do SAS versão 9.4 (versão 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC).

Para análise da viabilidade durante a exposição a ciclos de congelamento e descongelamento foi utilizado o esquema fatorial 4x5 (quatro níveis de tamarindo e cinco ciclos de congelamento e descongelamento). Os dados foram analisados em esquema fatorial, em delineamento inteiramente casualizado. Após análise de variância, as interações significativas entre os fatores foram desdobradas e comparadas pelo teste *Tukey*. Adotou-se 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I, por intermédio do PROC MIXED do SAS versão 9.4 (versão 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sobrevivência do *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 em *frozen* de mousse de tamarindo vegano elaborado com edulcorante *stevia* foi determinado em diferentes tempos de estocagem (Tabela 1).

Tabela 1 – Sobrevivência de *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 em *frozen* de mousse vegano elaborado com *stevia* e diferentes percentuais de tamarindo durante o período de estocagem.

Viabilidade (Log UFC/g) de <i>L. paracasei</i> LBC 81				
Período de estocagem (dias)	<i>Frozen</i> - Percentual de tamarindo			
	0% T	20% T	33% T	42% T
0	8,58 a	8,49 b	9,09 a	9,10 a
1	8,60 a	8,50 b	9,15 a	9,16 a
5	8,58 a	8,59 b	8,51 b	8,35 bc
19	8,24 b	8,23 b	8,31 c	8,11 c
32	8,60 a	9,06 a	8,60 b	8,60 b
46	8,49 a	8,44 bc	8,58 b	8,41 bc

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste *Tukey* ($P>0,05$).

Observa-se que no *frozen* controle (sem adição de tamarindo, 0%) com 19 dias de estocagem a -80°C apresentou uma perda de viabilidade significativa ($P<0,05$) em comparação aos demais tempos de estocagem. Com 32 dias de estocagem observa-se um aumento da viabilidade de *L. paracasei* LBC 81. Variações como essa são esperadas, tendo em vista que trata-se de estudo biológico, onde vários fatores podem levar a essa variação.

No *frozen* com adição de 20% de tamarindo observa-se que, com 32 dias de estocagem, a viabilidade foi significativamente ($P<0,05$) maior que nos demais tempos de estocagem. Apesar desta diferença, do ponto de vista de funcionalidade, o fator tempo de estocagem não é considerado um fator de comprometimento da funcionalidade, visto que o produto contém uma população microbiana adequada para proporcionar benefícios à saúde do consumidor nos diferentes períodos de estocagem.

Com a adição de 33% de tamarindo no *frozen*, o resultado está mais coerente com o esperado. Observa-se que a viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 após o preparo e depois de 24 horas de estocagem sob refrigeração, não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$).

Entretanto, nos diferentes períodos de estocagem a -80°C a perda de viabilidade foi significativa ($P<0,05$) quando comparada com as amostras antes do congelamento.

No *frozen* com adição de 42% de tamarindo os resultados estão semelhantes aos vistos no produto com 33% de tamarindo. Observa-se que a viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 após o preparo e depois de 24 horas de estocagem sob refrigeração, não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$). Entretanto, nos diferentes períodos de estocagem a -80°C a perda de viabilidade foi significativa ($P<0,05$) quando comparada com as amostras antes do congelamento.

Observa-se que com 46 dias de estocagem a -80°C a perda de viabilidade foi significativamente ($P<0,05$) maior em todas as formulações adicionadas de tamarindo. A perda de viabilidade no decorrer do período de estocagem é um resultado esperado, visto que a tendência é o aumento da injúria celular. Embora a estocagem do *frozen* mousse tenha sido realizada a -80°C , a perda de viabilidade de *L. paracasei* foi observada. Em congeladores a -20°C a perda de viabilidade provavelmente seria maior, visto que o congelamento da água é mais lento o que leva a formação de cristais de gelos grandes, que ocasionam maior perda de viabilidade.

Cabe ressaltar, que estatisticamente esse foi o pior resultado, mas funcionalmente não apresentou diferença com as demais amostras. No estudo de Kim et al (2009), em 5 meses de armazenamento, a diminuição nas concentrações de bactérias lácticas foi de $2,70 \times 10^8$ para $1,95 \times 10^8$ UFC/g a aproximadamente -12 a -18°C . Eles também relataram a diminuição de 10% no número de bactérias lácticas após aproximadamente 17 semanas de armazenamento.

Geralmente, a letalidade dos probióticos durante o congelamento está principalmente associada à ocorrência de tensões osmóticas e mecânicas. Do ponto de vista mecanicista, taxas de congelamento extremamente altas (choque frio) podem levar ao aumento da permeabilidade das membranas, resultando em vazamento de material intracelular devido à formação de gelo intracelular e extracelular, induzindo danos mecânicos na membrana celular (SOUKOULIS; FISK; BOHN, 2014).

É importante destacar que em todas as formulações a perda de viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 foi baixa. Isto significa que 46 dias de estocagem não seja tempo suficiente para observar perda mais acentuada da viabilidade. O efeito do período de estocagem sobre a

viabilidade de *L. paracasei* poderia ter sido pronunciado, se o período de estocagem fosse mais prolongado.

No estudo de Heenan *et al.* (2004) que avaliou a sobrevivência de estirpes probióticas em sobremesa não fermentada vegetariana congelada, ao longo do armazenamento por 28 semanas, as estirpes de *L. acidophilus* MJLA1, *L. paracasei ssp. paracasei* Lp-01, *B. lactis* BDBB2 e *B. lactis* Bb-12 permaneceram com populações acima de 7 log UFC g⁻¹ no produto nesse período.

O efeito do percentual de polpa de tamarindo no *frozen* mousse foi avaliado sobre a viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 nos diferentes períodos de estocagem (Tabela 2).

Tabela 2 – Equações de regressão e coeficientes de determinação para a viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 em *frozen* com diferentes percentuais de tamarindo.

Período de estocagem (dias)	Equações e coeficiente (R ²) de regressão	
0	Y = 8,491x + 0,00864	(R ² = 0,69)
1	Y = 8,501x + 0,009	(R ² = 0,67)
5	Y = 8,623x - 0,003	(R ² = 0,62)
19	Y = 8,22x ² + 0,004x - 0,00007	(R ² = 0,27)
32	Y = 8,66x ² + 0,01x - 0,00018	(R ² = 0,39)
46	Y = 8,571x - 0,001	(R ² = 0,156)

Independentemente do período de estocagem a variação do percentual de tamarindo compromete significativamente (P<0,05) a viabilidade de *L. paracasei* LBC 81. As equações de regressão linear ou quadrática foram escolhidas para explicar esta variação da viabilidade, em relação ao percentual de tamarindo adicionado. Embora a perda de viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 seja significativa (P<0,05) em função do percentual de polpa de tamarindo

adicionado, em termos de funcionalidade, o aumento do percentual de tamarindo não compromete os benefícios à saúde do consumidor proveniente dessas diferentes formulações.

A sobrevivência do *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 em *frozen* foi determinado após exposição a ciclos de congelamento e descongelamento (Tabela 3).

Tabela 3 - Sobrevivência de *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 em *frozen* de mousse de tamarindo elaborado com *stevia* e diferentes percentuais de tamarindo submetidos ciclos de congelamento e descongelamento.

Viabilidade (Log UFC/g) de <i>L. paracasei</i> LBC 81				
Ciclos de congelamento e descongelamento	<i>Frozen</i> - Percentual de tamarindo			
	0 % T	20 % T	33 % T	42 % T
C1	9,21 Aa	8,60 Ab	8,57 Ab	8,53 Ab
C2	8,56 Ba	7,96 Bb	7,10 Bc	ND
C3	8,53 Ba	7,56 CDb	ND ¹	ND
C4	8,43 Ba	7,77 BCb	ND	ND
C5	8,43 Ba	7,45 Db	ND	ND

¹Não detectado (< 1 log UFC/g). Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

O *frozen* mousse sem adição de tamarindo (0%) foi o que permitiu significativamente (P<0,05) maior viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 nos diferentes ciclos de congelamento e descongelamento. Esperava-se, de fato, esse resultado, tendo em vista que essa preparação não apresentava, na sua composição, o tamarindo que é uma fruta ácida. O pH neutro de uma sobremesa congelada é propício à sobrevivência probiótica, uma vez que alguns organismos probióticos são susceptíveis à inativação quando armazenados em condições ácidas (HEENAN et al., 2004).

Independentemente da adição de tamarindo observa-se que no primeiro ciclo de descongelamento (C1) a viabilidade é significativamente (P<0,05) maior que nos demais

ciclos de congelamento. Então, independente da adição de tamarindo, no primeiro ciclo a sobrevivência é maior. Uma possibilidade que tal decréscimo expressivo não tenha ocorrido é pelo fato de que algumas bactérias tenham uma resposta a condição de adaptação de estresse, ou seja, as bactérias conseguem se adaptar a uma condição ácida do alimento (MAGALHÃES e SILVA (2018). Além disso, isso era esperado, pois o produto estava exposto a menos danos no primeiro ciclo, e de acordo com Harrison Junior (1955), o segundo congelamento é sempre mais letal do que o primeiro.

Observa-se que o aumento do percentual de polpa de tamarindo afeta significativamente ($P < 0,05$) a perda de viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 durante os ciclos de congelamento e descongelamento. Isto demonstra que a perda de viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 durante os ciclos de congelamento e descongelamento também é afetado pelo pH da polpa de tamarindo. Diante disso, verifica-se que, conforme o percentual de tamarindo no *frozen* é aumentado, em um certo momento dos ciclos de congelamento e descongelamento, os microrganismos perdem totalmente a viabilidade.

Segundo Sanhueza et al. (2015), existem evidências que sustentam que a parede e a membrana celular mudam durante a resposta ao estresse. Os danos causados pela exposição a ácidos incluem um acúmulo intracelular de prótons, bem como danos estruturais na membrana celular, DNA e proteínas (CORCORAN et al., 2008).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A estabilidade da viabilidade de *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 durante o período de estocagem foi observada no *frozen* de mousse de tamarindo vegano elaborado com stevia. Acredita-se que a estocagem a -80°C possa ser o fator responsável pela manutenção da estabilidade da viabilidade de *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC 81, e com isso não permitiu uma redução da viabilidade de modo mais acentuado. A exposição a cinco ciclos de congelamento e descongelamento demonstrou que a viabilidade de *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 é reduzida à medida que aumenta o percentual de tamarindo.

É necessário, em estudos futuros, avaliar este produto em condições de estocagem a -18°C , de modo avaliar a estabilidade da viabilidade de *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 em condições normalmente adotadas em ambiente doméstico e comercial.

8. Referências Bibliográficas:

1. ABEBE, W. Herbal medication: potential for adverse interactions with analgesic drugs. **Journal of Clinical Pharmacy & Therapeutics**. v. 27, p. 391-401, 2002.
2. AKALIN, A S. et al. Enrichment of probiotic ice cream with different dietary fibers: Structural characteristics and culture viability. **Journal of Dairy Science**, SI, 2018. 37 - 46.
3. ALAMPRESE, C. et al. Survival of *Lactobacillus Johnsonian* La1 and influence of its addition in retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentrations. **International Dairy Journal**, Milan, v. 12, n. 2-3, p.201-208, jan. 2002. Elsevier BV
4. ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Brasília, 2007.
5. ANVISA, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/resultadodebusca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_i=column1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_11_assetEntryId=2864062&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=probioticos&inheritRedirect=true>. Acesso em Setembro de 2018.
6. ARSLAN, A. A. et al. Viability of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 incorporated into ice cream using three different methods. **Dairy Science & Technology**, [s.l.], v. 96, n. 4, p.477-487, 16 mar. 2016.
7. ARAGON-ALEGRO, L.C et al. Probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT – Food Sci. Technol.**, v.40, p.669-675, 2007.
8. BATISTA, N. et al. Nondairy ice cream based on fermented yam (*Dioscorea* sp.). **Food Science & Nutrition**, [s.l.], v. 7, n. 5, p.1899-1907, 23 abr. 2019.

9. BASYIGIT, G.; KULEASAN, H.; KARAHAN, A.G. Viability of human-derived probiotic lactobacilli in ice cream produced with sucrose and aspartame. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v.33, p.796-800, 2006.
10. CAILLET, A. et al. Characterization of ice cream structure by direct optical microscopy. Influence of freezing parameters. **LebensmWiss u-Technol**, v.36, p.743-749, 2003.
11. CHAMPAGNE, C. P. Some Technological Challenges in the Addition of Probiotic Bacteria to Foods. **Prebiotics and Probiotics Science and Technology**, [s.l.], p.761-804, 2009.
12. CHAMPAGNE, Claude P. et al. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 149, n. 3, p.185-193, out. 2011.
13. CORCORAN, B. et al. Life Under Stress: The Probiotic Stress Response and How it may be Manipulated. **Current Pharmaceutical Design**, Cork, v. 14, n. 14, p.1382-1399, 1 maio 2008.
14. CRISCIO, T. et al. Production of functional probiotic, prebiotic, and symbiotic ice creams. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 93, n. 10, p.4555-4564, out. 2010.
15. CRUZ, A. G. et al. Ice-cream as a probiotic food Carrier. **Food Res. Int.**, v. 42, p. 1233-1238, 2009.
16. DAVIDSON, R.H. et al. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. **J. Dairy Sci.**, v.83, p.666-673, 2000.
17. DIMITRELLOU, D. et al. Effect of Milk Type on the Microbiological, Physicochemical and Sensory Characteristics of Probiotic Fermented Milk. **Microorganisms**, Grécia, v. 7, n. 21, 21 ago. 2019.
18. EVIVIE, E. S. et al. Some current applications, limitations and future perspectives of lactic acid bacteria as probiotics. **Food & Nutrition Research**, v. 61, n. 1, 3 May 2017.

19. FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. **Organization Guidelines for Evaluation of Probiotics in Food**, London, Ontario, Canadá, p.1–11, 2002.
20. FENSTER, K. et al. The Production and Delivery of Probiotics: A Review of a Practical Approach. **Microorganisms**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.83-93, 17 mar. 2019.
21. FERREIRA, C.L.L.F. **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Rio de Janeiro: Rubio, 2012. 248 p.
22. GOVENDER, M. et al. A Review of the Advancements in Probiotic Delivery: Conventional vs. Non-conventional Formulations for Intestinal Flora Supplementation. **Aaps Pharmscitech**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.29-43, 25 set. 2013.
23. HARRISON JUNIOR, Arthur P. SURVIVAL OF BACTERIA UPON REPEATED FREEZING AND THAWING'. Harrison Ap, Jr (1955). **Journal Of Bacteriology** , 70 (6) Nashville, p. 711-715. dez. 1955.
24. HEENAN, C.n. et al. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. **Lwt - Food Science And Technology**, Sidney, v. 37, n. 4, p.461-466, jun. 2004.
25. JAY, J. M. *et al.* **Modern Food Microbiology**. 7^a. ed. [S.L.]: Springer Science & Business Media, 2006. 790 p.
26. JOOKEN, E. et al. Stability of Steviol Glycosides in Several Food Matrices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Oostende, v. 60, n. 42, p.10606-10612, out. 2012.
27. KARIMI, R. et al., Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. **Dairy Science & Technology**, [s.l.], v. 91, n. 3, p.283-308, fev. 2011.
28. KERRY, R. G. et al. Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of Food and Drug Analysis**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.927-939, jul. 2018. Elsevier.

29. KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 3, p.329-347, set. 2008.
30. KROYER, G. Stevioside and Stevia-sweetener in food: application, stability and interaction with food ingredients. **Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit**, Basileia, v. 5, n. 2, p.225-229, 11 fev. 2010. Springer Science and Business Media LLC.
31. MAGALHÃES, D. A.; SILVA, F. M. da. **Desenvolvimento de mousse de tamarindo vegano a partir de base de mandioca e de extrato de amêndoas: caracterização microbiológica, físico-química e como carreador de probiótico**. Orientador: Eliana dos Santos Leandro. 2018. 48 p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Nutrição) - Departamento de Nutrição, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.
32. MARSHALL, R.T. et al. **Ice cream**. 3^a.ed. Nova York: Aspen Publishers, 2003. p. 357.
33. MARTINS, E. M. Furtado et al. Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. **Food Research International**, [s.l.], v. 51, n. 2, p.764-770, maio 2013. Elsevier BV.
34. MEDICI, M.; VINDEROLA, C.G.; PERDIGÓN, G. Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. **International Dairy Journal**, [s.l.], v. 14, n. 7, p.611-618, jul. 2004. Elsevier BV.
35. MENEZES, A. P. P. et al. *Tamarindus indica* L. A plant with multiple medicinal. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, São Paulo, v. 3, n. 5, p.50-54, abr. 2016.
36. MOHAMMADI, R. et al. Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. **Annals of Microbiology**, [s.l.], v. 61, n. 3, p.411-424, jan. 2011
37. MUSE, M.; HARTEL, R.W. Ice Cream Structural Elements that Affect Melting Rate and Hardness. **Journal of Dairy Science**, [s.l.], v. 87, n. 1, p.1-10, jan. 2004. American Dairy Science Association.
38. NARAIN, N. et al., Tecnologia do processamento do fruto. In: SILVA JÚNIOR, J. F.; LÉDO, A. S. A cultura da mangaba. Aracajú: **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 2006, cap. 17, p. 221-232.

39. ONG, L.; SHAH, N. Probiotic Cheddar cheese: Influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 42, n. 7, p.1260-1268, set. 2009. Elsevier BV.
40. PAPADIMITRIOU, K. et al. Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s.l.], v. 80, n. 3, p.837-890, jul. 2016. American Society for Microbiology.
41. POSSEMIERS, S. et al. Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 141, n. 1-2, p.97-103, jun. 2010. Elsevier BV.
42. PRADO, F. C. et al. Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**, [s.l.], v. 41, n. 2, p.111-123, jan. 2008. Elsevier BV.
43. PRATA, B. M. et al. Viabilidade de *Lactobacillus casei* em sorvete sem lactose e avaliação das características físico-químicas e sensoriais. **Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Inovação**, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 69-78, out. 2018.
44. PHUAPAIBOON, P. Immobilization of probiotic bacteria with banana flour and effect on quality of synbiotic ice cream and survival. **Carpathian journal of food science and technology**, Thailand, v. 8, n. 4, p. 33-46, 2016.
45. RAIZEL, R. et al. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência & Saúde**, Porto Alegre, v. 4, n. 2, p.66-74, dez. 2011.
46. ROSS, R.p. et al. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 98, n. 6, p.1410-1417, jun. 2005.
47. SANHUEZA, Enrique et al. Effect of pH in the survival of *Lactobacillus salivarius* strain UCO_979C wild type and the pH acid acclimated variant. **Electronic Journal Of Biotechnology**, Conceição, v. 18, n. 5, p.343-346, set. 2015.

48. SANTOS K. M. O. dos et al. *Lactobacillus rhamnosus* em bebida láctea caprina com suco de uva: sobrevivência a condições gastrintestinais simuladas in vitro. **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, Rio de Janeiro, p.1-6, dez. 2016.
49. SETYAWARDANI, T.; SUMARMONO, J.; WIDAYAKA, K. Effect of cold and frozen temperatures on artisanal goat cheese containing probiotic lactic acid bacteria isolates (*Lactobacillus plantarum* TW14 and *Lactobacillus rhamnosus* TW2). **March-2019**, Purwokert, v. 12, n. 3, p.409-417, mar. 2019. *Veterinary World*.
50. SINGH D.; WANGCHU, L.; MOOND, S. K. Processed products of tamarindo. **Natural Product Radiance**, Rajastão, v. 6, n. 4, p.315-321, maio 2007.
51. SOUKOULIS, C.; FISK, I. D.; BOHN, T. Ice Cream as a Vehicle for Incorporating Health-Promoting Ingredients: Conceptualization and Overview of Quality and Storage Stability. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, Si, v. 13, n. 4, p.627-655, jul. 2014.
52. SOUZA, J. C. B. et al., SORVETE: COMPOSIÇÃO, PROCESSAMENTO E VIABILIDADE DA ADIÇÃO DE PROBIÓTICO. **Alimentação e Nutrição**, Araraquara, v. 21, n. 1, p.155-165, mar. 2010.
53. SOUZA, B. G. et al. Viabilidade do *Lactobacillus casei* em sorvete caseiro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, [S.l.], v. 64, n. 370, p. 35-38, dez. 2013.
54. TERPOU, A. et al. Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. **Nutrients**, [s.l.], v. 11, n. 7, p.1591, jul. 2019.
55. TORTORA, G. J. et al. **Microbiologia**. 12^a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 962 p.