

**EFEITOS DA FORTIFICAÇÃO COM CÁLCIO
NA ESTRUTURA DE SORVETES**

FABIANO FREIRE COSTA

2008

FABIANO FREIRE COSTA

**EFEITOS DA FORTIFICAÇÃO COM CÁLCIO NA ESTRUTURA DE
SORVETES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências dos Alimentos para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Prof. Dr. Jaime Vilela de Resende

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Costa, Fabiano Freire.
Efeitos da fortificação com cálcio na estrutura de sorvetes.
/ Fabiano Freire Costa. – Lavras : UFLA, 2008.
57 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.
Orientador: Jaime Vilela de Resende.
Bibliografia.

1. Cloreto de cálcio. 2. Recristalização. 3. Gelo. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 637.4

FABIANO FREIRE COSTA

**EFEITOS DA FORTIFICAÇÃO COM CÁLCIO NA ESTRUTURA DE
SORVETES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 15 de dezembro de 2008

Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu UFLA

Prof. Dr. Vivaldo Silveira Júnior UNICAMP

Prof. Dr. Eduardo Alves UFLA

Profa. Dra. Mônica Elisabeth Torres Prado UFLA

Prof. Dr. Jaime Vilela de Resende
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

**Dedico à minha esposa,
Patrícia, e à minha querida
filha, Giovanna.**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciências dos Alimentos pela oportunidade de realizar o doutorado, pela acolhida e pelo apoio ao projeto.

À Universidade de Guelph, Ontário, Canadá, pelo apoio ao projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo custeio financeiro (bolsa).

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jaime Vilela de Resende, pelos ensinamentos, paciência, dedicação, amizade e honrosa orientação.

Ao Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu pelo apoio, incentivo, amizade e inúmeros ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Douglas H. Goff pelo financiamento do projeto.

Aos técnicos de laboratório, Creusa, Tina e Sandra, pela amizade e ajuda.

Ao amigo Jhonathan Aleong (Guelph, Ontário, Canadá), pela distinta amizade e ajuda aos experimentos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Definição.....	3
2.2 Cálcio.....	5
2.3 Caseínas no sorvete.....	7
2.4 Cristalização do gelo no sorvete.....	9
2.5 Emulsificantes no sorvete	12
2.6 Estabilizantes no sorvete.....	13
2.7 Medida da coalescência da gordura no sorvete.....	15
2.8 Microscopia.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Avaliação da microestrutura dos sorvetes.....	17
3.1.1 Preparo das amostras.....	17
3.1.2 Propriedades térmicas.....	18
3.1.3 Recristalização do gelo em sorvetes.....	19
3.1.4 Distribuição das proteínas.....	20
3.1.5 Distribuição do tamanho das partículas.....	21
3.1.6 Microscopia eletrônica de varredura	21
3.1.7 Microscopia eletrônica de transmissão.....	22
3.1.8 Difração de luz.....	22
3.2 Avaliação do tamanho das partículas.....	23
3.2.1 Preparo das amostras.....	23

3.2.2 Distribuição do tamanho das partículas.....	24
3.2.3 Análise estatística.....	25
4 RESULTADOS.....	26
4.1 Avaliação da microestrutura dos sorvetes.....	26
4.1.1 Propriedades do congelamento da mistura.....	26
4.1.2 Tamanho dos cristais de gelo em sorvetes.....	28
4.1.3 Distribuição das proteínas.....	29
4.1.4 Coalescência parcial das gorduras.....	31
4.1.5 Microestrutura dos sorvetes.....	32
4.1.6 Tamanho das micelas de caseína.....	40
4.2 Avaliação do tamanho das partículas.....	41
4.2.1 Efeito do emulsificante na coalescência parcial dos sorvetes.....	41
5 DISCUSSÃO.....	46
6 CONCLUSÃO.....	50
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

RESUMO

COSTA, Fabiano Freire. **Efeitos da fortificação com cálcio na estrutura de sorvetes**. 2008. 57p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, MG. *

Este trabalho objetivou estudar os efeitos da fortificação com cálcio pela adição de cloreto de cálcio nas propriedades físicas dos sorvetes adicionados ou não de κ -carragena. Quatro misturas para sorvetes de composições convencionais, adicionados ou não de κ -carragena (0 ou 0,025%) e cloreto de cálcio (0 ou 40 mM de Ca^{2+}), foram preparadas. Foi utilizado um calorímetro diferencial de varredura (MT-DSC) para investigar os efeitos da adição do cloreto de cálcio na temperatura de nucleação, entalpia de derretimento e na diminuição do ponto de congelamento. A composição protéica de soluções de leite reconstituído (15% m/m) adicionadas ou não de 40 mM de Ca^{2+} (cloreto de cálcio) no sobrenadante após a ultracentrifugação foi determinada. A distribuição e o tamanho das partículas de gordura foram determinados através da caracterização pela técnica de difração de luz. O tamanho dos cristais de gelo, antes e após o choque-térmico, foi determinado por microscópio fotônico acoplado ao *cold stage*. A microestrutura foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. Os resultados mostraram que a adição de cloreto de cálcio induz um aumento no tamanho dos cristais de gelo e também na coalescência das partículas de gordura, e estes valores foram ainda maiores para os sorvetes adicionados de κ -carragena. Esses resultados podem ser explicados pela interação dos íons Ca^{2+} e as micelas de caseína, fatores que não afetaram na diminuição do ponto de congelamento. Os íons cálcio induziram a uma compactação das micelas de caseína, diminuição da β -caseína na fase solúvel e alta desestabilização da gordura. Tais fatores causaram diminuição da estrutura macromolecular e do volume na fase não congelada, aumentando, dessa forma, os raios de recristalização do gelo.

* Comitê Orientador: Jaime Vilela de Resende – UFLA (Orientador); Luiz Ronaldo de Abreu – UFLA (Co-orientador)

ABSTRACT

COSTA, Fabiano Freire. **Effect of calcium fortification on ice cream structure.** 2008. 57p. Thesis (Doctorate in Food Science) – Federal University of Lavras, MG.*

The influence of calcium fortification by the addition of calcium chloride on quality parameters of ice cream based on physical properties was investigated, as was the effect of κ -carrageenan at modifying the effects of this calcium fortification. Four ice cream mixes of conventional composition, with varying κ -carrageenan (0 or 0.025%) and added calcium (0 or 40 mM of Ca^{2+}) were prepared. Modulated temperature-differential scanning calorimetry (MT-DSC) was used to investigate the effect of calcium chloride on the nucleation temperature, enthalpy of melting and freezing point depression. The protein composition of 15.4% (w/w) reconstituted skim milk powder (SMP) solutions with or without 40 mM of Ca^{2+} (calcium chloride) and in the supernatant after ultracentrifugation was determined. Fat particle size distributions in ice cream were characterized by light scattering. Ice crystal sizes before and after temperature-cycling were determined by cold-stage light microscopy. The structure of ice cream was investigated by scanning and transmission electron microscopy. The results demonstrated that the addition of calcium chloride led to a substantial increase in ice crystal sizes and in fat partial coalescence, which were exacerbated by the addition of κ -carrageenan. These results can be explained by the interaction between Ca^{2+} ions and casein micelles, rather than any effects on freezing point depression. The calcium ions lead to a more compact micelle, less serum β -casein and high fat destabilization, all of which would be expected to reduce macromolecular structure and volume occupancy in the unfrozen phase, which would lead to increase rates of ice recrystallization.

* Guidance Committee: Jaime Vilela de Resende – UFLA (adviser); Luiz Ronaldo de Abreu – UFLA (Co-adviser).

1 INTRODUÇÃO

O sorvete pode ser considerado como um sistema coloidal complexo constituído de bolhas de ar, cristais de gelo, glóbulos de gordura e uma fase não congelada. O tamanho médio das bolhas de ar e dos cristais de gelo é geralmente de 20 a 50 μm de diâmetro enquanto que os glóbulos de gordura variam de 0,1 a 1 μm . Na fase não-congelada, são encontradas micelas de caseína suspensas em uma solução contendo açúcares, proteínas micelares e não micelares, carboidratos estabilizantes, emulsificantes e minerais (Goff, 1997).

A desestabilização como, por exemplo, a coalescência excessiva dos glóbulos de gordura nos sistemas lácteos tais como sorvetes, pode ocasionar problemas estruturais e de qualidade como o crescimento indesejável dos cristais de gelo denominado de arenosidade. A coalescência em sorvetes possui valores ótimos e está diretamente relacionada aos ingredientes previamente adicionados.

A adição de minerais e vitaminas nos alimentos é praticada pelas indústrias alimentícias no intuito de chamar a atenção do consumidor e, dessa forma, agregar valor aos produtos enriquecidos e/ou fortificados. O cálcio é um mineral indispensável à alimentação humana principalmente devido ao fato de que existe uma relação de sua baixa ingestão a doenças como osteoporose.

A adição de cálcio no sorvete é interessante porque, além de aumentar o valor nutricional do produto, pode ser usado para chamar a atenção do consumidor, desmistificando a idéia de que o sorvete não passa de mais uma guloseima que deve ser consumida apenas em dias quentes. Entretanto, estudos devem ser conduzidos no intuito de se conhecer os possíveis mecanismos e interações existentes entre os componentes presentes nos sistemas e as novas substâncias adicionadas, com a finalidade de se avaliar a possibilidade ou não de adição.

No intuito de se conhecer e avaliar a possibilidade de fortificação do sorvete com cálcio através da adição de cloreto de cálcio, este trabalho objetivou estudar os efeitos ocasionados pela adição deste mineral nas propriedades físicas, estruturais e de qualidade dos sorvetes fortificados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Definição

Segundo Portaria nº 379, de 26 de abril de 1999, são definidos como gelados comestíveis os produtos alimentícios obtidos a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas, com ou sem adição de outros ingredientes e substâncias, ou de uma mistura de água, açúcares e outros ingredientes ou substâncias que tenham sido submetidas ao congelamento, em condições tais que garantam a conservação do produto no estado congelado ou parcialmente congelado, durante a armazenagem, o transporte e a entrega ao consumo. Os gelados comestíveis, segundo Brasil (1999), são classificados em:

- sorvetes de creme, que são os produtos elaborados basicamente com leite e ou derivados lácteos e ou gorduras comestíveis, podendo ser adicionado de outros ingredientes alimentares;

- sorvetes de leite, que são os produtos elaborados basicamente com leite e ou derivados lácteos, podendo ser adicionados de outros ingredientes alimentares;

- sorvetes, que são os produtos elaborados basicamente com leite e ou derivados lácteos e ou outras matérias-primas alimentares e nos quais os teores de gordura e ou proteína são total ou parcialmente de origem não láctea, podendo ser adicionados de outros ingredientes alimentares;

- *sherbets*, que são produtos elaborados basicamente com leite e ou derivados lácteos e ou outras matérias primas alimentares e que contêm apenas uma pequena proporção de gorduras e proteínas, as quais podem ser, total ou parcialmente, de origem não láctea, podendo ser adicionados de outros ingredientes alimentares;

- gelados de frutas, ou *sorbets*, que são os produtos elaborados basicamente com polpas, sucos ou pedaços de frutas e açúcares, podendo ou não ser adicionados de outros ingredientes alimentares;

- gelados, que são produtos elaborados basicamente com pedaços de frutas e outras matérias-primas, podendo ou não ser adicionados de outros ingredientes alimentares.

O sorvete pode ser considerado um sistema complexo de partículas coloidais constituído de glóbulos de gordura, bolhas de ar e cristais de gelo dispersos numa fase não congelada (Goff, 1997). As bolhas de ar e os cristais de gelo possuem diâmetro variando de 20 a 50 μm (Caldwell et al., 1992a). A fase não-congelada do sorvete é constituída de micelas de caseína suspensas em uma solução congelada e concentrada de açúcar, sais, proteínas solúveis do leite e polissacarídeos de alto peso molecular.

Durante o processo de preparo da mistura para sorvete, sob a ajuda de emulsificantes, os glóbulos de gordura e as proteínas do leite são adsorvidos uns aos outros, formando uma emulsão coloidal. No processo de congelamento do sorvete durante a batida da mistura, uma parte dos glóbulos de gordura, que não se adsorveram nas proteínas do leite, se cristaliza formando uma estrutura de aparência sólida (Goff, 1997). Outra parte desses glóbulos de gordura aglomera-se formando o fenômeno chamado de coalescência dos glóbulos de gordura. Esse fenômeno é comum e observado regularmente em sorvetes, porém o excesso de formação e o tamanho das partículas aglomeradas de glóbulos de gordura podem desencadear problemas estruturais como, por exemplo, o crescimento excessivo dos cristais de gelo (tamanho superior a 50 μm de diâmetro) que confere ao sorvete a textura arenosa após a fabricação e, principalmente, durante a estocagem (Costa et al., 2008).

2.2 Cálcio

O cálcio é um mineral essencial ao organismo humano. Além de ser responsável pelo crescimento ósseo, o cálcio também age como regulador do metabolismo celular. A quantidade ideal de cálcio a ser ingerida por dia está entre 1000 a 1300 mg e este valor depende da idade e do sexo do indivíduo. A maioria destes grupos de indivíduos não encontra essa quantidade ideal de cálcio a ser consumida diariamente, especialmente, se neste grupo estiverem incluídas mulheres jovens as quais devem ter seu organismo abastecido de cálcio para compensar perdas durante gravidez e velhice (United States Department of Agriculture, 2005).

No leite, a quantidade de cálcio é de aproximadamente 1200 mgL^{-1} (Fox & McSweeney, 1998), constituindo-se de uma boa fonte de cálcio que, no leite também é altamente biodisponível ($\sim 30\%$) em comparação às plantas ricas com este mineral as quais possuem fitatos que são capazes de complexar com o cálcio, diminuindo consideravelmente sua biodisponibilidade ao organismo (Weaver & Heaney, 2006). Um estudo recente mostrou que a biodisponibilidade do cálcio no leite também é dependente da quantidade de gordura presente no meio. Em níveis elevados, as gorduras podem insolubilizar íons cálcio e também diminuir sua biodisponibilidade (Weaver, 1998).

A conexão natural que as pessoas fazem com o cálcio encontrado nos produtos lácteos faz dele um chamativo para a indústria alimentícia e, principalmente, da interrelação existente graças à grande quantidade de propagandas, reforçando que a sua falta na alimentação ocasiona doenças como osteoporose. Esses fatores, associados à consciência atual do ser humano que deve consumir alimento saudável cujo resultado traz benefício à saúde, têm feito as indústrias alimentícias pensarem em desenvolver produtos fortificados e/ou enriquecidos com esse mineral (Costa et al., 2008). Diversos alimentos enriquecidos e/ou fortificados já podem ser encontrados nas gôndolas dos

supermercados. A estabilidade e a qualidade desse alimento bem como a sua biodisponibilidade, entretanto, é bastante questionável pela comunidade científica. De acordo com levantamento bibliográfico feito por Weaver (1998), diversos trabalhos têm revelado que a adição de cálcio em forma iônica é extremamente danosa à estrutura e qualidade dos alimentos, e sua biodisponibilidade ao organismo ainda não é conhecida.

Diferentes tipos de sais de cálcio solúveis ou insolúveis podem ser encontrados no mercado para fortificação, e as vantagens e desvantagens desses sais são discutidas por Augustin & Willians (2002). Sais insolúveis precisam ser suspensos em solução de modo a não afetar a textura dos produtos com eles adicionados. Geralmente, a adição de sais solúveis no leite ocasiona um aumento do cálcio na fase coloidal, aumentando a agregação micelar, diminuindo o pH e a estabilidade térmica (Vyas & Tong, 2004; Willian et al., 2005; Singh et al., 2007). Com a adição de cálcio, mudanças na força iônica e liberação de íons H^+ também induzem à diminuição do pH (Willian et al., 2005).

Carbonato de cálcio, cloreto de cálcio, fosfato de cálcio, fosfato tribásico de cálcio, citrato maleato de cálcio, lactato de cálcio, gluconato de cálcio, lactato gluconato de cálcio e o cálcio natural encontrado em leite, são as formas mais comuns comercializadas atualmente. Desses sais, apenas o cloreto de cálcio, gluconato de cálcio e o lactato de cálcio são os que apresentam os menores danos sensoriais em alimentos e também os mais ionizáveis. Entretanto existe uma controvérsia entre a biodisponibilidade de tais sais. De acordo com a revisão bibliográfica apresentado por Singh et al., (2007) alguns autores apresentaram estudos esclarecendo que sais inorgânicos são mais biodisponíveis que sais orgânicos ao passo que outros autores são contrários a isso, apresentando resultados opostos. O mesmo autor estudou a biodisponibilidade do cálcio originário dos sais de gluconato, lactato e cloreto e observou que existe uma diferença na biodisponibilidade quando adicionados ao leite e ministrados a

camundongos. Foi observado neste estudo que os sais orgânicos apresentaram uma melhor absorção em relação ao inorgânico. Porém, o sal que apresentou melhor relação custo/benefício para a indústria fortificar ou suplementar o alimento foi o cloreto de cálcio.

Sobre o cálcio no leite, aproximadamente 1/3 é solúvel e 2/3 estão associados às micelas de caseína, um ou outro como fosfato de cálcio coloidal (aproximadamente 1/2 do cálcio total do leite) ou como íons cálcio ligados a resíduos de seril-fosfato (aproximadamente 1/6 do cálcio total). O cálcio micelar está diretamente ligado à estrutura e à estabilidade das micelas de caseína (De Kruif & Holt, 2003, Little & Holt, 2004). Do cálcio solúvel, aproximadamente 10% do cálcio total do leite são ionizados e a maioria ocorre como citrato de cálcio. Existem importantes equilíbrios entre cálcio iônico, solúvel e micelar. Esses equilíbrios entre os tipos de cálcio e outros minerais sob condições de pH ou força iônica podem mudar (Agboola & Dalgleish, 1996; Antipova et al., 2002; Little & Holt, 2004). A redistribuição desses sais também pode interferir na redistribuição das proteínas micelares e não-micelares presentes no leite (Tsioulpas et al., 2007).

Costa et al. (2008) estudou a adição de cloreto de cálcio em sorvetes no intuito de enriquecer o produto. Os resultados mostraram que a adição de cloreto de cálcio a alimentos lácteos, como no exemplo do sorvete, é extremamente danosa. Os íons cálcio possuem a capacidade de interação com proteínas, carboidratos e lipídeos nos produtos adicionados com aquele mineral, danificando de forma irreversível a estrutura e a qualidade final do alimento.

2.3 Caseínas

As caseínas representam cerca de 80% das proteínas totais do leite. Elas são constituídas pela α_{s1} , α_{s2} , β e κ -caseína, e formam uma estrutura supramolecular conhecida como micelas, cuja estrutura é estudada

extensivamente nos últimos tempos (Dalglish & Morris, 1988). As micelas de caseína variam de 50-300 nm de diâmetro e são estabilizadas pelos *microclusters* de fosfato de cálcio. Em solução, os *microclusters* podem se comportar de modo a liberar ou absorver os íons cálcio. Esse equilíbrio existente entre os íons cálcio em solução e o cálcio presente nos *microclusters* é variável e dependente da concentração, pH e temperatura (Horne, 2002). As β -caseínas representam cerca de 30% das caseínas totais sendo uma das mais solúveis e com propriedades surfactantes (Dauphas et al., 2008), e também possuem natureza anfipática devido aos grupamentos hidrofílicos (N-terminal) e hidrofóbicos (C-terminal), permitindo sua organização em micelas, induzindo a atração ou repulsão em solução.

O equilíbrio entre a forma molecular e a forma agregada da β -caseína é altamente influenciada pela concentração, temperatura e presença de íons cálcio. Em concentrações críticas, as β -caseínas interagem entre si, via grupamentos hidrofóbicos. Tal interação permite a formação de micelas com centros hidrofóbicos e uma camada externa menos densa com propriedades hidrofílicas (De Kruif et al., 2002; O'Connell et al., 2003). O número de micelas e seus tamanhos dependem da temperatura, devido ao aumento nas interações hidrofóbicas. O tamanho das micelas são também dependentes do pH e da força iônica, os quais modificam as cargas da proteína e a repulsão eletrostática (Dickinson et al., 2001). A estabilidade de uma solução micelar é consequência das repulsões eletrostáticas existentes entre a camada externa hidrofílica das micelas (McClements). Adicionando íons cálcio, ocorre uma indução na formação das micelas através da associação com os grupamentos de serinas fosfatadas localizados na parte hidrofóbica das caseínas (Rollema, 1992).

As micelas de caseína e os caseinatos são comumente utilizados como agentes emulsificantes, em sorvetes, devido às suas excelentes propriedades interfaciais. Emulsões estabilizadas pelas caseínas são sensíveis aos íons cálcio e

floculam com adição de concentrações limites (Agboola & Dalgleish, 1995). Nas emulsões estabilizadas por caseinato de sódio, Dickinson et al. (2001) mostraram que a α_{s1} e a β -caseína possuem alta afinidade por íons cálcio. No entanto a α_{s1} -caseína apresentou-se mais sensível à adição de íons cálcio em relação a β -caseína. Diversos estudos (Dickinson et al., 2001; Agboola et al., 1996; Antipova et al., 2002; Ye & Singh et al., 2001) têm sido conduzidos no intuito de entender os mecanismos e interações existentes entre os íons cálcio em emulsões estabilizadas por caseinatos. Os caseinatos não adsorvidos formam partículas e em solução, eles são capazes de diminuir a floculação nas emulsões. A floculação diminui com a concentração do material e diminuição da concentração de íons cálcio, o que induz à agregação dos caseinatos, formando em solução partículas maiores em menor quantidade. Em altas concentrações de íons cálcio ocorrem reduções nas repulsões eletrostáticas entre as gotas de proteína, apresentando aglomerados moleculares, ou seja, elas estariam se ligando com íons cálcio.

2.4 Cristalização do gelo no sorvete

De acordo com Garsid (1987), o processo de cristalização, inicialmente ocorre, com a formação de pequenos agregados cristalinos estáveis denominados núcleos ou embriões, em uma solução supersaturada submetida a uma taxa de resfriamento cujo processo se divide em nucleação primária e nucleação secundária.

Na nucleação primária, um número de partículas é gerado em regiões de elevada supersaturação em superfícies de resfriamento e nas zonas de ebulição. Na nucleação primária, o surgimento de novas partículas ocorre sem a influência de qualquer interferente, como a presença de sólidos diversos, a parede do equipamento ou partículas diminutas de qualquer natureza. A nucleação primária é resultado de oscilações locais de dimensões em uma fase homogênea, e o seu

acontecimento está baseado na união de moléculas ou partículas formando aglomerados. Na nucleação secundária, a presença de um cristal na solução supersaturada induz à formação de mais cristais que não se formariam espontaneamente. A taxa de nucleação de produtos alimentícios depende da supersaturação, da temperatura, da energia oriunda do processo de agitação e do nível de impurezas ou aditivos presentes na formulação do alimento. Para o crescimento dos cristais a partir de uma solução, ocorre primeiro o transporte do soluto da solução supersaturada para a vizinhança da superfície do cristal. Logo após, desenvolvem-se alguns processos na superfície do cristal, provavelmente envolvendo a adsorção na camada superficial, seguidos pela orientação de moléculas ao cristal e, finalmente, a dissipação de calor de cristalização liberada na superfície do cristal (Garsid, 1987).

Segundo Guegov (1981), na cristalização, condições favoráveis são alcançadas para agregação em um arranjo ordenado de um grupo de moléculas, formando partículas chamadas núcleos de cristalização. Tais condições são determinadas pela correlação entre temperatura, velocidade de resfriamento, concentração dos solutos e magnitude das forças, orientando as moléculas no líquido. Dois tipos de cristalização primária podem ocorrer: a homogênea e a heterogênea (catalítica).

Os centros de cristalização homogêneos são formados durante uma agregação aleatória de moléculas de água em estruturas de gelo acima de um tamanho crítico. A nucleação homogênea é aquele processo no qual agregados de moléculas surgem espontaneamente por flutuações de densidades aleatórias. Em termos termodinâmicos, o ponto de equilíbrio do congelamento ($T_e = 273,16\text{K}$) indica a temperatura em que as energias livres de Gibbs (potencial químico) das fases líquidas e sólidas (gelo) são as mesmas. A formação de um núcleo leva a um desequilíbrio: energia superficial positiva e energia livre de volume negativa. A soma desses dois componentes e as contribuições relativas

delas à energia livre global com o aumento do raio é a razão para a existência de um tamanho de núcleo crítico a uma temperatura (Guegov, 1981).

A nucleação heterogênea ocorre quando partículas sólidas atuam como sítios para a formação do cristal. A presença de uma superfície ativa de uma partícula dentro do sistema introduz uma região de energia livre superficial que aumenta a probabilidade de formação de um agregado de dimensões críticas. Normalmente, tais partículas são substâncias que são insolúveis em água, e tamanho, localização e características moleculares determinam o caráter de formação do gelo, visto que o número de moléculas de água que necessitam de ordenação inicial é mais baixo, e a temperatura de nucleação é mais alta que aquela da nucleação homogênea.

A cristalização, de acordo com McCabe et al. (1993), é um processo de formação de partículas sólidas dentro de uma fase homogênea que pode ocorrer a partir do vapor de um líquido em fusão ou de uma solução, cujo processo pode ser caracterizado pela formação de um espectro de partículas cristalinas de diferentes tamanhos. Segundo Aguilera & Stanley (1990), a estrutura dos sólidos pode variar das formas simples (amorfas) às mais complexas (cristalinos). A diferença entre um sólido cristalino e um sólido amorfo está nas condições geométricas dadas pelas ligações e ao acondicionamento dos átomos e moléculas, formando o retículo cristalino.

A fase amorfa presente no sorvete é, basicamente, formada por uma solução supersaturada composta de açúcares, proteínas e minerais. Flint (1966) descreve que o sólido amorfo não possui forma geométrica natural e sua estrutura interna é irregular como as partículas distribuídas nos líquidos. Os sólidos amorfos são considerados como líquidos sobrefundidos e se caracterizam, principalmente pela falta de temperatura nítida de fusão e pela invariabilidade das propriedades com a mudança de direção (isotropia).

A fase cristalina presente em sorvete é composta por cristais de gelo formados a partir da separação da água pura da solução supersaturada que compõe o sorvete. Segundo McCabe et al. (1993), o cristal é o tipo de matéria inanimado mais organizado e constitui o estado mais estável, possuindo menor energia livre. Os sólidos cristalinos se classificam em cinco tipos principais: os metais, formados de átomos de elementos eletropositivos; os cristais iônicos, formados por combinações dos elementos altamente eletropositivos e eletronegativos; os cristais de valência, estabilizados pelos pares de elétrons compartilhados das ligações interatômica; os semicondutores e os cristais moleculares, como o gelo.

Jancic & Grootsholten (1984) enfatizam que, para ocorrer uma mudança de estado, deve ser fornecida energia suficiente para romper a barreira desse estado, e uma subsequente mudança para um estado de energia mais baixo deve acontecer. Na etapa de cristalização, a barreira de energia a ser vencida é a necessária à nucleação, e o estado de energia mais baixo é alcançado com o crescimento dos cristais.

2.5 Emulsificantes no sorvete

Os emulsificantes são ingredientes comumente usados em sorvetes no intuito de minimizar danos estruturais que ocorrem durante processamento e estocagem e com a finalidade de facilitar a adsorção entre os glóbulos de gordura e proteínas do leite, conferindo ao produto uma textura suave que agrada o paladar do consumidor (Goff, 1992). Os emulsificantes podem ser divididos em dois grupos: os monos e diglicerídeos e os ésteres de sorbato. Os mono e diglicerídeos são derivados da reesterificação de gorduras animais hidrolisada ou ácidos graxos extraídos de vegetais. A diferença entre os ésteres de sorbato e os monoglicerídeos está na estrutura química. Os ésteres de sorbato possuem ácidos graxos esterificados com moléculas de sorbitol enquanto os

monoglicérides possuem ácidos graxos esterificados com moléculas de glicerol. Para que os ésteres de sorbato sejam hidrofílicos durante sua produção, grupamentos polioxietilenos são adicionados à estrutura carbônica. Desses ésteres de sorbato, o polisorbato 80 (monooleato polioxietileno de sorbato) é o mais comum emulsificante usado em sorvetes. Com a finalidade de melhorar a ação dos emulsificantes, diversas indústrias alimentícias utilizam misturas de mono e diglicérides com o polisorbato 80 (Marshall et al., 2003). Em geral, os emulsificantes usados em sorvetes são constituídos basicamente de 80% de mono e diglicérides e 20% de polissorbato 80.

2.6 Estabilizantes no sorvete

Os estabilizantes polissacarídeos são substâncias hidrofílicas que dispersam em solução como colóides. A maioria desses produtos é classificada como gomas ou hidrocolóides, os quais podem ser definidos como qualquer polissacarídeo solúvel em água, extraído de vegetais terrestres, marinhos ou de microrganismos ou, ainda, alguns podem sofrer modificações químicas para alcançar as características desejadas. Eles são amplamente utilizados em função de suas características textuométricas, estruturais e funcionais, proporcionando estabilidade a emulsões, suspensões e espumas, e pelas suas propriedades espessantes em geral (Fennema, 1993).

Em solução, os estabilizantes aumentam a viscosidade e formam géis, motivado pela sua capacidade de retenção de grande quantidade de água (água livre) e resultante da atividade mútua desses compostos que formam ligações de hidrogênio entre si. A capacidade de retenção da água livre presente nos sorvetes faz desse produto um indispensável ingrediente para sorvetes por diminuir a quantidade de água que cristalizará durante o congelamento e por aumentar a viscosidade, evitando que os cristais de gelo se fundem e causem o defeito de arenosidade (Fennema, 1991).

As carragenas, incluídas como estabilizantes para sorvetes (Marshall et al., 2003), são polissacarídeos de cadeia longa com alto peso molecular (variando de 100.000 a 1.000.000 Daltons). Elas são extraídas de algas vermelhas encontradas na região do Mar Mediterrâneo, cuja cadeia de polissacarídeo é formada pela ligação D-galactose 3,6-anidro-D-galactose. Elas se apresentam em três formas mais conhecidas; kappa (κ), lambda(λ) e iota (ι) carragena. O que as diferencia é a presença de grupamentos sulfatados na estrutura molecular. A kappa carragena possui apenas um grupamento sulfato para cada dissacarídeo, a lambda possui dois e a iota três. Devido à natureza iônica desses biopolímeros, em solução são carregados negativamente o que explica a capacidade de ligação com metais monovalentes, como o potássio ou bivalentes como o cálcio (Hossain et al, 2001).

A κ -carragena forma gel em presença de cátions e esta capacidade de gelificação e suas propriedades físico-químicas dependem da quantidade e da disponibilidade dos íons metálicos envolvidos. Quando um polieletrólito (como a carragena) é combinado com um íon mono ou polivalente de carga oposta, pode formar um hidrogel denominado ionotrópico. Os hidrogéis ionotrópicos podem degradar, desintegrar ou dissolver, gradualmente, graças às ligações de hidrogênio, forças iônicas e moleculares envolvidas nas interações entre os grupamentos negativos presentes na estrutura molecular dos polissacarídeos com os metais (Prestwich et al, 1998).

A principal função da κ -carragena é limitar a separação de fases entre demais polissacarídeos adicionados ao sorvete e às proteínas do leite. Todas as interações descritas acima são reversíveis e podem ser mudadas com alterações na natureza física das moléculas (diferentes qualidades das ligações envolvidas) por meio de variações na temperatura, pH, aplicação de forças externas ou adição de solutos que possam competir com as ligações envolvidas (Langendorff et al., 2000; Schorsch et al., 2000; Spagnuolo et al., 2005; Vega et al., 2005).

2.7 Medida da Coalescência da gordura no sorvete

Muitas informações obtidas pelas interações entre os glóbulos de gordura no sorvete são baseadas na medida da coalescência das partículas coloidais presentes em amostras derretidas. Equipamentos que medem dispersão, distribuição e o tamanho das partículas coloidais presentes em emulsões como sorvetes são comumente utilizados, e os parâmetros obtidos indicam a existência de coalescência pelo tamanho e distribuição dos glóbulos de gordura (Goff et al., 1999).

Existem vários caminhos para descrever o tamanho e a distribuição das partículas em uma emulsão. O primeiro passo é considerar que elas possuem um formato esférico para facilitar as aproximações das medidas que são baseadas nos diâmetros das partículas. As médias do tamanho dos glóbulos de gordura são obtidas como diâmetro médio de De Brouckere ($d_{[4,3]} = \Sigma n_i d_i^4 / \Sigma n_i d_i^3$) ou diâmetro médio de Sauter ($d_{[3,2]} = \Sigma n_i d_i^3 / \Sigma n_i d_i^2$, em que n_i é o número de glóbulos de gordura com diâmetro d_i). Os equipamentos que se baseiam na técnica de difração do laser fornecem os valores médios dos diâmetros e sua distribuição pelo tamanho, bem como a área específica de contato entre as partículas. Os valores $d_{[4,3]}$ e $d_{[3,2]}$ representam o centro de gravidade da distribuição da massa ou do volume dos agregados moleculares. A maioria dos equipamentos utilizam como referência a medida do volume representando por $d_{[4,3]}$ (Bolliger et al., 2000).

2.8 Microscopia

Goff et al. (1989), Hartel (1996), Berger (1997) e Goff (1997) recomendam a microscopia como técnica de fundamental relevância para a realização de análises qualitativa e quantitativa em amostras de sorvetes com o objetivo de visualizar e analisar o tamanho e a distribuição dos cristais de gelo e de demais partículas do sorvete.

De acordo com Caillet et al. (2003), atualmente, existem diversas técnicas microscópicas usadas para caracterizar a estrutura do sorvete. Os principais métodos microscópicos usados pelos laboratórios de controle de qualidade das indústrias e dos centros de pesquisas são os métodos destrutivos, indiretos e diretos.

O método destrutivo é baseado na observação ótica da fase dispersa da amostra (cristais de gelo e bolhas de ar) misturada e dissolvida em meio adequado. As vantagens dessa técnica estão no curto tempo de análise do experimento, sendo as informações coletadas diretamente da amostra. A desvantagem é que, com a dissolução da amostra, não é possível saber o volume e a posição das diferentes fases obtidas. Além disso, como a amostra é totalmente derretida ou destruída, as imagens obtidas podem não representar toda a morfologia e textura do congelamento (Caillet et al., 2003).

O método indireto utiliza técnicas de microscopia eletrônica, fornecendo imagens da estrutura das amostras de sorvete parcialmente destruídas pela criosubstituição, criofixação e congelamento. As vantagens dessa técnica estão na alta resolução do equipamento que pode observar detalhes da fina estrutura das amostras de sorvete. A desvantagem é que a microscopia eletrônica é muito cara e a preparação da amostra é longa (Caillet et al., 2003).

O método direto, mais utilizado pelos laboratórios industriais, caracteriza a estrutura de alimentos congelados, e utiliza a microscopia fotônica com dispositivo coaxial iluminado, preservando melhor a textura original da amostra congelada. Esse dispositivo é baseado na reflexão direta da luz na face da amostra de sorvete. Em comparação com a microscopia eletrônica, a desvantagem é a baixa resolução (Caillet et al., 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Avaliação da microestrutura dos sorvetes em função da presença ou ausência de κ -carragena e cloreto de cálcio

3.1.1 Preparo das amostras

Foram preparadas misturas básicas para sorvete contendo 10% gordura (manteiga doce, 80% gordura, Gay Lea Foods, Guelph, Ontário, Canadá), 11% sólidos não gordurosos (leite em pó instantâneo, 97% de sólidos, Gay Lea Foods, Guelph, Ontário, Canadá), 12% de sacarose (Redpath Sugar, Toronto, Ontário, Canadá), 4% de xarope de milho (42DE, Casco Inc., Toronto, Ontário, Canadá), 0,15% de Polmo (80% de mono e diglicerídeos e 20% de polissorbato 80; Danisco, Aarhus, Dinamarca) adicionadas ou não de 0,025% de κ -carragena (Danisco, Canadá, Inc.) e 4,4 gL⁻¹ cloreto de cálcio (Fisher Scientific, Toronto, Canadá) equivalente a 40 mM Ca²⁺ ou 1600 mg de Ca²⁺ L⁻¹ se totalmente dissociado (Figura 1). As misturas foram pasteurizadas (74°C/15 minutos), homogeneizadas (primeiro estágio a 17,5 MPa e segundo estágio a 3,5 MPa; APV Gaulin, Everett, MA), batidas à -5°C (Taylor Batch Freezer, model B733-32; Tekni-Craft, Rockton, IL) e armazenadas à -35°C. Todas as amostras foram preparadas em triplicatas.

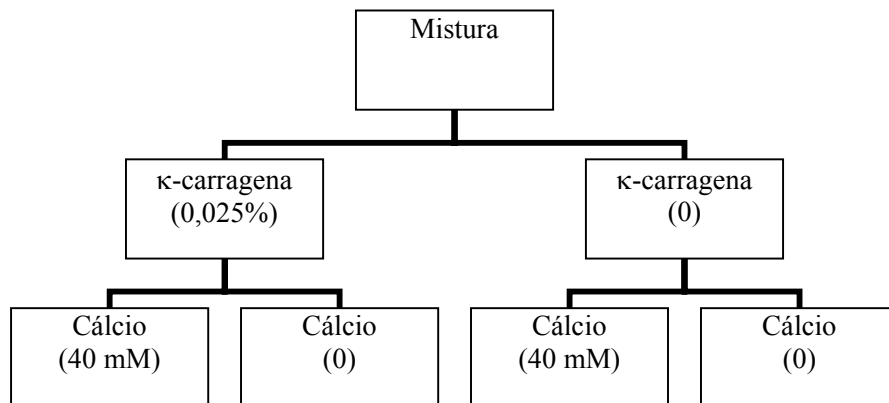


FIGURA 1. Fluxograma das etapas de preparação dos diferentes tratamentos do sorvete.

3.1.2 Propriedades térmicas

Foi utilizado um calorímetro diferencial de varredura (Q1000, TA Instruments, New Castle, DE) para os estudos das propriedades térmicas das misturas básicas para sorvetes adicionadas ou não de κ -carragena e cloreto de cálcio. A calibração (T_{zero}) foi realizada com safira; a calibração do fluxo de aquecimento foi com gálio; a temperatura de calibração foi realizada com gálio e índio; e a calibração da capacidade calorífica foi realizada com safira. O gás utilizado foi o nitrogênio (300 mL min^{-1}). Somente uma modulação de temperatura foi utilizada em todos os experimentos (amplitude $\pm 0,318^\circ\text{C}/60\text{s}$). A quantidade de amostras foi de 20 mg colocadas em recipientes hermeticamente fechados (TA Instruments). As amostras da mistura para sorvetes foram equilibradas para uma temperatura de 20°C e congeladas ($2^\circ\text{C}/\text{min}$) à temperatura de $-30^\circ\text{C}/5 \text{ min}$ e, então, novamente aquecidas de -30°C para 15°C ($2^\circ\text{C}/\text{min}$).

3.1.3 Recristalização do gelo em sorvetes

Para os experimentos com simulação das variações de temperatura, 3 recipientes de cada tratamento foram transferidos da armazenagem (-35°C) para um freezer (-20°C), programado para simular variações de temperatura em que as amostras eram mantidas à temperatura de -20°C/12 horas, aquecidas a -10°C/12 horas, resfriadas para -20°C/12 horas e novamente aquecidas para -10°C/12 horas (totalizando um ciclo de variação de temperatura em 48 horas). Esse ciclo de aquecimento/resfriamento (48 horas) foi repetido 10 vezes em todas as amostras (Regand & Goff, 2006). Para a captura e análise das imagens por microscopia fotônica, foram utilizadas amostras de sorvete armazenadas (-35°C) e submetidas ao ciclo de temperatura. As amostras de cada tratamento foram coletadas (cubos de aproximadamente 1cm³) e espalhadas em lâminas para microscopia (-20°C). Após espelhamento das amostras nas lâminas, gotas de iso-amil-butanol (previamente resfriado a -20°C) foram usadas para dispersar os cristais de gelo presentes nas amostras dos sorvetes. As lâminas foram cobertas com laminulas, colocadas dentro de um recipiente contendo nitrogênio líquido e, assim, encaminhadas ao *cold stage* (Linkam Instruments, Surrey, UK) com temperatura de -17°C (Regand & Goff, 2006). As imagens dos cristais de gelo dispersos nas lâminas em cada tratamento foram obtidas com o auxílio de um microscópio fotônico (Olympus BH, Tóquio, Japão). Diferentes campos em cada lâmina foram micrografadas para obtenção de 300 cristais por amostra. As medidas dos cristais de gelo foram realizadas usando um software de domínio público (NIH Image Program Object Image 2.10) instalado em um computador (Macintosh). Os dados foram tabulados em planilhas eletrônicas (Microsoft Excell 2000) para posterior análise estatística do diâmetro equivalente dos cristais de gelo. A distribuição do tamanho dos cristais de gelo foi caracterizada de acordo com o modelo apresentado por Flores & Goff (1999). Nesse tratamento estatístico, o tamanho dos diâmetros dos 300 cristais de gelo era

distribuído numa curva de frequência em que foi obtido o valor da mediana (X_{50}).

3.1.4 Distribuição das proteínas

A composição protéica de uma solução aquosa contendo 15,4% (m/m) de leite em pó desnatado, adicionado ou não de cloreto de cálcio ($4,4 \text{ g L}^{-1}$), foi determinada após ultracentrifugação ($40.000 \times g$) a 20°C por 60 min usando um Beckman L8-M ultracentrífuga com um T-47 rotor (Beckman, Fullerton, CA, USA). Com a separação do precipitado e análise do sobrenadante foi determinada a composição através da técnica de eletroforese capilar (Zhang & Goff, 2004). A solução tampão (pH = 3,0) usada para separar as proteínas presentes na solução era constituída de 6,0 M de ácido cítrico e 0,05% (m/v) de hidroxipropilmetil celulose. A solução tampão (pH = 7,5) usada para dissolver as amostras de proteínas era constituída de 7,0 M de urea e 20 mM de bis-tris-propano. Imediatamente depois do uso, 2-mercaptoetanol ($5 \mu\text{L}:1 \mu\text{L}$ de tampão) foi adicionado à solução tampão das amostras. As amostras das soluções protéicas foram diluídas 1:4 com a solução tampão das amostras e deixadas descansar por 1 hora antes da injeção no equipamento que foi utilizado para o carreamento das amostras foi um Beckman P/ACE System 5510 controlado por Golden Software, Beckman Instruments Inc., San Ramon, CA, USA. A separação das proteínas (placas de álcool polivinílico, eCAP N-CHO, cat. n.º. 477601, Beckman-Couter, San Ramon, CA; $47 \text{ cm} \times 50 \text{ mm id.}$, $10 \times 800 \mu\text{m}$) foi à temperatura de 40°C com voltagem de 26 kV e corrente de $48 \mu\text{A}$. A polaridade para a eletroforese capilar foi a entrada no pólo positivo e a detecção ocorreu com absorção das amostras na região do UV (208 nm).

3.1.5 Distribuição do tamanho das partículas

Partículas coloidais presentes nas gotas de sorvete derretido dos diferentes tratamentos foram caracterizadas de acordo com a distribuição, tamanhos e área superficial de contato através da técnica de difração de luz estática, utilizando-se o equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Malvern, UK). A razão entre índice de refração dos glóbulos de gordura (1,456) e o índice de refração da fase contínua (1,330) foi de 1,095. As médias do tamanho dos glóbulos de gordura foram obtidas como diâmetro médio de De Brouckere ($d_{[4,3]} = \Sigma n_i d_i^4 / \Sigma n_i d_i^3$) ou diâmetro médio de Sauter ($d_{[3,2]} = \Sigma n_i d_i^3 / \Sigma n_i d_i^2$, onde n_i é o número de glóbulos de gordura com diâmetro d_i). Valores para área específica de contato, $m^2 g^{-1}$ foram também medidos (Bolliger et al., 2000).

3.1.6 Microscopia eletrônica de varredura

Com a ajuda de uma espátula, foram retiradas pequenas quantidades (aproximadamente 100 mm^3) das amostras de sorvetes de cada tratamento (armazenadas à -35°C) e transferidas para um recipiente contendo nitrogênio líquido (-196°C). Após imersão em N_2 , as amostras foram fragmentadas (em pedaços de $2 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$) e montadas no porta-espécime (LT-SEM low temperature scanning electron microscopy) preparado para manter a temperatura em torno de -196°C (Caldwell et al., 1992b). Ele foi introduzido no equipamento de crio-preparação (EMscope SP2000A, Ashford, Kent, UK), as amostras foram transferidas, fragmentadas, sublimadas (-80°C) e banhadas a ouro (25 min, -160°C , 30 nm de espessura). Após tal procedimento, o porta-espécime, com as amostras preparadas, foi retirado e levado ao microscópio eletrônico de varredura (Hitachi S-570, Tóquio, Japão), acoplado ao *cold stage* (-140°C). As amostras foram observadas e eletromicrografadas a uma tensão de aceleração de 10 kV (Bolliger et al., 2000).

3.1.7 Microscopia eletrônica de transmissão

Com a ajuda de uma espátula, foram retiradas pequenas quantidades (aproximadamente 100 mm³) das amostras de sorvetes de cada tratamento (armazenadas à -35°C) e transferidas para um recipiente contendo nitrogênio líquido (-196°C). Após imersão em N₂, as amostras foram fragmentadas (em pedaços < 1 mm³) e encaminhadas para crio-substituição (Goff et al., 1999; e Smith et al. 2004). Amostras de cada tratamento foram fixadas em glutaraldeído (3% v/v em metanol absoluto) e mantidas por 4 dias (-80°C), 1 dia (-40°C) e 2 dias (-20°C). Após fixação, as amostras foram lavadas (-20°C) em gradientes de metanol e etanol (absoluto) e embebidas em uma mistura de metanol e resina LR-gold (na proporção de 3:1, 1:1, 1:3 e 100% resina no tempo de 45 min para cada solução). Os espécimes foram montados em cápsulas de gelatina contendo 0,1% (m/v) de benzil e encaminhados ao freezer (-20°C) acoplado com lâmpadas UV (360 nm) para efetivar a polimerização (aproximadamente 7 dias). Os blocos de resina foram seccionados (90 nm), usando ultramicrótomo (Leica Reicherd Ultracut S, Vienna, Áustria). Secções foram imediatamente montadas nas grades de níquel-cromo (Marivac Ltd., Halifax, NS, Canadá), mergulhadas em acetato de uranila e citrato de chumbo por 15 min e então analisadas pelo microscópio eletrônico de transmissão (Philips CM 10, acoplado sistema de *image capture software*; Soft Imaging System Corp, USA).

3.1.8 Difração de luz

Para determinar o tamanho das micelas de caseína foi utilizado um equipamento que mede a difração de luz em amostras, Malvern Dynamic Light Scattering (DLS) instrumento (Malvern Instruments, Malvern, UK) acoplado ao laser He-Ne (comprimento de onda 633 nm). Foram preparadas soluções modelo de leite em pó desnatado (13%), adicionado ou não de κ-carragena (0,025%) em diferentes concentrações de cloreto de cálcio (0, 20, 40, 60 e 80 mM de Ca²⁺). O

leite em pó foi solubilizado em água destilada adicionadas de cloreto de cálcio em diferentes concentrações, e as soluções descansaram por 30 min em temperatura ambiente e armazenada à temperatura de 4°C/12 horas. No dia seguinte, as amostras foram aquecidas 30 min/63°C, depois foram diluídas (5 µL de solução modelo para 3 µL de solução tampão; 5 mM de CaCl₂ e 20 mM de imidazol, pH 6,7; Spagnuolo et al., 2005) e medidas no DLS a 25°C. Cada solução foi testada 3 vezes com média de 10 medidas para cada corrida (cada corrida com uma média de 20 submetidas). Cada solução foi repetida em triplicata (diferentes soluções, porém mesma composição) para um total de 9 corridas para cada solução modelo.

3.2 Avaliação da microestrutura dos sorvetes em função da presença ou ausência de κ-carragena, cloreto de cálcio e emulsificante

3.2.1 Preparo das amostras

O preparado para sorvetes consistia de uma mistura contendo 10% de gordura (manteiga doce, Gay Lea Foods, Guelph, ON, Canadá), 11% de sólidos não gordurosos (leite em pó, Gay Lea Foods, Guelph, ON, Canadá), 12% de sacarose (Redpath Sugar, Toronto, ON, Canadá), 4% de xarope de milho (Casco Inc., Toronto, ON, Canadá), 0 ou 0,025% de estabilizante (κ-carragena; Germantown Canadá Inc., Scarborough, ON), 0 ou 0,15% de emulsificante (POLMO: 80% de mono e diglicerídeos e 20% de polissorbatos 80; Danisco, Aarhus, Dinamarca), cloreto de cálcio (Fisher, Toronto, Canadá) e água para o balanço total de 100% (Figura 2). Os diferentes tratamentos adicionados ou não de κ-carragena, emulsificante e cloreto de cálcio (nas proporções de 0, 40 e 80 mM de Ca²⁺) foram preparados e encaminhados ao homogeneizador (17.5/3.5 Mpa, APV Gaulin, Everett, MA), pasteurizadas (75°C/15 minutos), maturadas (24 horas/4°C), batidas (Taylor Batch Freezer, model 104, Rockton, IL) à

temperatura de -5°C e armazenadas por 48 horas à temperatura de -35°C . Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

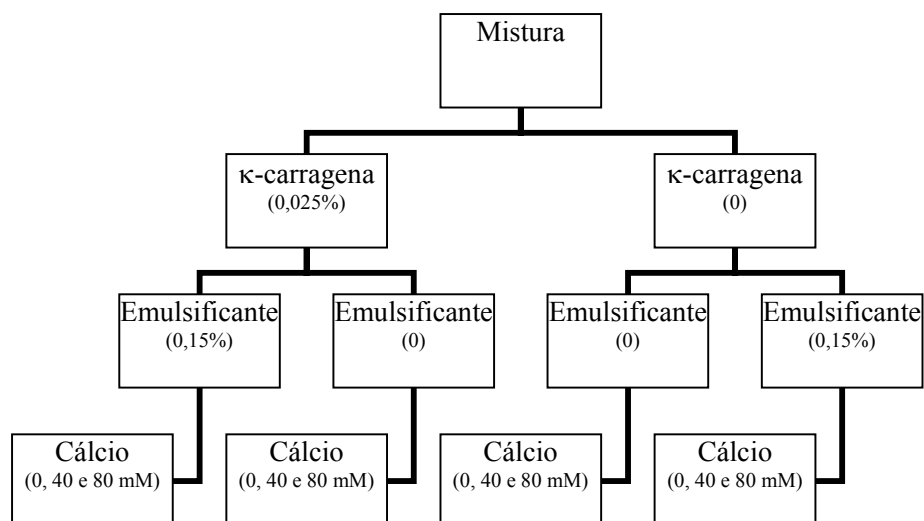


FIGURA 2. Fluxograma das etapas de preparação dos diferentes tratamentos do sorvete.

3.2.2 Distribuição do tamanho das partículas

Partículas coloidais presentes nas gotas de sorvete derretido dos diferentes tratamentos foram caracterizadas de acordo com a distribuição, tamanhos e área superficial de contato através da técnica de difração de luz estática utilizando o equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Malvern, UK). A razão entre índice de refração dos glóbulos de gordura (1,456) e o índice de refração da fase contínua (1,330) foi de 1,095. As médias do tamanho dos glóbulos de gordura foram obtidas como diâmetro médio de De Brouckere ($d_{[4,3]} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$) ou diâmetro médio de Sauter ($d_{[3,2]} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2}$).

$\Sigma n_i d_i^2$, onde n_i é o número de glóbulos de gordura com diâmetro d_i). Valores para área específica de contato, $m^2 g^{-1}$, foram também medidos (Bolliger et al, 2000).

3.2.3 Análise estatística

Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), num esquema fatorial 2x2x3x3 (adicionados ou não de κ -carragena, emulsificante e cloreto de cálcio, nas proporções de 0, 40 e 80 mM de Ca^{2+}). Todos experimentos foram realizados em triplicatas. O teste de Tukey foi usado para determinar a significância das diferenças entre os tratamentos. As análises foram realizadas em programa apropriado SISVAR 4.3 (Ferreira, 1999), utilizando-se planilha eletrônica Excel.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da microestrutura dos sorvetes em função da presença ou ausência de κ -carragena e cloreto de cálcio

4.1.1 Propriedades do congelamento da mistura

A Figura 1 mostra um termograma obtido para uma amostra de sorvete adicionado de cloreto de cálcio e κ -carragena. As características térmicas da curva de congelamento dos diferentes tratamentos dos sorvetes adicionados ou não de cloreto de cálcio e κ -carragena estão apresentadas na Tabela 1. Não foi observada variação nos termogramas obtidos para o congelamento das amostras adicionadas ou não de κ -carragena e cloreto de cálcio. De acordo com os resultados, não houve variação estatisticamente significativa ($P > 0.05$) nas temperaturas de nucleação durante o congelamento, nas temperaturas de derretimento ou nas entalpias dos quatro tratamentos estudados. A média da temperatura de nucleação, derretimento, início do congelamento e a entalpia foram -16.2°C , -1.7°C , -14.1°C e 218.8 J g^{-1} , respectivamente. Os resultados mostraram que a adição de cloreto de cálcio ou κ -carragena não influenciaram as propriedades térmicas da mistura.

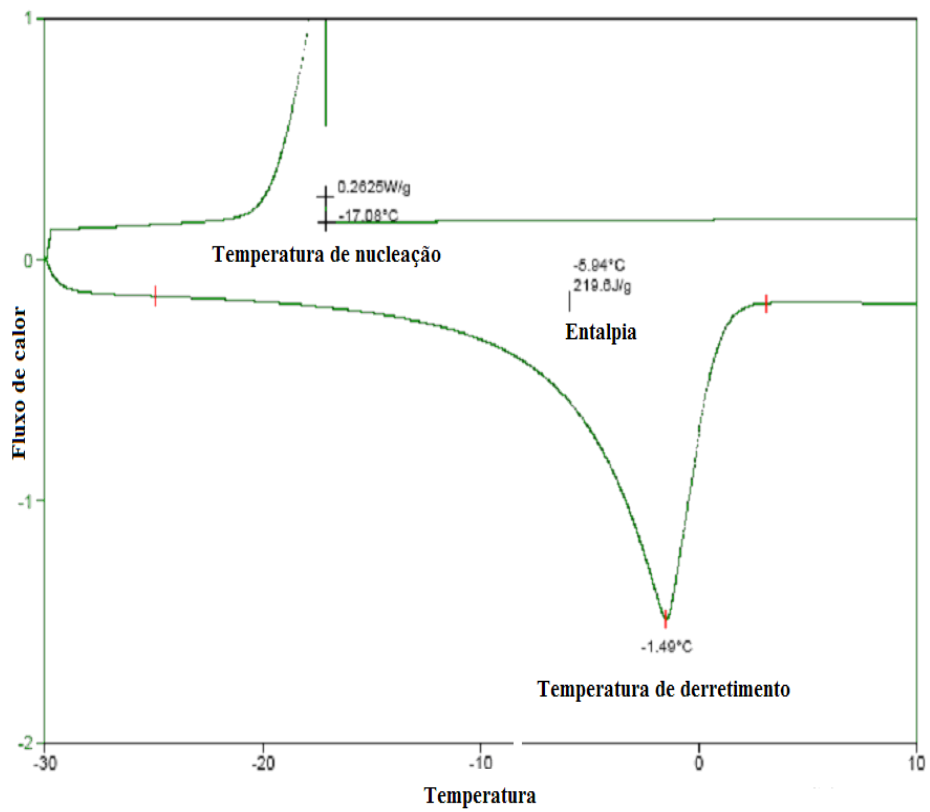


FIGURA 3. Termograma obtido de uma amostra de sorvete adicionada de cloreto de cálcio congelada a - 30°C por 2°C/min e aquecida para 20°C por 2°C/min em função da temperatura.

TABELA 1. Características da curva calorimétrica das amostras de mistura básica para sorvetes adicionadas ou não de cloreto de cálcio ou κ -carragena.

Tratamento	Temperatura Derretimento (°C)	Entalpia (J/g)	Nucleação (°C)
κ -carragena e Cálcio	-1,6 ^a	222,6 ^a	-15,7 ^a
κ -carragena	-1,7 ^a	220,5 ^a	-15,9 ^a
Cálcio	-1,7 ^a	215,5 ^a	-17,0 ^a
Controle	-1,8 ^a	216,4 ^a	-16,1 ^a

^a Valores com mesma letra na mesma coluna não são significativamente diferentes ao teste de Tukey ($P > 0,05$).

4.1.2 Tamanho dos cristais de gelo no sorvete

Os valores para o diâmetro circular mediano dos cristais de gelo (X_{50} representa o valor mediano da curva de distribuição de frequência dos diâmetros dos trezentos cristais de gelo obtidos) nas amostras de sorvetes submetidas ou não (sorvete fresco) ao sistema que simula oscilações de temperatura são mostrados na Tabela 2. De acordo com os resultados obtidos para as amostras de sorvete fresco, a adição de cloreto de cálcio aumentou significativamente o tamanho dos cristais de gelo ($P < 0,05$) nas amostras adicionadas ou não de κ -carragena ao passo que para sua presença ou ausência não foi observada variação significativa ($P > 0,05$) no tamanho dos cristais de gelo. A adição de κ -carragena não teve efeito significativo ($P > 0,05$) nos cristais de gelo na presença ou ausência de cloreto de cálcio. Para os sorvetes submetidos ao ciclo de variação de temperatura, foi observado aumento para cristais de gelo em todos os diferentes tratamentos. A presença de cloreto de cálcio aumentou significativamente ($P < 0,05$) o tamanho dos cristais de gelo na ausência ou

presença de κ -carragena. Especificamente, na presença de κ -carragena foi observado um grande aumento dos cristais de gelo ($P < 0,05$). As amostras adicionadas de cloreto de cálcio também apresentaram significantes raios de crescimento ($P < 0,05$), mas somente na presença de κ -carragena tais valores foram expressivos.

TABELA 2. Valores para os diâmetros equivalentes circulares medianos dos cristais de gelo (X_{50}) de sorvetes frescos e sorvetes submetidos ao ciclo de variação de temperatura e suas respectivas porcentagens de crescimento obtidas a partir da análise das micrografias por microscopia fotônica.

Sorvete	Tamanho dos cristais de gelo (μm)	
	κ -carragena (0.025%)	κ -carragena (0%)
Fresco (+ Ca^{2+})	64,0 ^{a1, b1}	67,2 ^{a1}
Fresco (não Ca^{2+})	56,3 ^{a1, b1}	54,1 ^{b1}
Ciclos (+ Ca^{2+})	89,1 ^{a2}	81,6 ^{c2}
Ciclos (não Ca^{2+})	73,9 ^{b2}	71,7 ^{b2, d2}
% Crescimento (+ Ca^{2+})	39,2 ^{a3}	21,5 ^{c3}
% Crescimento (não Ca^{2+})	31,2 ^{b3}	32,6 ^{b3}

^{a, b} Valores com mesma letra nas linhas e nas colunas não são estatisticamente diferentes ao teste de Tukey ($P > 0,05$).

4.1.3 Distribuição das proteínas

Soluções de leite reconstituído na presença ou ausência de cloreto de cálcio foram ultracentrifugadas para determinar a distribuição das caseínas micelares e não micelares. A porcentagem de volume do sobrenadante aumentou significativamente ($P < 0,05$), e a porcentagem de precipitado diminuiu

significativamente ($P < 0,05$) após ultracentrifugação do leite reconstituído adicionado de cloreto de cálcio (Tabela 3). A adição de cloreto de cálcio influenciou significativamente ($P < 0,05$) na porcentagem de β -caseína. Entretanto não foi observado variação para as demais frações das proteínas presentes nas amostras (Tabela 4).

TABELA 3. Porcentagem do sobrenadante e precipitado após ultracentrifugação de soluções de leite reconstituído adicionado ou não de cloreto de cálcio.

Tratamentos	Soluções ultracentrifugadas (% m/m)	
	Sobrenadante	Precipitado
Com cloreto de cálcio	83,0 ^a	17,0 ^a
Sem cloreto de cálcio	79,0 ^b	21,0 ^b

^{a, b} Valores com mesma letra na mesma coluna não são significativamente diferentes ao teste de Tukey ($P > 0,05$).

TABELA 4. Proporção das proteínas individuais (na porcentagem do total das proteínas no leite) presentes no sobrenadante após ultracentrifugação (40,000 x g por 60 min) das soluções de leite em pó reconstituído adicionados ou não de cloreto de cálcio.

Proteínas	Concentração (% m/m)	
	Com Ca ²⁺	Sem Ca ²⁺
α -Lactoalbumina	25,02 ^a	23,94 ^a
β -Lactoglobulina	49,22 ^a	47,12 ^a
α_{s1} -Caseína	7,85 ^a	8,26 ^a
α_{s2} -Caseína	Não detectável	Não detectável
κ -Caseína	9,81 ^a	9,29 ^a
β -Caseína	8,10 ^a	11,39 ^b

^{a, b} Valores com mesma letra na mesma linha não são significativamente diferentes ao teste de Tukey ($P > 0,05$).

4.1.4 Coalescência parcial das gorduras

A adição de cloreto de cálcio ou κ -carragena não teve efeito significativo ($P > 0,05$) no tamanho das gotas de gordura na mistura para sorvetes. As análises das partículas de gordura nas amostras de sorvete (Tabela 5) mostraram que a adição de cloreto de cálcio na presença de κ -carragena aumentou consideravelmente ($P < 0,05$) a desestabilização da emulsão como foi mostrado pela porcentagem de distribuição das partículas $> 3\mu\text{m}$, área superficial específica, $d_{[4,3]}$ e $d_{[3,2]}$. A aglomeração dos glóbulos de gordura podem alterar os valores razoáveis de coalescência parcial da gordura os quais restringem o raio de recristalização do gelo. A adição de cloreto de cálcio na ausência de κ -carragena e a adição de κ -carragena na ausência de cloreto de cálcio não influenciaram ($P > 0,05$) a coalescência parcial da gordura.

TABELA 5. Valores obtidos para a coalescência parcial da gordura estimados pelo tamanho das partículas (porcentagem acumulativa da distribuição > 3 µm, área superficial específica, $d_{[4,3]}$, $d_{[3,2]}$).

Partículas	Coalescência Parcial (%)	
	κ-carragena (0.025%)	κ-carragena (0%)
Distribuição > 3 µm (com Ca ²⁺)	81,2 ^a	32,9 ^b
Distribuição > 3 µm (sem Ca ²⁺)	28,0 ^b	34,4 ^b
Área superficial (com Ca ²⁺)	2,23 ^a	17,53 ^c
Área superficial (sem Ca ²⁺)	21,10 ^b	14,30 ^d
$D_{[4,3]}$ (com Ca ²⁺)	17,56 ^a	5,52 ^b
$D_{[4,3]}$ (sem Ca ²⁺)	3,75 ^b	4,54 ^b
$D_{[3,2]}$ (com Ca ²⁺)	2,95 ^a	0,38 ^b
$D_{[3,2]}$ (sem Ca ²⁺)	0,32 ^b	0,47 ^b

^{a, b} Valores com mesma letra nas linhas e nas colunas não são estatisticamente diferentes ao teste de Tukey ($P > 0,05$).

4.1.5 Microestrutura dos sorvetes

Em geral, as eletromicrografias de varredura (Figuras 4, 5 e 6) mostraram que as bolhas de ar no sorvete aparecem em formato esférico (com diâmetros entre 10-50 µm) ou distorcidas em virtude do crescimento dos cristais de gelo. Os glóbulos de gordura apareceram em formato de pequenas esferas (0,2 a 1,0 µm) sozinhas ou aglomeradas, formando *clusters*. Os cristais de gelo apareceram em formato retangular ou poligonal com os tamanhos dependendo dos ingredientes adicionados, processamento e condições de estocagem. As diferenças entre coalescência parcial dos glóbulos de gordura e dos cristais de gelo entre os 4 tratamentos (resultados estes obtidos por técnicas quantitativas) não foram discerníveis no nível de magnificação usado na microscopia

eletrônica de varredura. As eletromicrografias de transmissão (Figuras 7, 8 e 9) dos diferentes tratamentos do sorvete, contudo, mostraram que os diversos níveis de desenvolvimento da desestabilização dos glóbulos de gordura foram dependentes da adição de cloreto de cálcio especialmente na presença de κ -carragena. Como evidência negativa da adição de cloreto de cálcio, foi possível observar alta adsorção dos glóbulos de gordura na interface das bolhas de ar e maior interconexão entre elas, formando aglomerados coalescentes de gordura que causou a desestabilização do meio (Figuras 7A, 8A e 9A). Quando não foi adicionado cloreto de cálcio na presença ou ausência de κ -carragena, um anel de proteína foi evidentemente observado na interface dos glóbulos de gordura, evitando a conexão deles e, assim, diminuindo a desestabilização (Figuras 8B, 8D, 9B e 9D).

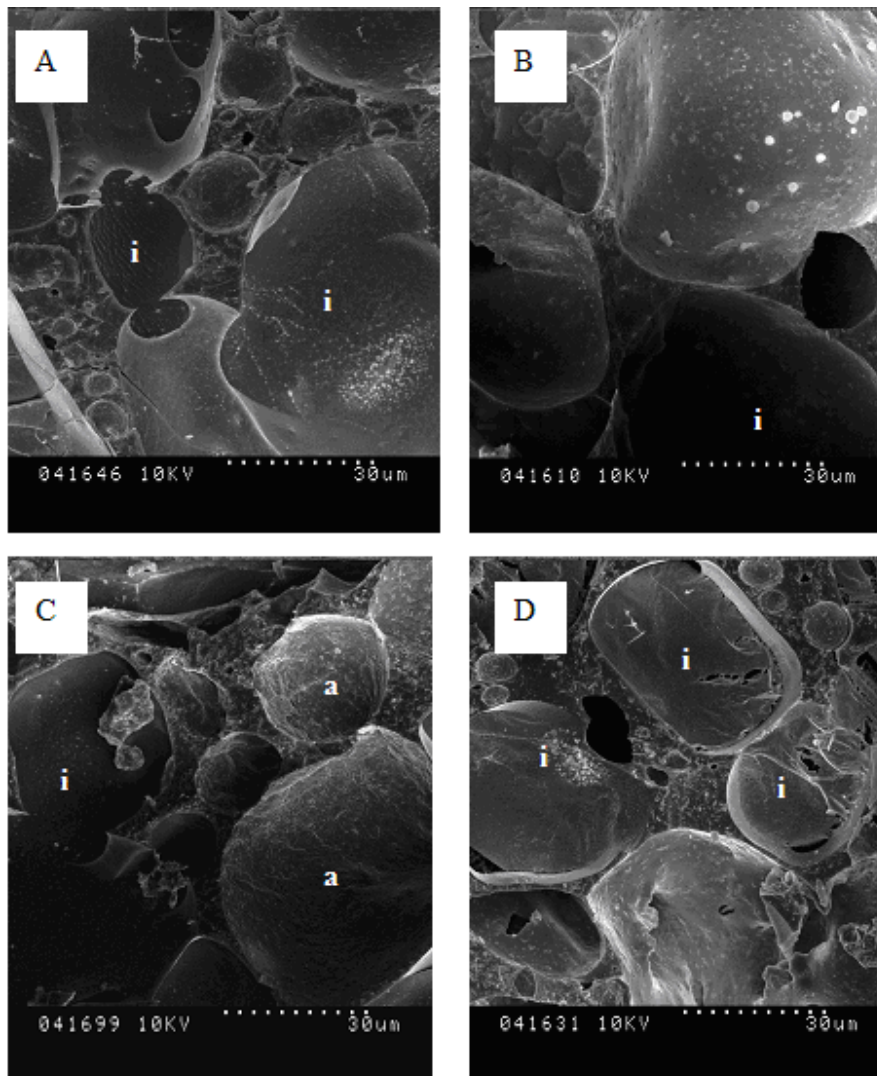


FIGURA 4. Eletromicrografias de varredura da microestrutura de sorvetes adicionados ou não de κ -carragena e cálcio (Tratamentos: A = adição de κ -carragena e cálcio; B = adição de κ -carragena; C = adição de cálcio; D = ausentes da adição de κ -carragena e cálcio). Indicadores: barra (D) = 30 μ m; i = cristal de gelo; a = bolhas de ar.

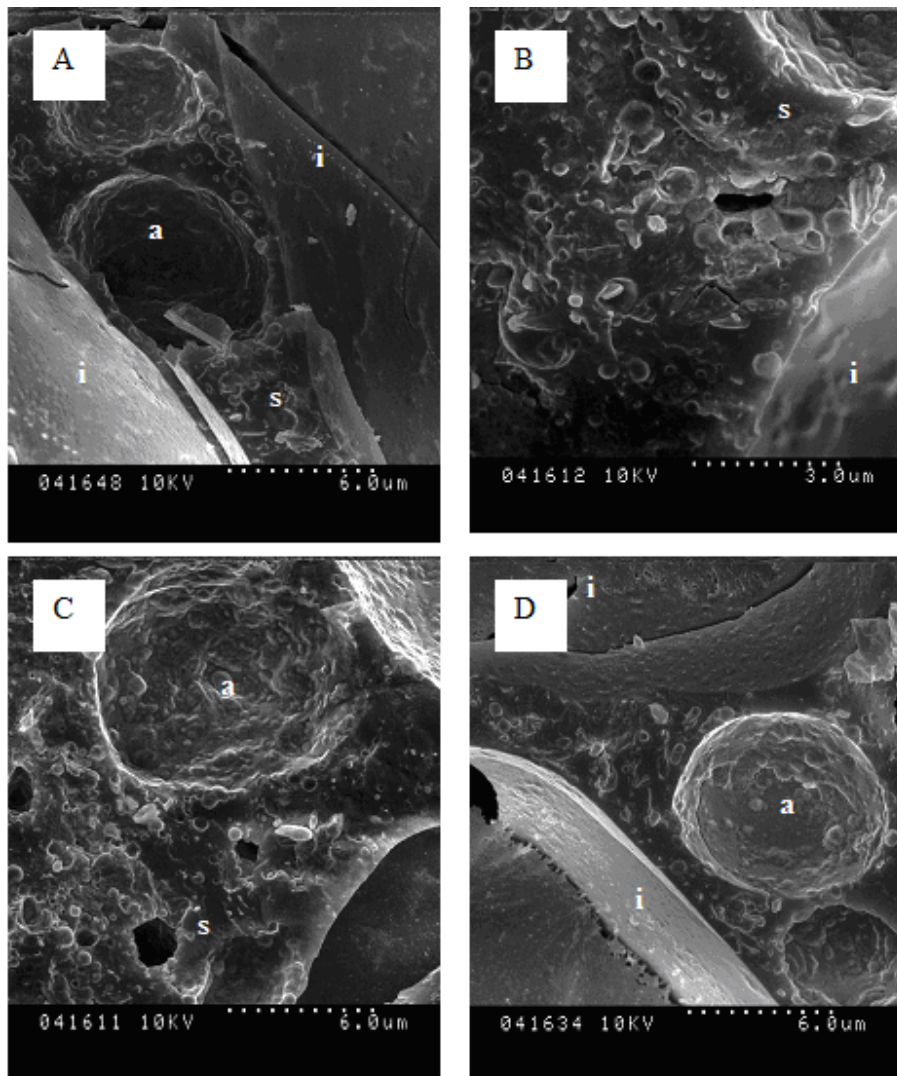


FIGURA 5. Eletromicrografias de varredura da microestrutura de sorvetes adicionados ou não de κ -carragena e cálcio (Tratamentos: A = adição de κ -carragena e cálcio; B = adição de κ -carragena; C = adição de cálcio; D = ausentes da adição de κ -carragena e cálcio). Indicadores: barra (D) = 6 μm ; a = bolhas de ar, f = glóbulos de gordura, i = cristal de gelo, s = fase não congelada.

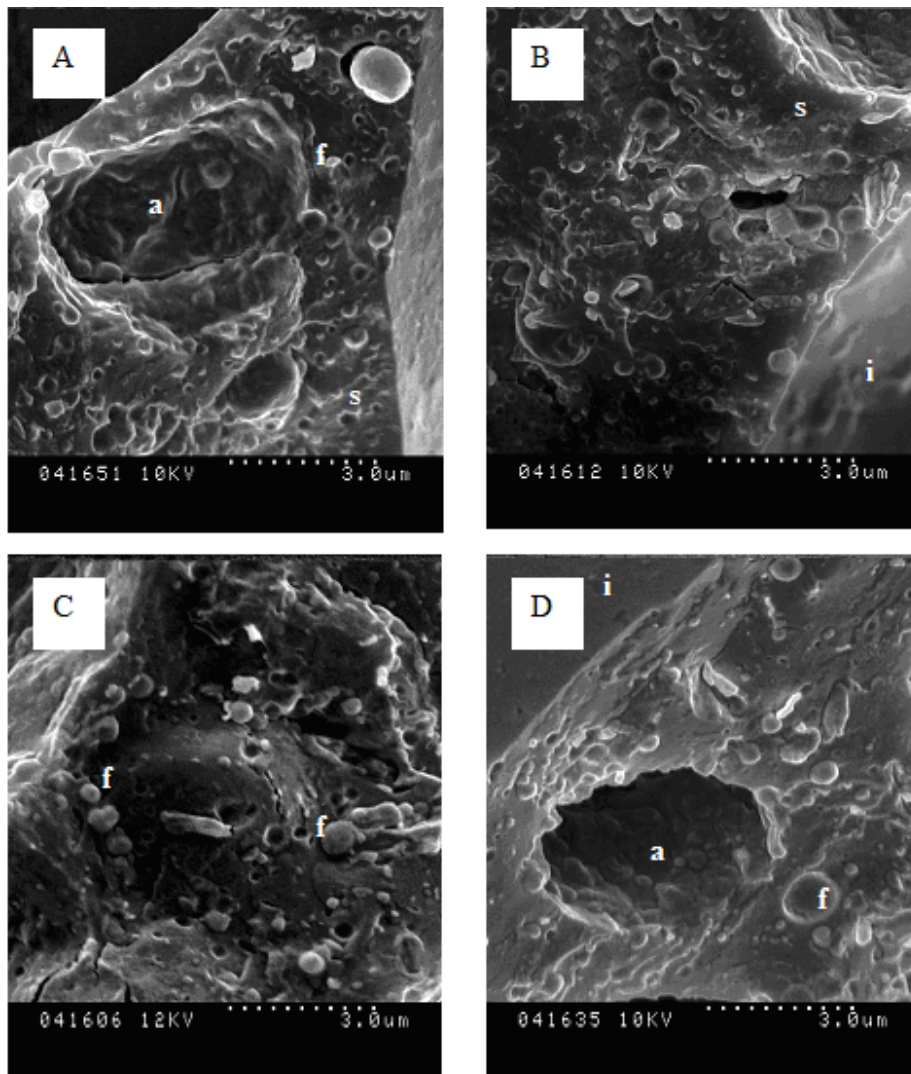


FIGURA 6. Eletromicrografias de varredura da microestrutura de sorvetes adicionados ou não de κ -carragena e cálcio (Tratamentos: A = adição de κ -carragena e cálcio; B = adição de κ -carragena; C = adição de cálcio; D = ausentes da adição de κ -carragena e cálcio. Indicadores: barra (D) = 3 μ m; a = bolhas de ar, f = glóbulos de gordura, i = cristal de gelo, s = fase não congelada.

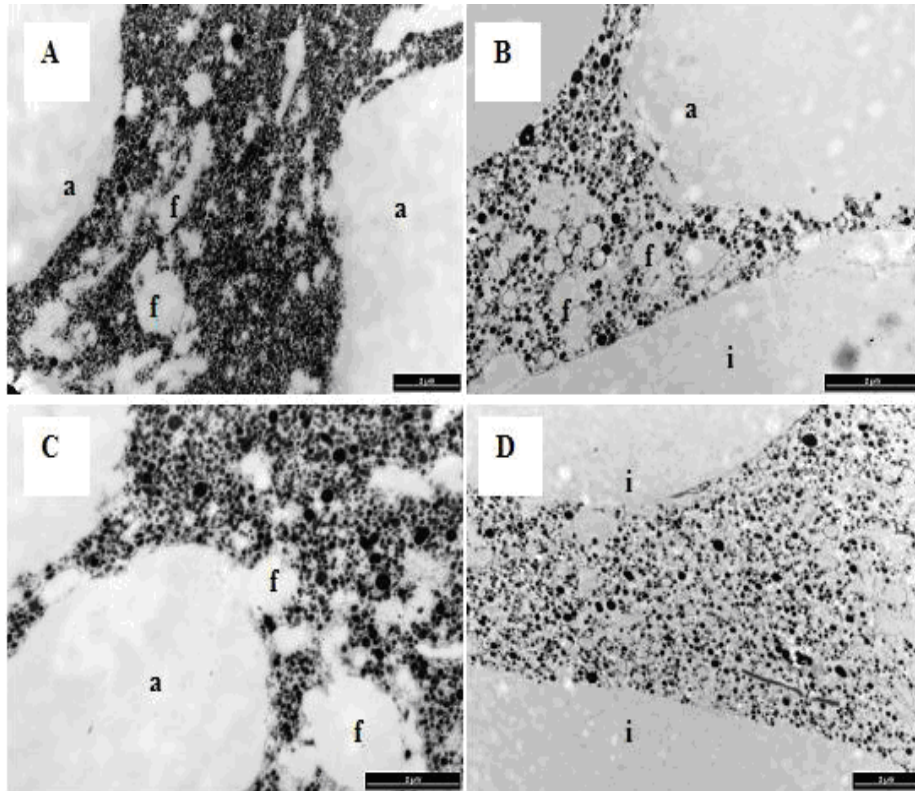


FIGURA 7. Eletromicrografias de transmissão da microestrutura do sorvete. (Tratamentos: A = adição de κ -carragena e cálcio; B = adição de κ -carragena; C = adição de cálcio; D = ausentes da adição de κ -carragena e cálcio). Indicadores: barra = 2 μ m; f = glóbulos de gordura; CM = micelas de caseína; a = bolhas de ar.

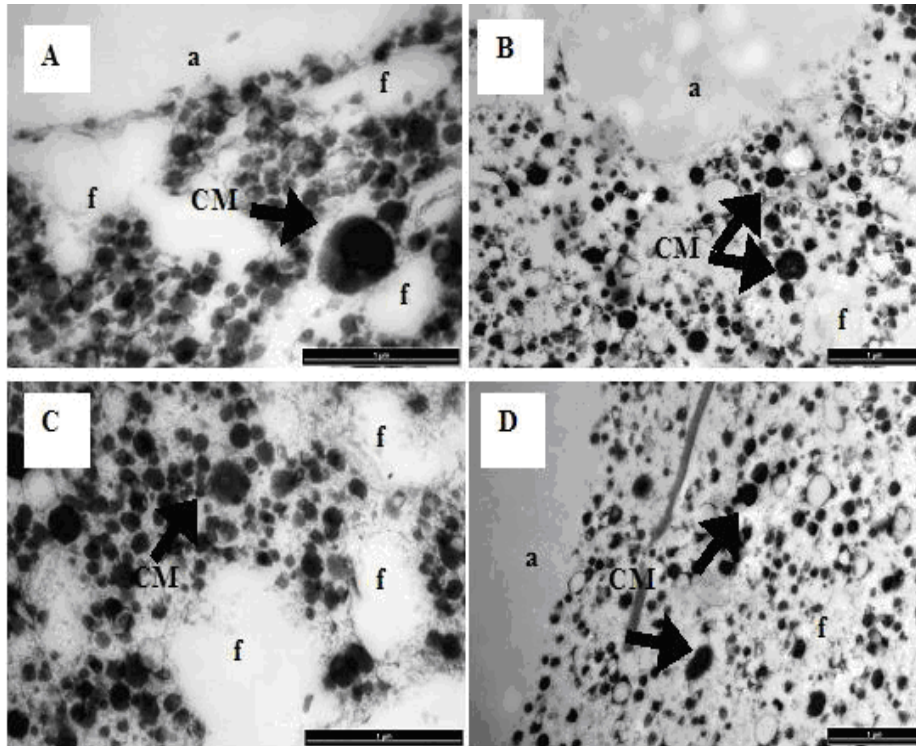


FIGURA 8. Eletromicrografias de transmissão da microestrutura do sorvete. (Tratamentos: A = adição de κ -carragena e cálcio; B = adição de κ -carragena; C = adição de cálcio; D = ausentes da adição de κ -carragena e cálcio). Indicadores: barra = 1 μ m; f = glóbulos de gordura; CM = micelas de caseína; a = bolhas de ar.

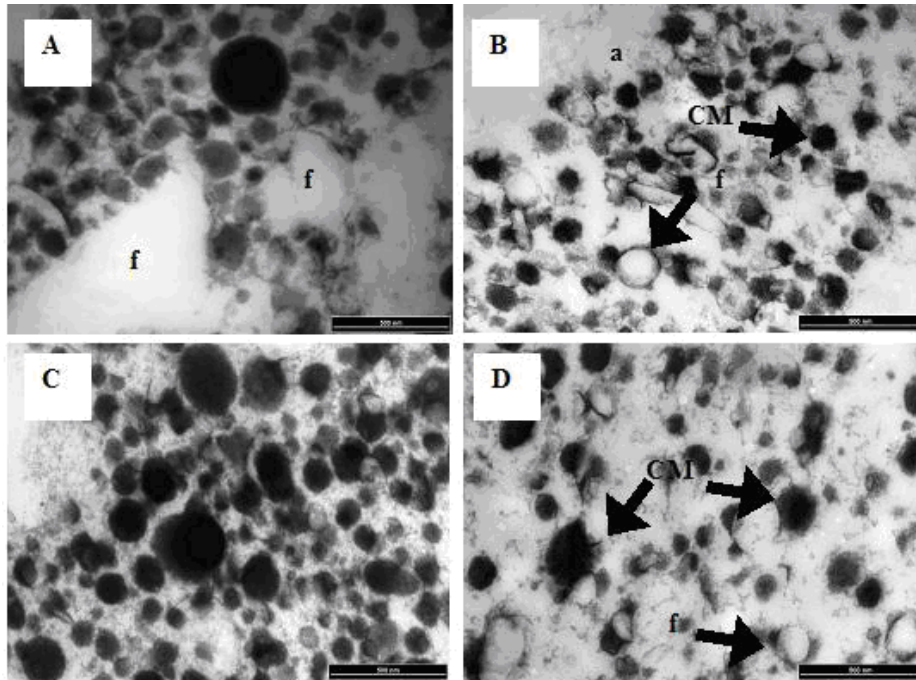


FIGURA 9. Eletromicrografias de transmissão da microestrutura do sorvete. (Tratamentos: A = adição de κ -carragena e cálcio; B = adição de κ -carragena; C = adição de cálcio; D = ausentes da adição de κ -carragena e cálcio). Indicadores: barra = 500 nm; f = glóbulos de gordura; CM = micelas de caseína; a = bolhas de ar.

4.1.6 Tamanho das micelas de caseína

A adição de 0,015% κ -carragena na solução de leite reconstituído (13% sólidos não gordurosos do leite) na ausência de cloreto de cálcio aumentou significativamente ($P < 0,05$) o diâmetro das micelas de caseína de 202,3 nm para 233,6 nm. Como a concentração de cloreto de cálcio foi variada de 0-80 mM de Ca^{2+} nas soluções contendo κ -carragena, houve um aumento linear direto no diâmetro das micelas de caseína ($r^2 = 0,828$; Figura 10). Para garantir que κ -carragena estava na conformação helicoidal, a temperatura de medida foi de 25°C. Esse aumento linear dos diâmetros das micelas de caseína pode indicar uma adsorção da κ -carragena na superfície da micela o qual foi acentuado pela presença de cloreto de cálcio. Na ausência de κ -carragena houve uma pequena tendência de diminuição do tamanho das micelas de caseína com adição de cloreto de cálcio ($r^2 = 0,984$). Tais resultados sugerem que, em presença de cloreto de cálcio e κ -carragena, existe uma competição entre as interações da κ -carragena/ κ -caseína e das interações entre as micelas de caseína/caseína, formando uma superfície de adsorção e ligações entre as micelas de caseína, ao passo que o efeito da adição do cloreto de cálcio sozinho na micela de caseína promoveu uma associação intra-micelar entre as proteínas e, conseqüentemente, uma diminuição no tamanho das micelas.

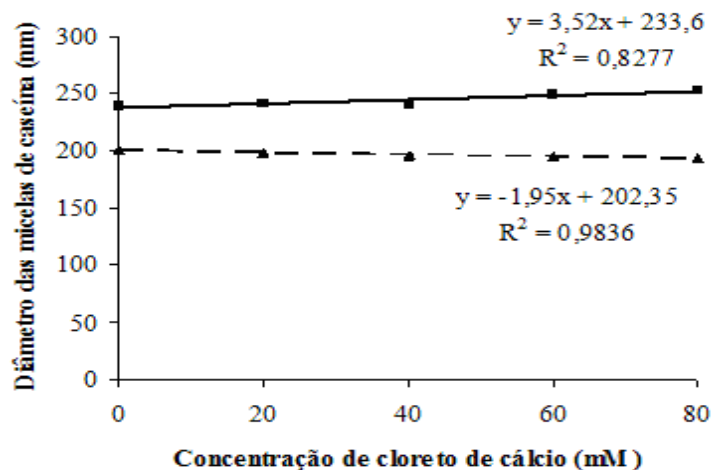


FIGURA 10. Efeito da adição de cloreto de cálcio no diâmetro das micelas de caseína (com linha de tendência e correspondente equação de regressão) na presença (■) e ausência (▲) de κ -carragena medidos à temperatura de 25°C pelo equipamento de difração de luz dinâmica.

4.2 Avaliação da microestrutura de sorvetes em função da presença ou ausência de κ -carragena, cloreto de cálcio e emulsificante

4.2.1 Efeito do emulsificante na coalescência parcial dos sorvetes

As Tabelas 6, 7, 8 e 9 mostram os resultados quantitativos que caracterizam a desestabilização dos glóbulos de gordura nas amostras de sorvetes adicionadas ou não de estabilizante (κ -carragena), emulsificante (80% de mono e diglicerídeos e 20% de polissorbato 80) e cloreto de cálcio adicionado à mistura básica para sorvetes em diferentes concentrações (0, 40 e 80 mM). As tabelas apresentam, respectivamente, os valores médios obtidos para diâmetro ponderado pelo volume ($d_{[4,3]}$), diâmetros ponderados pela área

superficial ($d_{[3,2]}$), área superficial específica e a porcentagem das partículas com diâmetro superior a 3 μm .

TABELA 6. Diâmetro médio de De Brouckere ($d_{[4,3]} = \Sigma n_i d_i^4 / \Sigma n_i d_i^3$) para coalescência parcial em sorvetes (adicionados ou não de κ -carragena, emulsificante e cloreto de cálcio, nas proporções de 0, 40 e 80 mM de Ca^{2+}).

Cálcio (Mm)	κ -Carragena (0,025%)	Emulsificante (0,15%)	
		Com	Sem
0	Com	3,97 ^{a1}	1,44 ^{a2}
0	Sem	6,10 ^{b1}	0,86 ^{a2}
40	Com	6,20 ^{a1}	1,07 ^{a2}
40	Sem	2,81 ^{b1}	1,51 ^{a2}
80	Com	6,27 ^{a1}	2,77 ^{a2}
80	Sem	4,47 ^{b1}	2,91 ^{a2}

^{a, b} Letras diferentes na coluna e números diferentes na linha são estatisticamente significativos ao teste de Tukey ($P < 0,05$).

TABELA 7. Diâmetro médio de Sauter ($d_{[3,2]} = \Sigma n_i d_i^3 / \Sigma n_i d_i^2$, onde n_i é o número de glóbulos de gordura com diâmetro d_i) para a coalescência parcial em sorvetes (adicionados ou não de κ -carragena, emulsificante e cloreto de cálcio, nas proporções de 0, 40 e 80 mM de Ca^{2+}).

Cálcio (Mm)	κ -Carragena (0,025%)	Emulsificante (0,15%)	
		Com	Sem
0	Com	0,41 ^{a1}	0,35 ^{a1}
0	Sem	0,56 ^{b1}	0,27 ^{a2}
40	Com	0,81 ^{a1}	0,31 ^{a2}
40	Sem	0,37 ^{b1}	0,35 ^{a1}
80	Com	0,70 ^{a1}	0,38 ^{a2}
80	Sem	0,60 ^{a1}	0,37 ^{a2}

Letras diferentes na coluna e números diferentes na linha são estatisticamente significativas ao teste de Tukey ($P < 0,05$).

TABELA 8: Área superficial específica das partículas coloidais em sorvetes (adicionados ou não de κ -carragena, emulsificante e cloreto de cálcio, nas proporções de 0, 40 e 80 mM de Ca^{2+}).

Cálcio (Mm)	κ -Carragena (0,025%)	Emulsificante (0,15%)	
		Com	Sem
0	Com	16,00 ^{a1}	18,63 ^{a1}
0	Sem	11,90 ^{b1}	23,87 ^{b2}
40	Com	8,18 ^{a1}	21,10 ^{a2}
40	Sem	17,83 ^{b1}	18,90 ^{a1}
80	Com	9,49 ^{a1}	17,83 ^{a2}
80	Sem	11,63 ^{a1}	18,16 ^{a2}

Letras diferentes na coluna e números diferentes na linha são estatisticamente significativas ao teste de Tukey ($P < 0,05$).

TABELA 9: Diâmetro médio das partículas acima de $3\mu\text{m}$ no sorvete adicionado de 40 mM de cloreto de cálcio.

Emulsificante	Médias
Com	30,11 ^a
Sem	17,26 ^b

Letras diferentes na coluna são estatisticamente significativas ao teste de Tukey ($P < 0,05$).

De acordo com os resultados (Tabelas 6, 7 e 8), observa-se que na ausência de emulsificante não houve variação estatisticamente significativa ($P > 0,05$) para ausência ou presença de κ -carragena e cloreto de cálcio nas diferentes concentrações. Esses baixos valores para a medida de desestabilização dos glóbulos de gordura estão de acordo com a descrição feita por Goff et al. (1999). No entanto, quando se adiciona emulsificante (0,15%) é possível observar que existe um comportamento estatisticamente significativo ($P < 0,05$) para a presença ou ausência de κ -carragena (0,025%) e cloreto de cálcio (40 e 80 mM). Quando não se adiciona cloreto de cálcio (Tabelas 6, 7 e 8) observou-se um maior indicativo de coalescência (maior valor para diâmetro ponderado pelo volume ($d_{[4,3]}$) e diâmetros ponderados pela área superficial ($d_{[3,2]}$), e baixo valor para área superficial específica) para as amostras ausentes da adição de κ -carragena. Na presença de κ -carragena, esse indicativo de coalescência diminuiu, Tabelas 6, 7 e 8, mostrando menores valores para o diâmetro ponderado pelo volume ($d_{[4,3]}$) e diâmetro ponderado pela área superficial ($d_{[3,2]}$), e maior valor para área superficial específica. Quando se adiciona cloreto de cálcio (40 e 80 mM) ocorre uma inversão dos resultados. Os indicativos de coalescência aumentam para presença de κ -carragena (Tabelas 6, 7 e 8) em que é possível serem observados maiores valores para diâmetro ponderado pelo volume ($d_{[4,3]}$)

e diâmetros ponderados pela área superficial ($d_{[3,2]}$) e menores valores para área superficial específica. Os resultados para diâmetros de partículas superiores a 3 μm (Tabela 9) mostram que, em presença de cloreto de cálcio (40 mM ou 80 mM), existe uma variação estatisticamente significativa ($P < 0,05$) para a adição ou não de emulificante (0,15%). De acordo com a Tabela 9, cerca de 30,11% das partículas de gordura presentes em amostras de sorvetes adicionadas de emulsificante estão com diâmetros superior a 3 μm , ao passo que 17,26% das partículas de sorvetes ausentes da adição de emulsificante estão abaixo desse valor.

5 DISCUSSÃO

A adição de cloreto de cálcio ao sorvete na presença de κ -carragena e emulsificante impactou negativamente na estrutura e qualidade, aumentando consideravelmente o tamanho dos cristais de gelo, especialmente após a submissão aos ciclos de variação de temperatura (choque térmico), desestabilizando excessivamente as gorduras presentes no meio. Os efeitos da adição de cloreto de cálcio em sistemas lácteos são bem conhecidos, resultando no aumento das interações entre as caseínas do leite (Fox & McSweeney, 1998). Modificações no equilíbrio salino entre cálcio micelar e o cálcio não micelar são usados frequentemente para modificar a coagulação e o rendimento em queijos (Fox et al., 2000). Devido à complexa distribuição do cálcio no leite (Little & Holt, 2004), qualquer mudança na força iônica, concentração dos íons cálcio ou pH pode resultar efeitos na distribuição e estabilidade das micelas de caseína (Tsioulpas et al., 2007).

Williams et al. (2005) mostraram que a adição de cloreto de cálcio solúvel em leite desnatado reconstituído induz ao aumento proporcional do cálcio livre, sugerindo que os íons cálcio fossem capazes de afetar o equilíbrio salino micelar e não micelar do leite. Lin et al. (2006) provaram que a adição de cloreto de cálcio ao leite induz a um aumento linear nas concentrações de íons cálcio, reduzindo pH e diminuindo a estabilidade ao etanol e ao calor. Como foi observado nos resultados através do diâmetro micelar obtido pelas análises no DLS, a adição de cloreto de cálcio induz à compactação das micelas de caseína cujo efeito pode ser explicado através dos resultados obtidos após ultracentrifugação do leite adicionado de cloreto de cálcio. Nesse experimento foi observado uma diminuição na quantidade de β -caseína presente no soro do leite devido à migração delas para dentro das micelas de caseína, o que causou

sua compactação. Isso reduz o volume ocupado pelas micelas de caseína e também a quantidade de proteínas solúveis na fase não congelada do sorvete. Os efeitos observados afetaram diretamente a cristalização do gelo, aumentando os raios de crescimento devido a uma redução na viscosidade da fase não congelada através do impedimento estérico (Goff, 2003). Por outro lado, a adição de cloreto de cálcio ao nível que foi utilizado neste trabalho e a presença de grande quantidade de açúcar poderia teoricamente diminuir o ponto de congelamento da solução. Não foram observados porém, efeitos significativos nas propriedades térmicas da mistura básica para sorvetes adicionadas ou não de cloreto de cálcio o que justifica que o crescimento excessivo dos cristais de gelo não ocorreu por essas razões.

A adição de cloreto de cálcio na mistura para sorvetes na presença de κ -carragena induziu a um aumento no tamanho das partículas de gordura, o que resultou na coalescência. Tal resultado foi observado através das análises por microscopia e difração de luz. Caseínas micelares e a β -caseína não-micelar podem, ambas, adsorverem aos glóbulos de gordura induzindo ao aumento da estabilidade do sistema. Na presença de cloreto de cálcio, no entanto, foi observada uma maior compactação das micelas de caseína e, conseqüentemente, menor quantidade de β -caseína estaria disponível para a interação com os glóbulos de gordura. Tais fatores poderiam reduzir a membrana interfacial entre as proteínas e os glóbulos de gordura, o que causaria uma diminuição da estabilidade dos glóbulos de gordura durante a produção e congelamento do sorvete. Os efeitos dos íons cálcio na desestabilização da gordura em sorvetes são conhecidos (Marshall et al., 2003).

Dauphas et al. (2008), recentemente, certificaram que os íons cálcio interferem na estabilidade das gotas de óleo em emulsões adicionadas de β -caseína. Embora valores ótimos de coalescência parcial de gordura induzem a uma formação de agregados de glóbulos de gordura que podem reduzir o

tamanho, a distribuição e os raios de crescimento dos cristais de gelo em sorvetes (Flores & Goff, 1999; Barfod, 2001), uma desestabilização excessiva da gordura causa efeitos opostos, como coalescência e aumento da massa de gordura, interferindo no impedimento estérico e, desse modo, aumentando os raios de crescimento dos cristais de gelo.

O efeito da adição de cloreto de cálcio no crescimento dos cristais de gelo e na desestabilização das gorduras foi altamente afetado pela κ -carragena, sugerindo efeito sinérgico ou de interação. Isso pode ser comprovado pela observação dos resultados em que a ausência de cloreto de cálcio não observou o efeito da adição de κ -carragena nos parâmetros estruturais. Os resultados obtidos pelo experimento com difração de luz sugere que, em presença de κ -carragena, ocorre uma maior adsorção entre as micelas de caseína ou uma maior formação de agregados κ -carragena/micela de caseína na presença de íons cálcio. Aumento das interações entre as moléculas de κ -carragena pode também ter ocorrido por causa da presença de íons cálcio. Isso pode ser explicado pela propriedade ionotrópica que a κ -carragena possui com cátions mono ou bivalentes. Em solução, as moléculas de κ -carragena, por possuírem grupamentos sulfatos na estrutura molecular, em solução tornam-se negativamente carregada, o que facilita as interações com cátions e, desse modo, com os íons cálcio adicionados ao meio. Interações entre as moléculas κ -carragena e κ -caseína ou as micelas de caseína são bem detalhadas e estudadas (Dalglish & Morris, 1988; Spagnuolo et al., 2005; Vega et al., 2005).

Os íons cálcio também influenciaram drasticamente os sorvetes adicionados ou não de emulsificante. Nos resultados obtidos para coalescência da gordura em sorvetes, foi observado que os íons cálcio interagem com os emulsificantes, que nesse experimento, foram constituídos basicamente de 80% de mono e diglicerídeos e 20% de polissorbato 80. Os ésteres de sorbato possuem ácidos graxos esterificados com moléculas de sorbitol enquanto os

monoglicéridos possuem ácidos graxos esterificados com moléculas de glicerol. Para que os ésteres de sorbato sejam hidrofílicos durante sua produção grupamentos polioxietileno são adicionados à estrutura carbônica, os quais, em solução, apresentam-se também como negativos, o que facilita a interação com íons cálcio. Tais interações inativam os emulsificantes que são usados com o objetivo de melhorar as interações entre os glóbulos de gordura e as proteínas presentes no sorvete, desestabilizando a estrutura e, conseqüentemente, aumentando os raios de crescimento para os cristais de gelo.

As interações entre a κ -carragena e as micelas de caseína e a inativação dos emulsificantes foram o que, provavelmente, causaram a grande redução da estabilidade dos glóbulos de gordura devido à diminuição na superfície de adsorção entre as proteínas. A redução na quantidade de β -caseína, como descrito acima, juntamente com a redução na disponibilidade das micelas de caseína em estabilizar os glóbulos de gordura graças às interações com a κ -carragena, este mediado pela adição de íons cálcio promoveram uma excessiva desestabilização dos glóbulos de gordura e, assim, um grande aumento nos raios de recristalização do gelo.

6 CONCLUSÕES

A fortificação de cálcio pela adição de cloreto de cálcio em formulações convencionais de sorvete, usando sólidos não gordurosos do leite, induz a impactos negativos nas propriedades físicas, estruturais e de qualidade dos sorvetes, cujos efeitos foram acentuados pela presença de κ -carragena.

As amostras adicionadas de cloreto de cálcio na presença de κ -carragena apresentaram 81,2% das partículas de gordura com tamanho superior a 3 μ m de diâmetro caracterizando o sistema com alto índice de desestabilização. Este efeito resultou num crescimento excessivo dos cristais de gelo que após submissão ao choque de temperatura foi de 39,2%. Entretanto, nas amostras ausente de κ -carragena o crescimento dos cristais de gelo foi de 21,5%, e para as amostras ausentes de cloreto de cálcio, a porcentagem de crescimento dos cristais de gelo foi em torno de 32%, não sendo observada variação estatisticamente significativa para os valores obtidos para a coalescência.

As relações que existem entre os elementos estruturais nos sorvetes foram demonstradas aqui: mudanças na estrutura protéica pela redução da habilidade dos emulsificantes reduziram a estabilidade dos glóbulos de gordura (aumento da desestabilização da gordura) e, portanto, aumentou os raios de crescimento dos cristais de gelo.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para melhor eficiência, a fortificação de cloreto de cálcio em sorvetes requer modificações nas formulações. A seleção de sais para a fortificação é crítica. Caso sais de cálcio solúvel sejam usados, o cálcio iônico pode ser formado como foi observado neste trabalho. Modificações nas formulações sugeridas como, por exemplo, a inclusão de íons citrato, fosfato, EDTA ou outro agente seqüestrante poderiam modificar os raios de equilíbrio salino do cálcio micelar/não micelar, causando problemas parecidos. Modificações nos *blends* (estabilizantes ou emulsificantes) ou a incorporação de proteínas funcionais, que estabilizariam os glóbulos de gordura na mistura através de ótimos valores de coalescência devem ser realizadas. A adição de sais insolúveis de cálcio, desde que sua adição não interfira nas propriedades textuométricas e possuam uma boa biodisponibilidade seria alternativa.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGBOOLA, S.; DALGLEISH, D.G.. Kinetics of the calcium-induced instability of oil-water emulsions: Studies under quiescent and shearing conditions. **Food Science Technology**, London, v. 29, n. 5-6, p. 425-432, 1996.

AGUILERA, J.M.; STANLEY, D.W. **Microstructural principles of food processing & engineering**. London: Elsevier Applied Science, 1990. 343p.

ANTIPOVA, A.S.; DICKINSON, E.; MURRAY, B.S.; SEMENOVA, M. G. One the effect of calcium ions on the sticking behaviour of casein-coated particles in shear flow. **Colloids and Surfaces B- Biointerfaces**, Amsterdam, v. 27, n.2-3, p.123-131, Feb. 2003.

AUGUSTIN, M. A.; WILLIAMS, R.P.W. Technological aspects of calcium fortification of milk and dairy products. **Food Australia**, Waterloo, v.54, n.4, 131-133, Apr. 2002.

BARFOD, N. The emulsifier effect. **Dairy Industries International**, London, v.66, n.1, p.32-33, 2001.

BERGER, K.G. Ice cream. In: FRIBERG, S. E.; LARSSON, K. **Food Emulsions**. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 1997. p..413-490.

BOLLIGER, S.; GOFF, H.D.; THARP, B.W. Correlation between colloidal properties of ice cream mix and ice cream. **International Dairy Journal**, Oxford, v.10, n. 4, p.303-309, 2000.

BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 379 de 26 de Abril de 1999. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, abr. 1999.

CAILLET, A.; COGNE, C.; ANDRIEU, J.; LAURENT, P.; RIVOIRE, A. Characterization of ice cream structure by direct optical microscopy. Influence of freezing parameters. **Food Science and Technology**, San Diego, v.36, n. 6, p. 743-749, 2003.

CALDWELL, K. B.; GOFF, H.D.; STANLEY, D.W. A low - temperature scanning electron microscopy study of ice cream. I. Techniques and general microstructure. **Food Structure**, Chicago, v.11, n.1, p.1-9, 1992a.

CALDWELL, K. B.; GOFF, H.D.; STANLEY, D.W. A low - temperature scanning electron microscopy study of ice cream. II. Influence of selected ingredients and processes. **Food Structure**, Chicago, v.11, n1, p.11-23, 1992b.

COSTA, F. F. **Effect of additives on crystallization of ice cream**. 2006. Dissertation (Master in Food Science) - Federal University of Lavras, Lavras.

COSTA, F. F.; RESENDE, J. V.; ABREU, L. R.; GOFF, H. D. Effect of calcium chloride addition on ice cream structure and quality. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.91, n.6, p.2165-2174, June 2008.

DALGLEISH, D. G.; MORRIS, E.R. Interactions between carrageenans and casein micelles: electrophoretic and hydrodynamic properties of the particles. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.2, n. 3, p.311-320, 1988.

DAUPHAS, S.; AMESTOY, A.; LLAMAS, G.; ANTON, M.; RIAUBLANC, A. Modification of the interactions between β -casein stabilized oil droplets with calcium addition and temperature changing. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.22, n.2, p.231-238, Mar. 2008.

DE KRUIF, C. G.; HOLT, C. Casein micelle structure, functions and interactions. In: FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H. (Ed.). **“Advanced Dairy Chemistry: 1. Proteins**. 3rd ed. New York: Kluwer Academic, 2003. p. 233-276.

DICKINSON, E.; SEMENOVA, M.G.; BELYAKOVA, L. E.; ANTIPOVA, A. S. Analyses of light scattering data on the calcium ion sensitive of caseinate solution thermodynamics: Relationship to emulsions flocculation. **Journal of Colloid and Interface Science, San Diego**, v.239, n.1, p.87-97, 2001.

FENNEMA, O.R. Instability of nonequilibrium states of water in frozen foods. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.11, n.2, p.152-169, maio/ago. 1991.

FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos**. 2. ed. Tradução de Pedro Roncales Rabinal et al. Zaragoza: Acribia, 1993.

FERREIRA, D.F. **SISVAR - Sistema de análise de variância para dados balanceados**: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos, versão 4.3. Lavras: UFLA, 1999.

FLINT, E. **Princípios de cristalografia**. Moscou: Paz, 1966. 243p.

FLORES, A. A.; GOFF, H. D. Ice crystal size distributions in dynamically frozen model solutions and ice cream as affected by stabilizers. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.82, n.7, p.1399-1407, July 1999.

FOX, P. F. and P. L. H. MCSWEENEY. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Thomson Science, New York. 1998.

FOX, P. F.; GUINEEE, T.P.; COGAN, T.M.; MCSWEENEY, P.L.H. **Fundamentals of Cheese Science**. Gaithersburg: Aspen, 2000. p. 128-129, 196-200. 2000.

GARSID, J. General principles of crystallization. **Food Structure and Behaviour**. [S.l.]: Academic, 1987. p.35-65.

GOFF, H.D.; KINSELLA, J.E.; JORDAN, W.K. Influence of various milk protein isolates on ice cream emulsion stability. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.72, n.2, p.385-397, Feb. 1989.

GOFF, H.D. Low-temperature stability and the glassy state in frozen foods. **Food Research International**, Ontario, v.25, n.4, p.317-325, 1992.

GOFF, H. D. Colloidal aspects of ice cream. **International Dairy Journal**, Oxford, v.7, n.6-7, p.363-373, June/July 1997.

GOFF, H. D. Ice cream. In: FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H. (Ed.). **Advanced Dairy Chemistry: proteins**. 3rd ed. New York: Kluwer, 2003. v. 1, p.1063-1085.

GOFF, H.D.; VERESPEJ, E.; SMITH, A.K. A study of fat and air structures in ice cream. **International Dairy Journal**, Oxford, v.9, n.11, p. 817-829, 1999.

GUEGOV, Y. Phase Transmissions of water in some products of plant origin at low and superlow temperatures. **Advances in Food Research**, New York, v.27, p.297-361, 1981.

HARTEL, R.W. Ice crystallization during the manufacture of ice cream. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v.7, n. 10, p.315-320, Oct. 1996.

HORNE, D. S. Casein structure, self assembly and gelation. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v.7, n.5-6, p. 456-461, Nov. 2002.

HOSSAIN, K. S.; MIYANAGA, K.; MAEDA, H.; NEMOTO. Sol-gel transition behavior of pure iota-carrageenan in both salt-free and added salt states. **Biomacromolecules**, Washington, v.2, p.442-449, 2001.

JANCIC, S.J.; GROOTSCHOLTEN, P.A.M. Nucleation: mechanisms and sources of nuclei in industrial crystallizers. In: _____. **Industrial crystallization**. Delft: Delft University, 1984. Cap. 2, p.15-37.

LITTLE, E. M.; HOLT, C. An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein phosphopeptides. **European Biophysics Journal**, New York, v.33, n.5, p. 435-447, Aug. 2004.

LIN, M.-J.; M. J. LEWIS, M.J.; GRANDISON, A.S. Measurement of ionic calcium in milk. **International Journal Dairy Technology**, Oxford, v.59, n.3, p.192-199, Aug. 2006.

MACCABE, W.L.; SMITH, J.C.; HARRIOT, P. **Unit operations of chemical engineering**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 1993. 1130p.

MCLEMENTS, D. J. **Food Emulsions: principles, practice and techniques**. London: CRC, 1999. 378 p.

MARSHALL, R. T.; GOFF, H.D.; HARTEL, R.W. **Ice Cream**. 6th ed. New York: Kluwer Academic, 2003.

NICKERSON, M. T.; PAULSON, A.T.; HALLET, F.R. Dilute solution properties of κ -carrageenan polysaccharides: effect of potassium and calcium ions on chain conformation. **Carbohydrates Polymers**, Oxford, v.58, n.1, p. 25-33, Oct. 2004.

O'CONNELL, J. E.; GRINBERG, C. G.; DE KRUIF, C. D. Association behavior of β -casein. **Journal of Colloids and Interface Science** Amsterdam, v. 258, n.1, p.33-39, 2003.

PRETSWICH, G. D.; MARECAK, D. M.; MARECAK, J. F.; VERCRUYSSSE, K. P.; ZIEBELL, M. R. Controlled chemical modification of hyaluronic acid. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v.53, n.1-3, p. 93-103, Apr. 1998.

REES, D.A.I.; STEELE, W.; WILLIAMSON, F.B. Conformational analysis of polysaccharides. III. The relation between stereochemistry and properties of some polysaccharides sulfates (I). **Journal of Polymer Science**; New York, Part C, v.28, p.261-276, 1969.

REGAND, A.; GOFF, H.D. Effect of biopolymers on structure and ice recrystallization in dynamically frozen ice cream model systems. **Journal Dairy Science, Champaign**, v.85, n.11, p.2722-2732, Nov. 2002.

REGAND, A.; GOFF, H.D. Ice recrystallization inhibition in ice cream as affected by ice structuring proteins from winter wheat grass. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.89, n.1, p.49-57, Jan. 2006.

ROLLEMA, H. S. Casein association and micelle formation. In: **FOX, P.F. (Ed.). Advanced Dairy Chemistry I: proteins**. London: Elsevier Applied Science, 1992. p. 111-140.

RUSSELL, A. B., CHENEY, P.E.; WANTLING, S.D. Influence of freezing conditions on ice crystallisation in ice cream. **Journal Food Engineering, Oxford**, v.39, n.2, p.179-191, Feb. 1999.

SCHORSCH, C.; JONES, M.G.; NORTON, I.T. Phase behaviour of pure micellar casein/ κ -carrageenan systems in milk salt ultrafiltrate. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.14, n.4, p.347-358, July 2000.

SINGH, G.; ARORA, S.; SHARMA, G.S.; SINDHU, J.S.; KANSAL, V.K.; SANGWAN, R.B. Heat stability and calcium bioavailability of calcium-fortified milk. **Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 40, p.625-631, 2007.

SMITH, A. K.; GOFF, H.D.; SUN, B.D. Freeze-substitution and low-temperature embedding of dairy products for transmission electron microscopy. **Journal Microscopy**, Oxford, v.213, p. 63-69, 2004.

SPAGNUOLO, P. A.; DALGLEISH, D.G.; GOFF, H.D.; MORRIS, E.R. Kappa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers. **Food Hydrocolloids, Oxford**, v.19, n.3, p.371-377, May 2005.

TSIOULPAS, A.; LEWIS, M.J.; GRANDISON, A.S. Effect of minerals on casein micelle stability of cow's milk. **Journal Dairy Research**, New York, v.74, n.2, p.167-173, May 2007.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Continuing Survey of Food Intakes by Individuals, 2000-2002**. Washington, DC: National Health and Nutrition Examination Survey, 2005.

VEGA, C.; DALGLEISH, D.G.; GOFF, H.D. Effect of κ -carrageenan addition to dairy emulsions containing sodium caseinate and locust bean. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.19, n.2, p.187-195, Mar. 2005.

VYAS, H. K.; TONG, P.S. Impact of source and level of calcium fortification on the heat stability of reconstituted skim milk powder. **Journal Dairy Science, Champaign**, v.87, n.5, p.1177-1180, Mar. 2004.

WEAVER, C. M. Calcium in food fortification strategies. **International Dairy Journal**, v.8, n.5-6, p. 443-449, May/June 1998.

WEAVER, C. M.; HEANEY, R.P. **Calcium in Human Health**. Totowa: Humana, 2006. p. 137.

WILLIAMS, R. P. W.; D'ATH, L.; AUGUSTIN, M.A. Production of calcium-fortified milk powders using soluble calcium salts. **Lait**, Paris, v.85, n.4-5, p.369-381, July/Oct. 2005.

WONG, D. W. S.; CAMARAND, W. M.; PAVLATH, A. E. Structure and functionalities of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.36, n.8, p.807-844, 1996.

YE, A.Q. SINGH, H. Interfacial composition and stability of sodium caseinate emulsions as influenced by calcium ions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.15, p.195-207, Mar. 2001.

ZHANG, Z.; GOFF, H.D. Protein distribution at air interfaces in dairy foams and ice cream as affected by casein dissociation and emulsifiers. **International Dairy Journal**, Oxford, v.14, n.7, p.647-657, July 2004.