



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

WELLINGTON DE FREITAS CASTRO

**EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SORO DE QUEIJO NA PRODUÇÃO E
QUALIDADE SENSORIAL DE BEBIDAS LÁCTEAS PROBIÓTICAS**

**TESE DE DOUTORADO
APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria
ORIENTADOR

Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz
CO-ORIENTADOR

Este exemplar corresponde à versão final da tese
defendida por Wellington de Freitas Castro,
aprovada pela comissão julgadora em 21/05/2012 e orientada
pelo Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

C279e Castro, Wellington de Freitas, 1980-
Efeito da concentração de soro de queijo na produção
e qualidade sensorial de bebidas lácteas probióticas /
Wellington de Freitas Castro. -- Campinas, SP: [s.n], 2012.

Orientador: José de Assis Fonseca Faria.
Co-orientador: Adriano Gomes da Cruz.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Soro de queijo. 2. Bebidas fermentadas. 3.
Probióticos. 4. Análise descritiva quantitativa. 5. Testes
sensoriais. I. Faria, José de Assis Fonseca. II. Cruz,
Adriano Gomes da. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês:

Effect of whey level in the production and sensory quality of probiotic dairy
drinks

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Whey

Fermented beverages

Probiotics

Quantitative descriptive analysis

Sensory tests

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Carlos Alberto Rodrigues Anjos

Flávio Luís Schmidt

José de Assis Fonseca Faria

Maricê Nogueira de Oliveira

Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá

Data da defesa: 21/05/2012

Programa de Pós Graduação: Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. JOSÉ DE ASSIS FONSECA FARIA
Orientador – DTA / FEA/ UNICAMP

Prof. Dr. CARLOS ALBERTO RODRIGUES ANJOS
Membro – DTA / FEA/ UNICAMP

Prof. Dr. CARLOS AUGUSTO FERNANDES DE OLIVEIRA
Suplente – FZEA / USP

Prof. Dr. FLÁVIO LUIS SCHMIDT
Membro – DTA / FEA/ UNICAMP

Prof^a. Dra. HELENA MARIA ANDRÉ BOLINI
Suplente – DEPAN / FEA/ UNICAMP

Prof. Dr. MARCELO CRISTIANINI
Suplente – DTA / FEA/ UNICAMP

Prof^a. Dra. MARICÊ NOGUEIRA DE OLIVEIRA
Membro - FCF/ USP

Dra. PATRÍCIA BLUMER ZACARCHENCO RODRIGUES DE SÁ
Membro – TECNOLAT / ITAL

Dedico esta tese

Aos meus pais, Ilda e Antônio, que deram suas vidas por nós filhos, pois além dos estudos, nos deram amor e atenção. Obrigado por me ensinarem a ser um homem de bem. E a Marcília, minha esposa e incentivadora. Um beijo, amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pela graça de cada dia, pela minha família, pelos amigos, pela inteligência e pelo alimento, matriz da minha formação.

A Nossa Senhora de Fátima, minha mãe do Céu, obrigado por trazer Jesus até nós. Rogai por nós!

Aos meus queridos pais, Ilda e Antônio, e minha irmã Jucele, que tanto alegam minha vida com a companhia de vocês. Obrigado por me darem tanto apoio e carinho.

A minha esposa Marcília, a quem escolhi para ter uma família, sempre companheira, cúmplice e conselheira, e muito paciente, iluminando minha vida. Te amo.

Aos meus primos: Reginaldo e Judith Rafaelle, Luciana, Conceição, Flávia, Luciano, Pedro Augusto, Vítor Phillippe e Matheus. Com alguns de vocês cresci junto, os outros eu tive a alegria de carregar no colo. E o mais importante disso tudo é que jamais me esqueço de vocês.

Aos meus padrinhos: Gege (*in memorian*), Titão, Kiko e Guigui, pelas orações diárias que sempre me levantam nos momentos de queda.

Aos meus avós: Maria (*in memorian*) e Pedro de Freitas, pessoas de incalculável bondade e sabedoria.

Aos meus sobrinhos: Ingrid, Vitor e Manuela. Casei-me com a tia de vocês, e ganhei três presentes maravilhosos.

A minha sogra Marta e ao meu sogro José, obrigado por me tratarem como um filho.

Ao amigo e orientador, professor Assis, pelos ensinamentos e humildade. Obrigado por confiar em mim, até nos momentos em que errei.

A Kimie Alice, técnica do laboratório que com seu jeito maternal fez das ocasiões de *stress*, situações engraçadas e de paz.

Ao professor Carlos Anjos, obrigado pelos ensinamentos, pelas oportunidades no PED, amizade e convivência. Valeu!

A professora Helena Bolini, pela ajuda e disponibilidade. Uma docente que sabe colocar o tempo e o conhecimento à disposição de todos. Obrigado pela amizade e pelas vezes que me atendeu pacientemente.

Ao pessoal do laboratório de Análise Sensorial - DEPAN, Alessandra, Lia e Rafael, pelos ensinamentos, colaboração e amizade.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Embalagens com quem tive o privilégio de conviver nos últimos anos: Adriano, Alexandre, Cláudio, Clívia, Eliene, Edilma, Eduardo, Laura e Simone. Sucesso pra todos vocês e obrigado pela ajuda e paciência. Sentirei saudades. E quando for possível vamos “quebrar tudo” na casa do professor Assis.

As estagiárias Mariana Bisinotto e Gabriela Lemos, por me auxiliarem com boa vontade. Com vocês ganhei tempo, espero que tenham aprendido algo comigo, eu aprendi com vocês. Sejam felizes!

A professora Juliana Pallone por permitir que as análises de composição centesimal fossem realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos, e a aluna Suélen Peliciari por contribuir tão gentilmente.

A doutora Gislaine Ghiselli e ao professor Francisco Maugeri por contribuírem na realização da análise de ácidos orgânicos.

A colega Daniele Rodrigues e a professora Helena Godoy por contribuírem na realização da análise de compostos voláteis.

A colega Mariana Villas Boas pela contribuição na análise de eletroforese.

A colega Lizielle Maria Ricardo Guerreiro pela colaboração nas análises de reologia.

As estagiárias Carolina Freiria e Tati Sakamoto que nos ajudaram em vários projetos com eficiência e boa vontade. Foi muito bom conviver com vocês.

A Tania Mara Shibata, pela amizade e por todas as vezes que nos acolheu em Jarinú para ótimos momentos de descontração. *Fugere urbem* em boas companhias. Obrigado por tudo!

A Diana e Renata, passar no laboratório de vocês logo pela manhã foi muito valioso, obrigado pelos conselhos e por me ouvirem. Não vou me esquecer de tudo o que me ensinaram. Deus cuide das famílias de vocês.

A Dirce Kabuki e ao professor Arnaldo pela convivência agradável e por disponibilizarem o Laboratório de Higiene.

Aos amigos de todos os momentos: Anderson, Arquilho, Edsom + Andreia, Paulo + Bibiana. Quando tiver churrasco nos avisem! Sinto saudades de vocês.

Aos amigos de Barretos: Nilton, Maria José, Cecília e Ana Cláudia. Com vocês sentimos Minas “pertim da gente”, na boa conversa, na culinária, no abraço e no desabafo. Deus retribua e abençoe vocês.

Aos amigos da música da paróquia São Luís: Pedro e Juliana, Osvaldim, Betinho, Milene e Lívia. Conhecer vocês foi muito bom. Sempre vivendo a alegria na simplicidade! Forte abraço.

Aos amigos Hélio, Deise e Juliana pelo convívio tão agradável desde nossa chegada a Barretos. Vocês são demais!

Aos amigos do IFSP, Adriana e Tiago, conhecê-los foi muito bom, obrigado pelas boas conversas e pelos momentos de descontração quando tudo parecia difícil.

Aos meus assessores que gentilmente contribuíram nas sessões de análise sensorial: Alberto, Ana Tsu, Ana Carol, Bruna, Carol Albuquerque, Carol Lugnani, Cecília, Cinthia, Clarice, Clívia, Diogo, Erick, Eliene, Fábio Takahashi, Gláucia, Karina, Laura, Lígia, Lucas, Marcília, Rodrigo, Simone, Thales, Thomaz e Veridiana. Desejo sucesso em suas pesquisas, obrigado por toda boa vontade.

Aos membros da banca: Carlos Anjos, Carlos Augusto, Flávio, Helena, Maricê, Marcelo e Patrícia, por todas as contribuições na lapidação desse trabalho.

Aos funcionários do DTA, Tânia, Marlene e Léo pela amizade e disponibilidade em ajudar sempre. Ao Adalto e Leonel pelo companheirismo na planta piloto.

Aos técnicos dos laboratórios: Alessandra (Cereais), Ana Kon (Frutas), Ana Maria (Ensino), Bete (Leite), José Roberto (Carnes) e Rosana (Óleos) pelo convívio, e por me ajudarem com boa vontade.

As senhoras da faxina do DTA, dona Vilani e dona Hilda além das demais, que mesmo anonimamente limpavam com zelo o DTA por onde andei esses anos.

Aos funcionários da secretaria geral de pós-graduação: Cosme e Marcão, parabéns pela eficiência e obrigado pela disponibilidade.

A equipe do Centro de Informática: Daniel, Marçal, Raquel, Ricardo, Samuel e Wagner, por todas as vezes que me ajudaram a resolver os problemas do mundo virtual.

Aos funcionários: Bianca, Cláudia, Geraldo, Graça, José Carlos, Kreusa, Luciana, Maria do Carmo, Maria dos Remédios e Sueli por tornarem a biblioteca um lugar muito agradável.

As professoras Valéria Paula Rodrigues Minim, orientadora de iniciação científica, e Neura Bragagnolo, orientadora do mestrado. Obrigado por terem contribuído na minha formação, possibilitando que eu chegasse até aqui.

A Duas Rodas Industrial e a Döhler por doarem os preparados de frutas, e a Danisco pela doação das culturas de micro-organismos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Docente de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão (FAEPEX – UNICAMP) pelo financiamento do projeto.

Agradeço a todo cidadão brasileiro que paga seus impostos, que vota com consciência mesmo com poucas opções, que vive de esperança e com pouco dinheiro. Obrigado por financiar o ensino público no Brasil.

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, a todos que torceram e rezaram por mim. E mesmo que seus nomes não estejam aqui, recebam minha gratidão e meu reconhecimento.

Deus nos abençoe!

Deus, pastor dos homens

Salmo 23

O Senhor é o meu pastor, nada me faltará.
Em verdes prados ele me faz repousar.
Conduz-me junto às águas refrescantes,
restaura as forças de minha alma.
Pelos caminhos retos ele me leva,
por amor do seu nome.
Ainda que eu atravessasse o vale escuro,
nada temerei, pois estás comigo.
Vosso bordão e vosso báculo
são o meu amparo.
Preparais para mim a mesa
à vista de meus inimigos.
Derramais o perfume sobre minha cabeça,
e transborda minha taça.
A vossa bondade e misericórdia hão de seguir-me
por todos os dias da minha vida.
E habitarei na casa do Senhor
por longos dias.

HOJE É TEMPO DE SER FELIZ!

A vida é fruto da decisão de cada momento. Talvez seja por isso, que a ideia de plantio seja tão reveladora sobre a arte de viver.

Viver é plantar. É atitude de constante semeadura, de deixar cair na terra de nossa existência as mais diversas formas de sementes.

Cada escolha, por menor que seja, é uma forma de semente que lançamos sobre o canteiro que somos. Um dia, tudo o que agora silenciosamente plantamos, ou deixamos plantar em nós, será plantação que poderá ser vista de longe...

Para cada dia, o seu empenho. A sabedoria bíblica nos confirma isso, quando nos diz que "debaixo do céu há um tempo para cada coisa!"

Hoje, neste tempo que é seu, o futuro está sendo plantado. As escolhas que você procura, os amigos que você cultiva, as leituras que você faz, os valores que você abraça, os amores que você ama, tudo será determinante para a colheita futura.

Felicidade talvez seja isso: alegria de recolher da terra que somos, frutos que sejam agradáveis aos olhos!

Infelicidade, talvez seja o contrário.

O que não podemos perder de vista é que a vida não é real fora do cultivo. Sempre é tempo de lançar sementes... Sempre é tempo de recolher frutos. Tudo ao mesmo tempo. Sementes de ontem, frutos de hoje, Sementes de hoje, frutos de amanhã!

Por isso, não perca de vista o que você anda escolhendo para deixar cair na sua terra. Cuidado com os semeadores que não lhe amam. Eles têm o poder de estragar o resultado de muitas coisas.

Cuidado com os semeadores que você não conhece. Há muita maldade escondida em sorrisos sedutores...

Cuidado com aqueles que deixam cair qualquer coisa sobre você, afinal, você merece muito mais que qualquer coisa.

Cuidado com os amores passageiros... eles costumam deixar marcas dolorosas que não passam...

Cuidado com os invasores do seu corpo... eles não costumam voltar para ajudar a consertar a desordem...

Cuidado com os olhares de quem não sabe lhe amar... eles costumam lhe fazer esquecer que você vale à pena...

Cuidado com as palavras mentirosas que esparramam por aí... elas costumam estragar o nosso referencial da verdade...

Cuidado com as vozes que insistem em lhe recordar os seus defeitos... elas costumam prejudicar a sua visão sobre si mesmo.

Não tenha medo de se olhar no espelho. É nessa cara safada que você tem, que Deus resolveu expressar mais uma vez, o amor que Ele tem pelo mundo.

Não desanime de você, ainda que a colheita de hoje não seja muito feliz.

Não coloque um ponto final nas suas esperanças. Ainda há muito o que fazer, ainda há muito o que plantar, e o que amar nessa vida.

Ao invés de ficar parado no que você fez de errado, olhe para frente, e veja o que ainda pode ser feito...

A vida ainda não terminou. E já dizia o poeta "que os sonhos não envelhecem..."

Vai em frente. Sorriso no rosto e firmeza nas decisões.

Deus resolveu reformar o mundo, e escolheu o seu coração para iniciar a reforma.

Isso prova que Ele ainda acredita em você. E se Ele ainda acredita, quem sou eu pra duvidar... (?)

Pe. Fábio José de Melo Silva

SUMÁRIO

RESUMO	xvii
ABSTRACT.....	xviii
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	5
Resumo	6
1 Soro de queijo	6
2 Bebidas lácteas	8
3 Produtos lácteos probióticos	13
4 Benefícios à saúde.....	19
5 Considerações finais	24
6 Referências bibliográficas	25
CAPÍTULO 2	33
Resumo	34
Introdução.....	35
Material e métodos	36
Processamentos das formulações de bebidas probióticas	36
Análises de pH e microbiológicas	37
pH	37
Contagem de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	38
Análise Sensorial.....	38
Modelagem Matemática	39
Aceitação Global Média.....	39
Mínima Diferença Significativa	39
<i>Survival Analysis</i>	40
Análise Estatística	41
Resultados e discussão.....	41
Valores de pH e contagem de micro-organismos	41
Aceitação dos consumidores	42
Aceitação Global Média.....	43
Mínima Diferença Significativa	44
Análise de Sobrevida	44

Conclusão.....	47
Referências.....	48
CAPÍTULO 3.....	52
Resumo.....	53
Introdução.....	53
Material e métodos.....	54
Processamento das bebidas lácteas probióticas.....	54
Análises físico-químicas e microbiológicas.....	55
Enumeração de micro-organismos.....	55
Determinação do pH.....	55
Atividade proteolítica.....	55
Quantificação de ácidos orgânicos e açúcares.....	56
Preparo da amostra.....	56
Método cromatográfico.....	56
Quantificação de compostos voláteis.....	57
Preparo da amostra.....	57
Método cromatográfico.....	57
Resultados e Discussão.....	58
Conclusão.....	62
Referências.....	62
CAPÍTULO 4.....	66
Introdução.....	67
Material e métodos.....	69
Elaboração das bebidas lácteas probióticas.....	69
Bebidas lácteas comerciais.....	70
Enumeração de micro-organismos.....	70
Análises físico-químicas.....	71
Acidez titulável e pH.....	71
Atividade proteolítica.....	71
Viscosidade.....	72
Análises de composição centesimal.....	72
Teor de gordura.....	72

Teor de proteínas	72
Extrato seco total (sólidos totais)	72
Cinzas	72
Quantificação de ácidos orgânicos e açúcares	73
Preparo da amostra	73
Método cromatográfico.....	73
Quantificação de compostos voláteis	74
Preparo da amostra	74
Método cromatográfico.....	74
Frações proteicas com SDS-PAGE	74
Análises estatísticas.....	75
Resultados e discussão.....	75
Conclusão.....	85
Referências.....	86
CAPÍTULO 5	91
Resumo	92
1 Introdução	93
2 Material e métodos.....	95
2.1 Processamentos das bebidas lácteas	95
2.2 Bebidas lácteas comerciais	96
2.3 Testes sensoriais	97
2.4 Metodologias descritivas	97
2.4.1 Perfil livre.....	98
2.4.2 Análise descritiva quantitativa (ADQ).....	98
2.5 Testes afetivos.....	99
2.5.1 Teste de aceitação	99
2.5.2 Escala do ideal.....	100
2.5.3 Mapa projetivo.....	100
3 Resultados e discussão	101
3.1 Perfil livre	101
3.2 Análise descritiva quantitativa.....	103
3.3 Mapa projetivo	108

3.4 Escala do ideal (<i>Just About Right</i>)	110
3.5 Teste de aceitação	112
4 Conclusões	123
5 Referências bibliográficas	125
CONCLUSÕES GERAIS	128
ANEXOS.....	130

RESUMO

A demanda por alimentos probióticos tem impulsionado o desenvolvimento de novos produtos formulados. Aproveitando tal cenário, as indústrias de alimentos vêm se dedicando basicamente aos lácteos, que se mostram ser ótimos carreadores de micro-organismos probióticos. O grande volume de soro proveniente das indústrias de queijos permite a elaboração de bebidas lácteas, visando o aproveitamento de subprodutos para a alimentação humana, devido ao seu elevado potencial nutricional. Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito dos níveis de soro de queijo nos parâmetros de qualidade e aceitação sensorial de bebidas lácteas probióticas, em comparação a produtos comerciais não probióticos. Modelos matemáticos como Análise de Sobrevida, Mínima Diferença Significativa e Aceitação Global Média foram utilizados para ajustar os níveis de soro de queijo mais aceitáveis em formulações de bebidas lácteas. Métodos sensoriais, como Mapa Projetivo, Análise Descritiva Quantitativa e Perfil Livre foram aplicados na avaliação das bebidas formuladas. A elaboração de bebidas lácteas probióticas provou ser uma boa alternativa para as indústrias de laticínios no aproveitamento do soro proveniente da fabricação de queijos, possibilitando assim redução dos custos de produção, além de propiciar novos produtos carreadores de micro-organismos benéficos à saúde.

Palavras chaves: soro de queijo, bebidas fermentadas, probióticos, Análise Descritiva Quantitativa, testes sensoriais.

ABSTRACT

The demand for probiotic foods has driven the development of new formulations. Taking advantage of such scenario, the food industry has been largely devoted to dairy, which proved to be excellent vehicles for probiotic microorganisms. The large volume of whey from the cheese industry has enabled the development of dairy drinks, considering the use of products for human food with high nutritional potential. This study evaluated the effect of whey levels in the quality parameters and sensory acceptability of probiotic milk drinks, as compared to commercial non probiotic products. Mathematical models as Survival Analysis, Minimal Significant Difference, and Mean Global Acceptance were used to adjust the whey levels in the most acceptable formulated dairy beverages. Sensory methods as Projective Mapping, Quantitative Descriptive Analysis, and Free Choice were applied in the evaluation of dairy beverages. The development of probiotic dairy drinks proved to be a good alternative for the dairy industry to take advantage of the whey from the cheese-making, by reducing production costs and providing probiotic foods with recognized human health benefits.

Keywords: whey, fermented beverages, probiotics, Quantitative Descriptive Analysis, Sensory tests.

INTRODUÇÃO GERAL

O soro é o principal subproduto da indústria de queijo e caseína, e possui alto poder poluidor devido à elevada concentração de compostos orgânicos solúveis na fração aquosa. Estima-se que durante a produção de queijo, utilizando-se 10L de leite, são obtidos de 6 a 9L de soro, dependendo do tipo de queijo (ALMEIDA; TAMINE; OLIVEIRA, 2008). A fração protéica do soro é composta por aproximadamente 50% de β -lactoglobulina, 20% α -lactoalbumina, 15% glicomacropéptido e 15% de peptídeos e proteínas minoritárias (imunoglobulinas, lactoferrinas, latoperoxidase, albuminas séricas, lisozima e fatores de crescimento) (SMITHERS et al., 1996; SMITHERS, 2008). O soro possui também vitaminas como tiamina, riboflavina, ácido pantotênico, B₆ e B₁₂, além de alguns minerais (LAGRANGE; DALLAS, 1997).

Todas as proteínas do soro possuem aminoácidos de cadeia ramificada: L- isoleucina, L-leucina e L- valina, essenciais para o crescimento das células musculares, pelo aumento de síntese protéica. Os glicomacropéptídeos foram identificados como compostos que apresentam atividade prebiótica e pode também estimular a colecistocinina (hormônio gastrointestinal) a partir de células intestinais e inibição da ligação de toxinas (HÁ; ZEMEL, 2003). Quando a lactose é hidrolisada enzimaticamente, são formados os galactooligossacarídeos (GOS) pela reação de transgalactosilação. Apesar dos GOS não serem digeridos pelos humanos, são facilmente utilizados pelas bifidobactérias, sendo reconhecidos como alimento de atividade prebiótica (WALZEM; DILLARD; GERMAN, 2002).

Os alimentos funcionais representam uma das mais interessantes áreas de pesquisa e inovação na indústria de alimentos (ANNUNZIATA; VECCHIO, 2011, SIRÒ et al., 2008; JONES; JEW, 2007). Define-se como alimento funcional aquele capaz de desempenhar funções nutricionais adequadas no corpo e melhorar o estado de saúde e bem-estar e/ou reduzir o risco de ocorrência de doenças (DIPLOCK et al., 1999). Além dos prebióticos, existe outra classe de alimentos funcionais, os probióticos, que são definidos como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde

do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001). O iogurte tem sido reconhecido como um alimento recomendável para transportar micro-organismos probióticos, dada que a maioria dos consumidores considera o iogurte como um alimento saudável e capaz de garantir a viabilidade dos probióticos no organismo humano (HAMANN; MARTH, 1983, LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001). Por ter sua imagem associada ao iogurte, com relação às características próximas de acidez e consistência, as bebidas lácteas têm apresentado grande aceitabilidade pelos brasileiros, resultando no aumento do consumo desses alimentos (ACHANTA; ARYANA; BOENEKE, 2007). Diversos estudos têm demonstrado o potencial das bebidas lácteas como alimento probiótico, devido à sua capacidade em carrear tais micro-organismos pelo trato gastrointestinal, e como alimento prebiótico, em decorrência das propriedades funcionais do soro de queijo.

A legislação brasileira para bebidas lácteas ainda é pouco específica quanto ao nível máximo de soro permitido nas formulações, sendo especificado um mínimo de 51% (m/m) de base láctea (BRASIL, 2005). O presente estudo aplicou modelos matemáticos aos dados obtidos de testes sensoriais para ajustar o nível de soro de queijo em bebidas lácteas probióticas. E a qualidade sensorial das bebidas lácteas probióticas e de produtos comerciais similares foi avaliada por testes afetivos e descritivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHANTA, K.; ARYANA, K. J.; BOENEKE, C. A. Fat free plain set yogurts fortified with various minerals. **LWT – Food Science and Technology**, v. 40, n. 3, p. 424-429, 2007.

ALMEIDA, K.E.; TAMINE, A.Y.; OLIVEIRA, M.N. Acidification rates of probiotic bacteria in Minas frescal cheese whey. **LWT- Food Science and Technology**, v.41, n. 2, p. 311-316, 2008.

ANNUNZIATA, A.; VECCHIO, R. Functional foods development in European market: A consumer perspective. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 3, p. 223-228, 2011.

BRASIL. Instrução Normativa N.º 16, de 23 de agosto de 2005. Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea. **Ministério da Agricultura e do Abastecimento**.

DIPLOCK, A. T.; AGGETT, P. J.; ASHWELL, M.; BORNET, F.; FERN, E. B.; ROBERFROID, M. B. Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document. **British Journal of Nutrition**, v. 81, p. S1- S27, 1999.

FAO/ WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001.

HA, E.; ZEMEL, M.B. Review: Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, n.5, p. 251-258. 2003.

HAMANN, W. T.; MARTH, E.H. Survival of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in commercial and experimental yogurts. **Journal of Food Protection**, v. 47, n. 10, p. 781-786, 1983.

JONES, P. J.; JEW, S. Functional food development: Concept to reality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 7, p. 387-390, 2007.

LAGRANGE, V.; DALLAS, P. Inovação de produto com concentrados de proteína de soro de leite dos USA. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, 17-21, 1997.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 1-2, p. 1-17, 2001.

SIRÒ, I.; KAPOLNA, E.; KAPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance – A review. **Appetite**, v. 51, p. 456-467, 2008.

SMITHERS, G.W. Whey and whey proteins – From ‘gutter-to-gold’. **International Dairy Journal**, n. 18, v. 7, p. 695-704, 2008.

SMITHERS, G.W.; BALLARD, F. J.; COPELAND, A. D.; DE SILVA, K. J.; DIONYSIUS, D. A.; FRANCIS, G. L. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 8, p. 1454-1459, 1996.

WALZEM, R. L.; DILLARD, C. J.; GERMAN, J. B. Whey Components: Millennia of Evolution Create Functionalities for Mammalian Nutrition: What We Know and What We May Be Overlooking. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 42, n. 4, p. 353-375, 2002.

CAPÍTULO 1

BEBIDAS LÁCTEAS: ASPECTOS TECNOLÓGICOS E BENEFÍCIOS À SAÚDE

Resumo

O soro de queijo é gerado em grande volume pelas indústrias de laticínios, e, devido às mudanças na legislação ambiental e ao aumento das pesquisas que disponibilizaram dados acerca do seu valor nutricional, o mesmo passou a ser aproveitado em formulações alimentares. A utilização do soro para a formulação de bebidas lácteas tem sido a forma de aplicação direta para alimentação humana, sem a necessidade de transformá-lo após tratamento térmico. Para a fermentação de bebidas lácteas, os micro-organismos utilizados são os mesmos utilizados na produção de iogurte, conferindo a esses alimentos características sensoriais semelhantes, como acidez, aroma e viscosidade. Segundo estudos, o iogurte é uma boa matriz para veicular probióticos. Probióticos são micro-organismos capazes de conferir benefícios à saúde de quem os ingere. Devido à semelhança entre o iogurte e a bebida láctea fermentada, conclui-se que esta também seja um bom alimento carreador de probióticos, chegando a um alimento simbiótico devido às propriedades terapêuticas atribuídas a alguns peptídeos bioativos presentes no soro. Este capítulo discute os processos tecnológicos de produção de bebidas lácteas, fermentadas ou não, e os benefícios à saúde humana obtidos pelo consumo de alimentos simbióticos, contendo soro de queijo e probióticos.

1 Soro de queijo

Historicamente, existem relatos da utilização do soro na Idade Média como produto farmacêutico, bálsamo para queimaduras, porção para vitalidade e para queda de cabelo, mas raramente utilizado na alimentação humana (KOSIKOWSKI, 1979). Na época, os médicos utilizavam o soro para fins terapêuticos, enquanto que nos tempos atuais está presente numa variedade de produtos, suplementos esportivos (*WPC* - concentrado protéico de soro e *WPI* - isolado protéico de soro), barras nutritivas, bebidas, formulados infantis, produtos de panificação, lácteos, carnes e outros alimentos (NATIONAL DAIRY COUNCIL, 2008). O soro é um subproduto da indústria de queijos de coloração amarelo-esverdeada. Extraído durante a coagulação da caseína, quando por ação

enzimática ou ácida, a fração líquida é separada retendo 55% dos nutrientes presentes no leite, resultando em duas variedades de soro, ácido ($\text{pH} < 5$) e soro doce ($6 < \text{pH} < 7$). O soro ácido em geral possui mais cinzas e menor teor protéico que o soro doce e, devido ao gosto ácido e ao teor salino elevado, é mais limitado na alimentação humana (WEETAL et al., 1974; KOSIKOWSKI, 1979; MAWSON, 1994; SISO, 1996).

O soro líquido é constituído basicamente de água (93%), lactose (5%), proteínas (0,85%), minerais (0,53%) e gorduras (0,36%). As proteínas do soro são consideradas seguras, GRAS (“*Generally Recognised As Safe*”), para a aplicação em alimentos, apresentam alto valor biológico e superior ao de outras proteínas (ovo, soja e caseínas do leite), e elevado teor de aminoácidos sulfurados com função antioxidante (SINHA et al., 2007; SMITHERS, 2008).

A lactose é um carboidrato de baixo poder adoçante, naturalmente encontrado em soro de queijo, sendo o principal sólido constituinte em leite bovino (WATANABE et al., 2008) e o maior responsável pelo elevado poder poluidor do soro com grande demanda bioquímica e química de oxigênio, pois algumas bactérias utilizam a lactose para obtenção de energia, fazendo com que a população das mesmas aumentem em leitões d’água com conseqüente diminuição do oxigênio dissolvido (FARIZOGLUJ et al., 2004).

Quanto à composição protéica, as proteínas do soro possuem elevado valor biológico, devido a rápida absorção pelo organismo quando a proteína é ingerida. Em comparação a outras fontes protéicas, o soro é uma fonte rica ($>20\%$ m/m) em aminoácidos de cadeia ramificada como leucina, isoleucina e valina e em aminoácidos sulfurados como metionina e cisteína (SMITHERS, 2008). As principais proteínas do soro são a β -lactoglobulina e a α -lactoalbumina, duas proteínas globulares que representam aproximadamente 75% das proteínas do soro. Outros componentes minoritários estão presentes como o glicomacropéptido (em soro obtido por coagulação enzimática), albumina sérica, lactoferrina, imunoglobulinas, fosfolípidios, fatores bioativos e enzimas (SMITHERS et al., 1996).

Minerais como cálcio, magnésio, sódio, potássio e fósforo são majoritários em soro de queijo, além de zinco, ferro, cobre e manganês em menor quantidade (WONG; LACROIX; McDONOUGH, 1978). A presença de sais minerais no soro de queijo justifica a utilização do mesmo em bebidas isotônicas utilizadas por desportistas.

Devido ao reconhecido valor nutricional do soro e ao grande volume gerado pelas indústrias de queijos ou por razões (econômicas, ambientais, regionais) tem havido expressiva valorização tecnológica do soro e seus derivados (FARIZOGLUJ et al., 2004). O processamento de bebidas lácteas é atraente para as indústrias de laticínios. Visto a simplicidade do processo de fabricação, a possibilidade de utilização dos mesmos equipamentos para tratamento do leite, as excelentes propriedades funcionais das proteínas do soro e a redução dos gastos com tratamento de efluentes (GANDHI; PATEL, 1994; ALMEIDA; TAMINE; OLIVEIRA, 2008).

2 Bebidas lácteas

No Brasil, as bebidas lácteas (fermentadas e não fermentadas) surgiram como um produto alternativo ao leite e ao iogurte, com menor custo e características sensoriais muito próximas. Entretanto, ainda não possuem uma caracterização precisa (de CASTRO et al., 2009). Beecher et al. (2008) definiram bebidas lácteas como produtos opacos com pH próximo da neutralidade, nos sabores chocolate, laranja, creme e baunilha; bebidas lácteas ácidas (pH < 3,5), com aparência translúcida e disponíveis em sabores frutados, por adição de suco. Esses produtos são mais comuns na Europa e América do Norte, diferindo consideravelmente das bebidas lácteas consumidas no Brasil.

Segundo a legislação brasileira, entende-se por bebida láctea “o produto lácteo resultante da mistura do leite (*in natura*, pasteurizado, esterilizado, UHT (*Ultra high temperature*), reconstituído, concentrado, em pó, integral, semi-desnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado e em pó) adicionado ou não de produto(s) ou substância(s) alimentícia(s), gordura vegetal, leite(s) fermentado(s), fermentos lácteos

selecionados e outros produtos lácteos. A base láctea representa pelo menos 51% (m/m) do total de ingredientes do produto”. E por bebida láctea fermentada como o produto definido anteriormente “adicionado de leite fermentado, produto ou substância(s) alimentícia(s) e que não poderá ser submetido ao tratamento térmico após a fermentação. A base láctea representa pelo menos 51% (m/m) do total de ingredientes do produto. A contagem total de bactérias lácticas viáveis no produto final deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g, para o(s) cultivo(s) láctico(s) específico(s) empregado(s), durante todo o prazo de validade” (BRASIL, 2005).

Quanto ao tratamento térmico, as bebidas lácteas podem ser do tipo UHT ou pasteurizadas. Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas de Lácteas, as bebidas lácteas UHT, “refere-se ao produto submetido 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130°C e 150°C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas”. Outro produto definido pela mesma legislação é a tratada termicamente após fermentação, que trata-se da bebida láctea adicionada de cultivo de micro-organismos ou de produtos lácteos fermentados e posteriormente submetidos a tratamento térmico adequado. No mercado brasileiro, a bebida láctea UHT achocolatada é bastante consumida, e o produto é comercializado em embalagens destinadas ao processamento asséptico, como embalagens cartonadas multicamadas ou garrafas de vidro com tampa metálica do tipo “garra torção”.

Na Figura 1, encontra-se o fluxograma de produção de bebida láctea achocolatada, para a qual são utilizados leite e soro fluidos, que podem ser substituídos por leite e soro em pó, fazendo-se necessária a reconstituição dos mesmos.

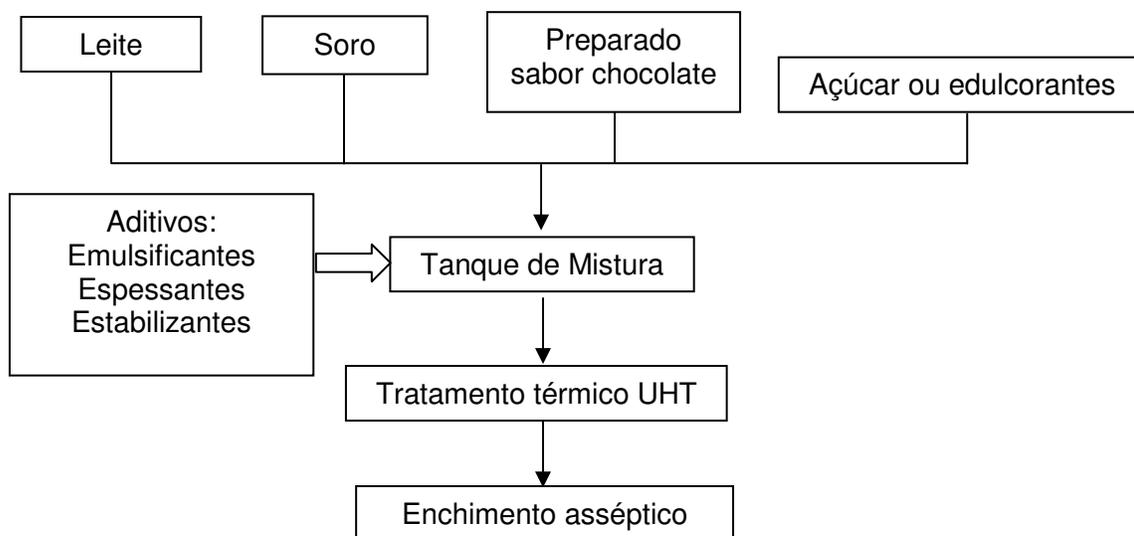


Figura 1: Fluxograma de produção de bebida láctea achocolatada UHT.

A utilização de edulcorantes ocorrerá na ocasião de produção de bebidas lácteas *diet*, em substituição ao açúcar (sacarose). Aditivos como emulsificantes, espessantes e estabilizantes são permitidos pela legislação brasileira, e são adicionados com o objetivo de se obter um produto com maior consistência, espumabilidade e com separação de fases (leite e soro) mínima ou ausente, características sensoriais almejadas pelos consumidores. A vida de prateleira de tal produto é em média 120 dias para a embalagem fechada em condições ambiente, e 2 dias sob refrigeração após aberta. De modo geral, o envase asséptico ocorre em baixas temperaturas para embalagens plásticas ou multicamadas, ou a quente, quando embalagens de vidro são utilizadas.

Para a produção de bebidas lácteas fermentadas (FIGURA 2) é necessária a utilização de micro-organismos fermentadores, geralmente, utilizam-se os mesmos da cultura do iogurte, que são capazes de fermentar a lactose em ácido láctico, conferindo acidez ao produto. Em bebidas lácteas pasteurizadas fermentadas, o armazenamento ocorre sob refrigeração, para manutenção dos micro-organismos (EPAMIG, 2010).

Já em bebidas lácteas fermentadas UHT, o tratamento térmico ocorre após a fermentação com inativação dos micro-organismos presentes, possibilitando o armazenamento em condições ambiente (BRASIL, 2005).

O tratamento térmico utilizado deve ser capaz de inativar os micro-organismos que exercem efeito competitivo com o fermento láctico. Para bebidas lácteas pasteurizadas fermentadas, a vida de prateleira é de aproximadamente 30 dias sob refrigeração, já as bebidas fermentadas submetidas ao tratamento UHT possuem vida de prateleira de até 120 dias à temperatura ambiente. Diversos fatores contribuem para o fim da vida de prateleira das bebidas lácteas e iogurtes, tais como alteração das propriedades físico-químicas, mudanças na aparência e textura devido à pós-acidificação e à sinérese, aspectos importantes na aceitação pelos consumidores (ZARE et al., 2011). Metabólitos como os ácidos orgânicos produzidos pela atividade do *Lactobacillus bulgaricus* e do *Streptococcus thermophilus*, resultam na pós-acidificação do produto que ocorre mesmo sob armazenamento refrigerado (SHAH; RAVULA, 2000). Já a sinérese é a separação do soro dos demais sólidos presentes no leite, que ocorre durante o armazenamento de bebidas lácteas e iogurtes.

A produção de bebidas lácteas fermentadas com bactérias probióticas e prebióticos pode ser uma alternativa inovadora, sem a necessidade de grandes investimentos para a utilização de soro de queijo pelas indústrias de laticínios (THAMER; PENNA, 2006; de CASTRO et al. 2009).

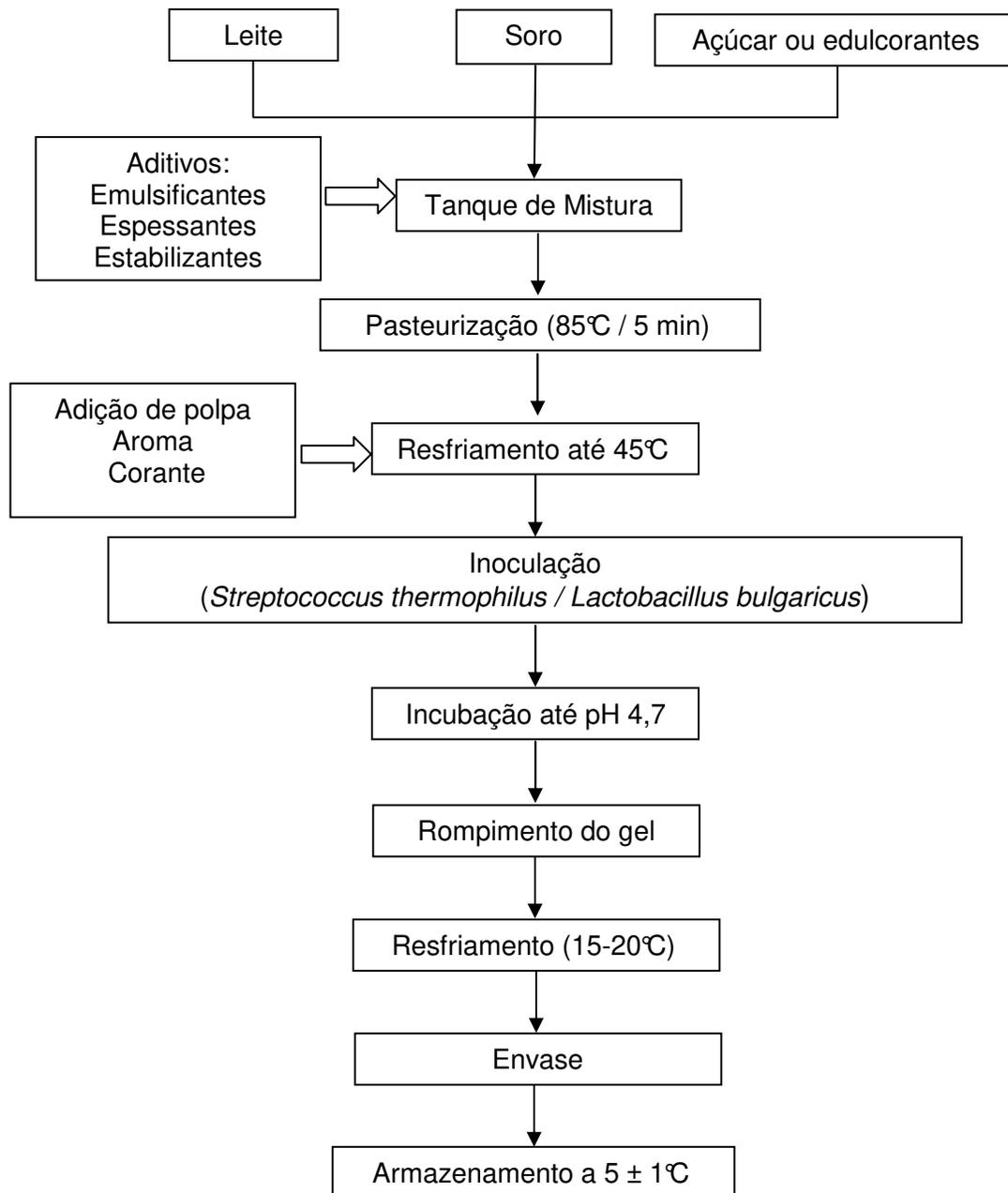


Figura 2: Fluxograma de produção de bebida láctea fermentada. Adaptado (de OLIVEIRA, 2006).

Tranjan et al. (2009) desenvolveram bebidas nos sabores morango e pêsseso utilizando soro de queijo de cabra. O soro de queijo de cabra foi adicionado de 10% (m/v) de açúcar e submetido a tratamento térmico de 75-80°C por 15 minutos, resfriado até 20°C e foram adicionados 7% de polpa de fruta. Durante 14 dias de armazenamento refrigerado, houve ligeira diminuição do pH

em ambas formulações, porém essa não foi significativa ($p > 0,05$). Sensorialmente foram avaliados a aceitação, sendo que 56 consumidores avaliaram os produtos, dos quais aproximadamente 77% e 50% afirmaram que possivelmente comprariam os produtos de morango e pêsego, respectivamente. Tais resultados são muito interessantes, pois não houve adição de leite ao produto, demonstrando ser mais uma variação de bebida láctea com denominação de *whey drink*, comumente conhecida em países europeus.

Cruz et al. (2009) produziram três formulações de bebidas lácteas sabor acerola a partir de soro de queijo de manteiga. As formulações continham 50% (v/v) de soro e 50% (v/v) de suco de acerola, 70% de soro e 30% de suco e 30% de soro e 70% de suco de acerola. Todas as bebidas foram adicionadas de 12% (m/v) de açúcar e 0,5% (m/v) de pectina, submetidas a 85°C por 10 minutos após o envase em garrafas de 250 mL e armazenadas a 5°C. A formulação contendo 70% de suco de acerola foi a melhor combinação, com elevado teor de vitamina C e notas médias superior a 6 (gostei ligeiramente) para todos os atributos avaliados (aparência, aroma, sabor e consistência). Porém, como a formulação que continha 50% de soro também foi bem avaliada sensorialmente, esta foi sugerida como formulação comercial por utilizar maior quantidade de soro de queijo de manteiga.

Diante de tantas variações de formulações de bebidas lácteas, Vieira et al. (2007) realizaram uma pesquisa com 500 consumidores em vias públicas do Rio de Janeiro. Apenas 56% dos entrevistados definiram corretamente o soro de queijo, 83% disseram desconhecer produtos que contem soro de queijo com ingrediente principal. Na ocasião, apenas 13% sabiam a diferença entre bebida láctea e leite UHT e 11% percebiam diferença entre bebida láctea fermentada e iogurte. Tais resultados vêm atentar para as informações contidas nas embalagens desses produtos e sugerem alterações na legislação para melhorias dos rótulos com mais informações aos consumidores.

3 Produtos lácteos probióticos

Num conceito inicial, os probióticos estavam mais relacionados apenas ao balanço da flora intestinal, porém com o avanço dos estudos, novas espécies

foram encontradas e o conceito foi aperfeiçoado. Atualmente, probióticos são definidos com “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001). Para que os fins terapêuticos sejam alcançados é necessário consumir regularmente 100g de produto com contagem mínima de 10^6 UFC mL⁻¹ (RYBKA; KAILASAPATHY, 1995; LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001). Contagens menores podem ser aceitas, desde que sua eficácia seja comprovada. Isso porque, é preciso que um mínimo de probióticos sobreviva à travessia do trato gastrointestinal e colonize o organismo.

As espécies mais utilizadas de probióticos pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e possuem características tecnológicas interessantes como baixas taxas de pós-acidificação durante o armazenamento (GOMES; MALCATA, 1999).

Para que o micro-organismo seja considerado probiótico para utilização na alimentação humana algumas prerrogativas devem ser seguidas (FIGURA 3), como a identificação da cepa fenotípica e genotipicamente, realização de testes *in vitro*, testes com animais para avaliação da segurança e testes com humanos, e só então após a obtenção de resultados confiáveis e seguros, o micro-organismo é considerado probiótico (FAO/WHO, 2001). Logo, para aplicação do probiótico na alimentação humana, este deve ser considerado GRAS e não causar mudanças sensoriais como textura, aroma, sabor e outros atributos importantes (STANTON et al., 2003).



Figura 3: Base teórica para seleção de micro-organismos probióticos, levando em consideração aspectos de segurança, funcionalidade e tecnológicos. Obtido de Saarela et al.(2000).

As espécies de probióticos para aplicação na alimentação humana estão apresentados na Tabela 1. Os micro-organismos *Lactobacillus delbrueckii* (subespécie *bulgaricus*) e *Streptococcus thermophilus* estão em destaque, pois seu efeito probiótico cientificamente comprovado tem sido questionado.

Tabela 1: Micro-organismos usados ou considerados para uso como probióticos em humanos.

Lactobacillus	Bifidobacterium	Outras bactérias lácticas	Outros micro-organismos[‡]
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> *	<i>Bacillus cereus</i> (por exemplo: toyoi)*
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i> *	
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>		
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>E. coli</i> (por exemplo: Nissle, 1917)
<i>L. gallinarum</i> *	<i>B. infantis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. lactis</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i> *
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. longum</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. paracasei</i>			<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. plantarum</i>		<i>Sporolactobacillus inulinus</i> *	
<i>L. reuteri</i>			<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. rhamnosus</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i> **	
<i>L. bulgaricus</i> **			

Adaptado (De VUYST; AVONTS; MAKRAS, 2004).

*Aplicado principalmente em animais

** Existem divergências sobre sua funcionalidade

‡ Utilizados principalmente em preparações farmacêuticas

Dois critérios importantes para determinar a eficácia e o sucesso de um produto contendo micro-organismos probióticos são a aceitação pelos consumidores e a capacidade do alimento em manter tais micro-organismos vivos e em contagem elevada durante o processamento e armazenamento (HEENAN et al., 2004; ARAGON-ALEGRO et al., 2007). A tarefa de manter altos níveis de células probióticas viáveis em produtos lácteos como iogurte e bebidas lácteas não é fácil, pois como o visto existem diversos fatores que influenciam na viabilidade das bactérias: variação nas cepas de bactérias, acúmulo de ácidos (lático e acético), interação com o fermento lático, níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e oxigênio dissolvido, além das condições de estocagem (NG; YEUNG;

TONG, 2011; DONKOR et al., 2006; TALWALKAR; KAILASAPATHY, 2003; NIGHSWONGER; BRASHEARS; GILLILAND, 1996; GILLILAND; SPECK, 1977). Entretanto, estudos têm reportado o potencial elevado de iogurtes e bebidas lácteas para veicular probióticos na alimentação humana.

Pescuma et al. (2010) formularam bebida láctea fermentada com suco de pêsego, lactato de cálcio e concentrado protéico de soro de queijo (35%) suplementadas com *Lactobacillus acidophilus* e obtiveram contagens de 6 log (UFC. mL⁻¹), mesmo após 28 dias de armazenamento a 9 ± 1 °C.

Leites fermentados suplementados com proteínas do leite, soro em pó ou hidrolisado de caseína foram adicionados de *Streptococcus thermophilus*, *L. rhamnosus* ou *L. acidophilus*, isolados ou em co-cultura e tiveram suas contagens microbiológicas avaliadas após 7 dias sob refrigeração (OLIVEIRA et al., 2001). Na formulação contendo soro em pó não houve diferença significativa durante o armazenamento (p<0,05) para contagens de *L. acidophilus*, (aproximadamente 10⁹ UFC mL⁻¹). As formulações com soro em pó e proteínas do leite não tiveram diferença significativa (p<0,05) nas contagens para a co-cultura de *Streptococcus thermophilus*, e *L. acidophilus* (>10⁸ UFC mL⁻¹), após 1 dia de processamento.

Em estudo recente, Madureira et al. (2011) avaliaram o efeito protetor da matriz soro de queijo em cepas probióticas expostas às condições que simularam o trato gastrointestinal. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium animalis* foram submetidos às condições sequenciais *in vitro* para simulação das condições que ocorrem no organismo humano, passagem pela boca, esôfago, estômago, duodeno e íleo. O *B. animalis* apresentou menor variação nas contagens durante a passagem pelo trato gastrointestinal simulado, porém apesar dos lactobacilli apresentarem reduções mais consideráveis, a matriz soro de queijo apresentou efeito protetor sobre as cepas probióticas testadas, favorecendo a sobrevivência durante a digestão simulada. Os autores ressaltaram que os resultados são variáveis de acordo com o tempo de exposição às condições simuladas, como acidez do estômago e presença de sais biliares.

Hernandez-Mendoza et al. (2007) produziram bebidas lácteas fermentadas probióticas suplementadas com *Lactobacillus reuteri* e *Bifidobacterium bifidum* a

partir de soro reconstituído (7%), sacarose (7%) e pectina (0,4%). As bebidas que foram fermentadas por 11 horas com 2% *L. reuteri* e 0,5% de *B. bifidum*, mantiveram ambos probióticos com contagens superiores a 10^6 UFC mL⁻¹ durante 30 dias de estocagem refrigerada. Outras concentrações de probióticos foram testadas, porém não apresentaram resultados satisfatórios quanto ao nível de probióticos. Sensorialmente, provadores não treinados detectaram aumento significativo ($p < 0,05$) na acidez apenas após 14 dias de estocagem, com pH não inferior a 4,4 no tempo final, logo um produto com grande potencial comercial.

Bebidas lácteas probióticas formuladas com soro de queijo e extrato de soja foram fermentadas por co-culturas de *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* e *Streptococcus thermophilus* (DALEV et al., 2006). Os autores adicionaram preparado de morango após a fermentação das bebidas até $4,4 < \text{pH} < 4,6$ armazenadas sob refrigeração para aplicação de Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) e obtiveram formulações contendo volumes iguais de soro de queijo e extrato de soja com contagens de probióticos superiores a 10^9 UFC mL⁻¹ e qualidades sensoriais promissoras. A suplementação com frutas favoreceu melhoria no sabor das bebidas lácteas, com efeito positivo sobre a qualidade sensorial global, com provado pela ADQ.

Oliveira et al. (2002) prepararam bebidas lácteas pela mistura de 40,2% de leite fermentado, 49,0% de soro, 5,6% de sacarose e 5,2% de preparado de fruta sabor morango. O leite utilizado no preparo das bebidas lácteas foi fermentado por co-culturas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* ou *Lactobacillus acidophilus* ou *Lactobacillus rhamnosus*. Os autores realizaram contagens dos micro-organismos durante os 28 dias de estocagem a 4°C, a cada 7 dias, e perceberam que houve diminuição no número de células viáveis com o aumento do pH. Porém, em todas as formulações os probióticos tiveram contagens superiores a 10^6 UFC mL⁻¹, e valores de pH superiores a 4,2, no final na vida de prateleira. O que garante a funcionalidade do alimento, sem causar rejeição pelos consumidores devido ao aumento na acidez. As bebidas lácteas

demonstraram ser carreadoras adequadas de probióticos, o que demonstra o crescente interesse dessa matriz alimentícia.

Diante de tais estudos, mostra-se interessante a formulação de bebidas lácteas probióticas, dadas as condições favoráveis à sobrevivência de probióticos, características sensoriais (aparência, aroma, sabor e textura) semelhantes ao iogurte, custo reduzido e aos inúmeros benefícios à saúde humana atribuídos ao consumo de alimentos funcionais, sejam pela presença de peptídeos bioativos derivados do soro de queijo, e pelos ganhos em qualidade de vida associados à ingestão de probióticos.

4 Benefícios à saúde

4.1 Benefícios da Ingestão de Soro

A utilização do soro de queijo para fins farmacológicos datam da Idade Média, quando era usado como cicatrizante de queimaduras, bálsamo para a pele, poção para a vitalidade e reduzir a queda de cabelo, entretanto, era raramente utilizado na alimentação humana (KOSIKOWSKI, 1979).

A partir da utilização tecnológica do soro para a formulação de bebidas carbonatadas ou não, suas propriedades terapêuticas começaram a ser investigadas. E desde então vários estudos tem relatado os inúmeros benefícios da ingestão de soro à saúde humana.

Belem e Lee (1999) obtiveram sequências de peptídeos com potencial bioativo derivados da fermentação do soro de queijo. Os autores utilizaram *Kluyveromyces marxianus var. marxianus*, capaz de metabolizar as proteínas solúveis do soro, principalmente lactoglobulina, dando origem aos oligopeptídeos, com possíveis funções bioativas.

Murakami et al. (2004) isolaram um peptídeo bioativo com propriedade anti-hipertensiva de um produto comercial derivado do soro. Do produto comercial derivado do soro, peso molecular médio 570 Da, teor de proteína de 81,5% e solubilidade 700 g L⁻¹, foi obtido um tetrapeptídeo, Ala-Leu-Pro-Met (alanina-leucina-prolina-metionina), resíduos de aminoácidos presentes na β -lactoglobulina (f 142 a 145), capaz de reduzir a pressão arterial em ratos.

Em outro estudo, Tsai et al. (2004) realizaram experimentos com leites fermentados por *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* e avaliaram o efeito anti-hipertensivo dos peptídeos bioativos produzidos pela fermentação. Os leites fermentados (controle) foram comparados a leites fermentados com adição da enzima flavourzima, isolada de *Aspergillus oryzae*, para acelerar o processo de hidrólise da cadeia protéica. O principal peptídeo que contribuiu para a bioatividade foi Tyr-Pro-Tyr-Tyr (tirosina-prolina-tirosina-tirosina), que permaneceu sem ser hidrolisado mesmo após testes gastrointestinais *in vitro*. Este peptídeo foi identificado pela primeira vez em soro extraído de leite fermentado. Logo, os resultados confirmados *in vivo* demonstraram a bioatividade deste peptídeo com a redução da pressão arterial em ratos naturalmente hipertensos.

Madureira et al. (2010) reconheceram que a funcionalidade dos peptídeos bioativos obtidos pela hidrólise controlada das proteínas do soro, ainda não foram caracterizadas com mesma intensidade que os peptídeos derivados da hidrólise da caseína, como reportado por Silva e Malcata (2004), porém alguns peptídeos do soro já possuem sua ação comprovada. Ao contrário do que ocorre nas caseínas, a maioria das proteínas do soro, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, são resistentes à ação das enzimas endógenas presentes no leite, como a plasmina (GRUFFERTY; FOX, 1988; CASSENS et al., 1999; MADUREIRA et al., 2010).

Fluegel et al. (2010) estudaram o efeito do consumo de bebidas à base de soro de queijo em jovens hipertensos ou com propensão a sê-lo, e chegaram à conclusão que o consumo regular de bebidas formuladas com proteínas do soro podem reduzir significativamente a pressão sanguínea sistólica, pressão sanguínea diastólica e pressão arterial média em adultos jovens com pré-hipertensão ou hipertensos em primeiro estágio.

O esquema na Figura 4 apresenta resumidamente os principais benefícios à saúde humanos atribuídos à ingestão de alimentos contendo soro de queijo. Outros benefícios podem ser obtidos pela ingestão de alimentos que contenham soro em presença de probióticos, justificando assim o consumo regular de bebidas lácteas probióticas.

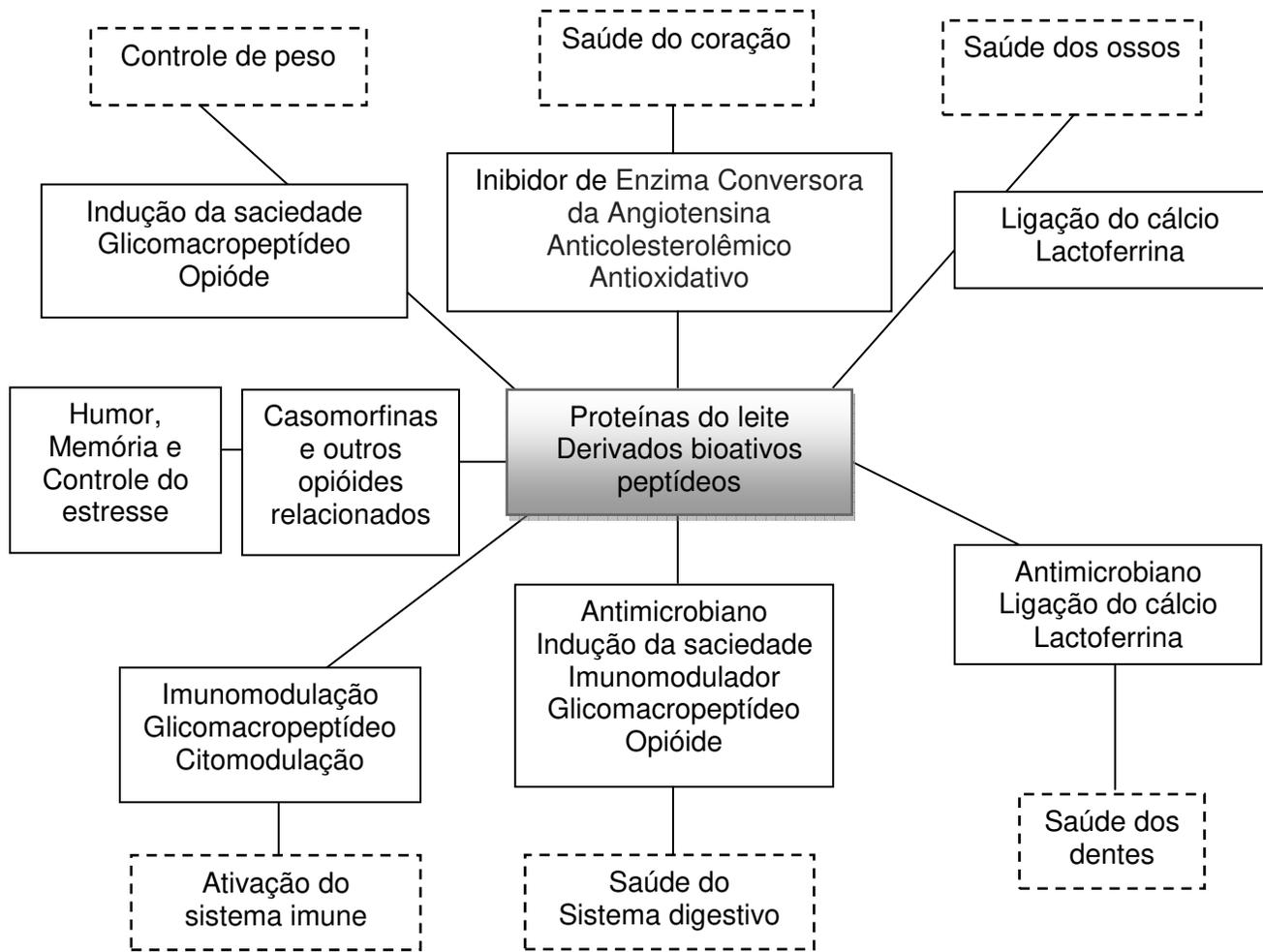


Figura 4: Funcionalidade dos peptídeos bioativos derivados proteicos do leite e benefícios potenciais à saúde. Adaptado de Korhonen (2009).

4.2 Benefícios da Ingestão de Probióticos

A atividade benéfica à saúde já é intrínseca ao conceito de alimentos contendo probióticos, não sendo nenhuma surpresa que o consumo de alimentos fermentados contendo probióticos, prebióticos ou ambos estejam associados à boa saúde. Já em 76 d.C. o historiador romano Plínio defendeu o uso de leites fermentados no tratamento de infecções intestinais (STANTON et al., 2005).

Dentre os benefícios atribuídos aos probióticos incluem a prevenção do câncer, estimulação do sistema imune, redução do colesterol sérico, aumento da síntese de vitaminas, produção de agentes antimicrobianos, anti-hipertensivo, diminuição da intolerância a lactose (DONKOR et al., 2006). Além de outros relatos na melhoria de gastroenterites, síndrome do intestino irritável, doença de

Crohn e infecções do trato geniturinário associados ao consumo regular de probióticos (STANTON et al., 2005).

Alguns mecanismos de atuação dos probióticos na saúde humana estão completamente elucidados, dentre eles:

Ativação do sistema imunológico

Alguns peptídeos antimicrobianos conhecidos como defensinas, são sintetizados pelas células de Paneth localizadas nas criptas do epitélio intestinal para neutralizar a adesão e invasão bacterianas (AYABE et al., 2000). Os probióticos são capazes de estimular a produção de tais substâncias antimicrobianas, protegendo o organismo.

Exclusão competitiva de bactérias patogênicas

Os probióticos competem com as bactérias patogênicas pelos sítios de ligação presentes nas células intestinais epiteliais, prevenindo a colonização por bactérias patogênicas (FERNÁNDEZ; BORIS; BARBÉS, 2003).

Influência sobre a microbiota hospedeira e bactérias patogênicas

Os probióticos exercem efeitos de modulação da microbiota intestinal, pois o consumo de alimentos contendo bactérias é capaz de aumentar o número dessas bactérias no intestino de indivíduos saudáveis (HÖRMANNSPERGER; HALLER, 2010).

Modulação do sistema imunológico

Os probióticos estimulam a produção de proteínas TLR (*Toll-like receptor*), responsáveis pelo reconhecimento de agentes infecciosos, impedindo assim a entrada de agentes infecciosos no interior celular (GRABIG et al., 2006).

Produção de substâncias antibacterianas

Algumas bactérias lácticas produzem peptídeos antibacterianos, incluindo lactacina B produzida por *Lactobacillus acidophilus* (TABASCO et al., 2009), plantaricina de *Lactobacillus plantarum* (MESSI et al., 2001) e nisina de *Lactobacillus lactis* (MITRA; CHAKRABARTTY; BISWAS, 2010) que possuem atividade antibacteriana específica.

Promover função de barreira intestinal

A barreira intestinal é um mecanismo de defesa que promove barreira entre o epitélio do organismo e o ambiente. Os probióticos viáveis melhoraram as propriedades de barreira, e contribuem para o efeito benéfico *in vivo*, evitando a invasão da mucosa intestinal (RESTA-LENERT; BARRET, 2003).

Estudos tem relatado a importância de matrizes lácteas como principais veículos de suplementação de bactérias probióticas. Psomas et al. (2003) avaliaram o potencial de algumas cepas de leveduras isoladas das fezes de lactentes e queijo Feta em metabolizar colesterol, num período de 72h de incubação a 37°C. Dentre as cepas que tiveram sua capacidade de metabolizar colesterol em testes *in vitro* estavam *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae* (KK1 e 832), *Isaatchenkia orientalis* KK5.Y.1, *Candida albicans* KK2.1, *Candida parapsilosis* KK6.P, *Kluyveromyces marxianus* 630, *Kluyveromyces lactis* 570 e *Pichia farinosa* 441. As cepas de *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae* (KK1 e 832) foram capazes de assimilar o colesterol (>83,4%), com boa capacidade de tolerar baixos níveis de pH, presença de suco gástrico e bile, presentes no trato gastrointestinal humano, demonstrando elevado potencial probiótico.

Collado; Meriluoto; Salminen (2007) realizaram experimentos *in vitro* para avaliar a habilidade de competição de cepas probióticas de *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium breve* na presença de bactérias patogênicas. Os autores avaliaram diferentes combinações de probióticos e seus respectivos efeitos na adesão e colonização de mucosas intestinais. Considerando que a adesão e a colonização da mucosa intestinal são pré-requisitos importantes para a efetividade do probiótico, os resultados demonstraram que combinações de probióticos foram mais efetivas que probióticos isolados na diminuição da adesão de espécies patogênicas. Os níveis de adesão dos probióticos tiveram grande variabilidade, dependendo da cepa, espécie e gênero. As combinações de probióticos utilizadas foram capazes de inibir e competir com os patógenos, e mostraram ter potenciais para serem utilizados em alimentos lácteos fermentados e em terapias no tratamento de doenças.

Yadav; Jain e Sinha (2007) realizaram experimentos com Dahi, um leite fermentado típico da Índia, suplementados com *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei*. Os autores avaliaram o efeito dos probióticos sobre ratos diabéticos induzidos, alimentados com dieta de elevado teor de frutose, que está associada à diabetes tipo II, resistente à insulina. A dieta suplementada com probióticos teve efeito significativo em retardar a progressão da diabetes e o estresse oxidativo em ratos.

Recentemente foi realizado um estudo para avaliar o perfil lipídico em humanos portadores de diabetes melitus tipo II alimentados com iogurtes probióticos contendo *Lactobacillus acidophilus* (La 5) e *Bifidobacterium lactis* (BB12). Neste trabalho Ejtahed et al. (2011) investigaram o efeito dos probióticos em 60 indivíduos com teor de colesterol LDL superior a $2,6 \text{ mmol.L}^{-1}$, que consumiram diariamente 300g de iogurte probiótico ou convencional por 6 semanas. Diante dos resultados os autores concluíram que o consumo de iogurte probiótico contendo *L. acidophilus* e *B. lactis* pode diminuir os níveis de colesterol total e colesterol LDL em humanos diabéticos tipo II, diminuindo assim os fatores de risco de doenças cardiovasculares.

5 Considerações finais

Atualmente existem muitas variações em formulações de bebidas lácteas, porém as formulações que utilizam o soro de queijo possuem grande potencial econômico e nutricional, com redução de gastos com tratamento de efluentes e impactos ambientais. A crescente demanda por alimentos funcionais, principalmente lácteos, tem favorecido o desenvolvimento de novos produtos a partir de dados científicos que comprovam os benefícios à saúde atribuídos ao consumo de probióticos e aos alimentos derivados do soro. Portanto, para atender ao mercado cada vez mais exigente, as bebidas lácteas probióticas poderão vir a ser uma opção econômica muito interessante para as indústrias, por se tratar de um alimento com apelo de benefícios à saúde humana e com custos de produção reduzidos.

6 Referências bibliográficas

ALMEIDA, K. E.; TAMINE, A. Y.; OLIVEIRA, M. N. Acidification rates of probiotic bacteria in Minas frescal cheese whey. **LWT- Food Science and Technology**, v. 41, n. 2, p.311-316, 2008.

ARAGON-ALEGRO, L. C.; ALEGRO, J. H. A.; CARDARELLI, H. R.; CHIU, M. C.; SAAD, S. M. I. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT- Food Science and Technology**, v.40, n.4, p.669-675, 2007.

AYABE, T.; SATCHELL, D.P.; WILSON, C.L.; PARKS, W.C.; SELSTED, M.E.; OUELLETTE, A. J. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. **Nature Immunology**, v.1, n.2, p.113-118, 2000.

BELEM, M. A. F.; LEE, B. H. Fed-batch fermentation to produce oligonucleotides from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. **Process Biochemistry**, v.34, n.5, p.501-509, 1999.

BEECHER, J. W.; DRAKE, M. A.; LUCK, P. J.; FOEGEDING, E. A. Factors regulating adstringency of whey protein beverages. **Journal of Dairy Science**, v.91, n.7, p.2553-2560, 2008.

BRASIL. Instrução Normativa N.º 16, de 23 de agosto de 2005. Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea. **Ministério da Agricultura e do Abastecimento**.

CASSENS, P. W. J. R.; VISSER, S.; GRUPPEN, H.; VORAGEN, A. G. J. β -lactoglobulin hydrolysis. 1. Peptide composition and functional properties of hydrolysates obtained by the action of plasmin, trypsin, and *Staphylococcus aureus* V8 protease. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.47, n.8, p.2973-2979, 1999.

COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. **Food Research International**, v.40, n.5, p.629-636, 2007.

CRUZ, A. G.; SANT' ANNA, A. S.; MACCHIONE, M. M.; TEIXEIRA, A. M. Milk drink using whey butter cheese (queijo manteiga) and acerola juice as a potencial source of vitamin C. **Food Bioprocess Technology**, v.2, n.4, p.368-373, 2009.

DALEV, D.; BIELECKA, M.; TROSZYŃSKA, A.; ZIAJKA, S.; LAMPARSKI, G. Sensory quality of new probiotic beverages based on cheese whey and soy preparation. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.15/56, SI 1, p.71-77, 2006.

de CASTRO, F. P.; CUNHA, T. M.; BARRETO, P. L. M.; AMBONI, R. D. D. M.; PRUDÊNCIO, E. S. Effect of oligofructose incorporation on the properties of fermented probiotic lactic beverages. **International Journal of Dairy Technology**, v.62, n.1, p.68-74, 2009.

de OLIVEIRA, V. M. (2006). **Formulação de bebida láctea fermentada com diferentes concentrações de soro de queijo, enriquecida com ferro: caracterização físico-química, análises bacteriológicas e sensoriais.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense. Niterói. Rio de Janeiro. 78p. 2006.

De VUYST, L.; AVONTS, L.; MAKRAS, L. Probiotics, prebiotics and gut health. In: Remacle, C.; Reusens, B. **Functional Foods, Aging, and Degenerative Disease.** Woodhead Publishing Limited. CRC Press, New York, 771p. 2004.

DONKOR, O. N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v.16, n.10, p.1181-1189, 2006.

EJTAHED, H. S.; MOHTADI-NIA, J.; HOMAYOUNI-RAD, A.; NIAFAR, M.; ASGHARI-JAFARABADI, M.; MOFID, V.; AKBARIAN-MOGHARI, A. Effect of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.7, p.3288-3294, 2011.

EPAMIG. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. **Tecnologia de fabricação de bebida láctea fermentada e não fermentada.** 20p. 2010.

FARIZOGLU, B.; KESKINLER, B.; YILDIZ, E.; NUHOGLU, A. Cheese whey treatment performance of an aerobic jet loop membrane bioreactor. **Process Biochemistry**, v.39, n.12, p.2283-2291, 2004.

FERNÁNDEZ, M. F.; BORIS, S.; BARBÉS, C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.449-455, 2003.

FLUEGEL, S. M.; SHULTZ, T. D.; POWERS, J. R.; CLARK, S.; BARBOSA-LEIKER, C.; WRIGHT, B. R.; FRESON, T. S.; FLUEGEL, H. A.; MINCH, J. D.; SCHWARZKOPF, L. K.; MILLER, A. J.; DI FILIPPO, M. M. Whey beverages decrease blood pressure in prehypertensive and hypertensive young men and women. **International Dairy Journal**, v.20, n.11, p.753-760, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001.

GRABIG, A.; PACLIK, D.; GUZY, C.; DANKOF, A.; BAUMGART, D.C.; ERCKENBRECHT, J.; RAUPACH, B.; SONNENBORN, U.; ECKERT, J.; SCHUMANN, R. R.; WIEDENMANN, B.; DIGNASS, U.; STURN, A. *Escherichia coli* strain nissle 1917 ameliorates experimental colitis via Toll-like receptor 1- and Toll-like receptor 4-dependent pathways. **Infection and Immunity**, v. 74, n.7., p.4075-4072, 2006.

HÖRMANNSPERGER, G.; HALLER, D. Molecular crosstalk of probiotic bacteria with the intestinal immune system: Clinical relevance in the context of inflammatory bowel disease. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p.63-73, 2010.

GANDHI, D. N.; PATEL, R. S. Technology and keeping quality of fermented whey concentrate. **Cultured Dairy Products Journal**, v.29, n.1, p.25-27, 1994.

GILLILAND, S. E.; SPECK, M. L. Instability of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt. **Journal of Dairy Science**, v.60, n.9, p.1394-1398, 1977.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v.10, n.4-5, p.139-157, 1999.

GRUFFERTY, M. B.; FOX, P. F. Milk alkaline proteinase. **Journal of Dairy Research**, v.55, n.4, p.609-613, 1988.

HEENAN, C. N.; ADAMS, M. C.; HOSKEN, R. W.; FLEET, G. H. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a non-fermented frozen vegetarian dessert. **LWT- Food Science and Technology**, v.37, n.4, p.461-466, 2004.

HERNANDEZ-MENDOZA, A.; ROBLES, V. J.; ANGULO, J. O.; de la CRUZ, J.; GARCIA, H. S. Preparation of a whey-based probiotic product with *Lactobacillus reuteri* and *Bifidobacterium bifidum*. **Food Technology and Biotechnology**, v.45, n.1, p.27-31, 2007.

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: from science to applications. **Journal of Functional Foods**, v.1, n. 2, p.177-187, 2009.

KOSIKOWSKI, F. V. Whey utilization and whey products. **Journal of Dairy Science**, v.62, n.7, p.1149-1160, 1979.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v.11, n.1-2, p.1-17, 2001.

MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v.44, n.1, p.465-470, 2011.

MADUREIRA, A.R.; TAVARES, T.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v.93, n.2, p.437-355, 2010.

MAWSON, A. J. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. **Bioresource Technology**, v.47, n.3, p.195-203, 1994.

MESSI, P.; BONDI, M.; SABIA, C.; BATTINI, R.; MANICARDI, G. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plataricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n.1-2, p.193-198, 2001.

MITRA, S.; CHAKRABARTTY, P. K.; BISWAS, S. R. Potential production and preservation of dahi by *Lactococcus lactis* W8, a nisin-production strain. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n.2, p. 337-342, 2010.

MURAKAMI, M.; TONOUCHE, H.; TAKAHASHI, R.; KITASAWA, H.; KAWAI, Y.; NEGISHI, H.; SAITO, T. Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide (β -Latosin B) isolated from a commercial whey product. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.7, p.1967-1974, 2004.

NATIONAL DAIRY COUNCIL. (2008). Whey Protein: Emerging Health Benefits of Whey. Disponível em:
<http://www.innovatewithdairy.com/SiteCollectionDocuments/DCD_JulyAug2006HealthBenefits.pdf> Acesso: 05 abr. 2012.

NG, E. W.; YEUNG, M.; TONG, P. S. Effects of yogurt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.145, n.1, p.169-175, 2011.

NIGHSWONGER, B. D.; BRASHEARS, M. M.; GILLILAND, S. E. Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.2, p.212-219, 1996.

OLIVEIRA, M. N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; TISSIER, J. P.; CORRIEU, G. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, n.11-12, p.939-946, 2001.

OLIVEIRA, M. N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; TISSIER, J. P.; CORRIEU, G. Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures. **Journal of Food Science**, v.67, n.6, p.2336-2341, 2002.

PESCUMA, M.; HÉBERT, E. M.; MOZZI, F.; de VALDEZ, G. F. Functional fermented whey-based beverage using lactic bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, n.1-2, p.73-81, 2010.

PSOMAS, E. I.; FLETOURIS, D. J.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; TZANETAKI, N. Assimilation of cholesterol by yeast strains isolated from infant feces and Feta cheese. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.11, p.3416-3422, 2003.

RESTA-LENERT, S.; BARRETT, K.E. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). **Gut** v.52, p.988–997, 2003.

RYBKA, S.; KAILASAPATHY, K. The survival of culture bacteria in fresh and freeze-dried AB yoghurts. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.50, n.2, p.51-57, 1995.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v.84, n.3, p.197-215, 2000.

SHAH, N. P.; RAVULA, R. R. Influence of water activity on fermentation, organic acids production and viability of yoghurt and probiotic bacteria. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.55, n.3, p.127-131, 2000.

SILVA, S. V.; MALCATA, F. X. Caseins as source of bioactive peptides. **International Dairy Journal**, v.15, n.1, p.1-15, 2004.

SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: Functional properties nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, v.101, n.4, p.1484-1491, 2007.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, v.57, n.1, p.1-11, 1996.

SMITHERS, G.W. Whey and whey proteins – From ‘gutter-to-gold’. **International Dairy Journal**, n. 18, v. 7, p. 695-704, 2008.

SMITHERS, G.W.; BALLARD, F. J.; COPELAND, A. D.; DE SILVA, K. J.; DIONYSIUS, D. A.; FRANCIS, G. L. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 8, p. 1454-1459, 1996.

STANTON, C.; DESMOND, C.; COAKLEY, M.; COLLINS, J. K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R. P. Challenges facing development of probiotic containing functional foods. (pp. 27-58). In: E. R. Farnworth (Ed.), **Handbook of fermented functional foods**. Boca Ranton, LA, USA: CRC Press, 2003.

STANTON, C.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G.; VAN SINDEREN, D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, n.2, p.198-203, 2005.

TABASCO, R.; GARCÍA-CAYUELA, T.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it sensed live target bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, n.2-3, p. 109-116, 2009.

TALWALKAR, A.; KAILASAPATHY, K. Metabolic and biochemical responses of probiotics bacteria in oxygen. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.8, p.2537-2546, 2003.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.589-595, 2006.

TRANJAN, B. C.; CRUZ, A. G.; WALTER, E. H. M.; FARIA, J. A. F.; BOLINI, H. M. A.; MOURA, M. R. L.; CARVALHO, L. M. J. Development of goat cheese whey-flavoured beverages. **International Journal of Dairy Technology**, v.62, n.3, p.438-443, 2009.

TSAI, J. S.; CHEN, T. J.; PAN, B. S.; GONG, S. D.; CHUNG, M. Y. Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk. **Food Chemistry**, v.106, n.2, p.552-558, 2006.

VIEIRA, A. L. A.; CRUZ, A. G.; BARBIN, D. F.; VAN DENDER, A. G. F. Soro de queijo: atitudes e conhecimento do consumidor. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.358, n.62, p.41-46, 2007.

WATANABE, J.; NISHIMUKAI, M.; TAGUCHI, H.; SENOURA, T.; HAMADA, S.; MATSUI, H.; YAMAMOTO, T.; WASAKI, J.; HARA, H.; ITO, S. Prebiotic properties of epilactose. **Journal of Dairy Science**, v.91,n.12, p.4518-4526, 2008.

WEETAL, H. H.; HAVEWALA, N. B.; PITCHER, W. H.; DETAR, C. C.; VAN, W. P.; YAVERBAUM, S. The preparation of immobilized lactase and its use in the enzymatic hydrolysis of acid whey. **Biotechnology and Bioengineering**, v.16, n.3, p.295-313, 1974.

WONG, N. P.; LACROIX, D. E.; McDONOUGH, F. E. Minerals in whey and whey fractions. **Journal of Dairy Science**, v.61, n.12, p.1700-1703, 1978.

YADAV, H.; JAIN, S.; SINHA, P. R. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. **Nutrition**, v.23, n.1, p.62-68, 2007.

ZARE, F.; BOYE, J.I.; ORSAT, V.; CHAMPAGNE, C.; SIMPSON, B. K. Microbial, physical and sensory properties of yogurt supplemented with lentil flour. **Food Research International**, v.44, n. 8, p.2482-2488, 2011.

CAPÍTULO 2

USO DE MODELOS MATEMÁTICOS PARA AVALIAR BEBIDAS LÁCTEAS PROBIÓTICAS

Formatado segundo as normas do JOURNAL OF DAIRY SCIENCE

Resumo

Modelos matemáticos – *Survival Analysis*, Mínima Diferença Significativa e Aceitação Global Média – foram utilizados para a identificação da concentração mais adequada de soro de queijo em bebidas probióticas. Bebidas lácteas probióticas sabor morango (2% v/v *Lactobacillus acidophilus*) foram produzidas utilizando 0, 20, 35, 50, 65 e 80% v/v de soro em suas formulações. Cinquenta e cinco consumidores avaliaram a aceitação das bebidas utilizando escala hedônica híbrida de 9 pontos. Além disso, a contagem de *Lactobacillus acidophilus* e o valor de pH foram determinados. Todas as bebidas apresentaram contagens mínimas de 8 log UFC mL⁻¹ de *L. acidophilus* (p<0,05) enquanto o pH variou de 4,09 a 4,14. O conteúdo de soro de queijo teve efeito significativo (p<0,05) sobre a aceitação das bebidas lácteas probióticas, grandes quantidades de soro na formulação resultou em menor aceitação pelos consumidores. As maiores notas para Aceitação Global Média foram para 12 e 65% (v/v) de soro, sendo este último de maior interesse uma vez que permite maior utilização do subproduto pela indústria. A distribuição de Weibull e *Survival Analysis* apresentou predição de 49% (v/v) de soro de queijo com probabilidade de rejeição em 50% dos consumidores. A Mínima Diferença Significativa foi a mais conservadora entre as metodologias utilizadas, fornecendo 4,26% v/v de soro. As metodologias utilizadas nesta pesquisa mostraram-se técnicas promissoras para determinar os componentes de formulações de alimentos, especialmente em bebidas lácteas probióticas.

Palavras chave: bebidas lácteas probióticas, *Survival Analysis*, aceitação do consumidor.

Introdução

Bebidas lácteas são alimentos produzidos a partir do leite e ou seus derivados, com ou sem adição de outros ingredientes, na qual a base láctea representa pelo menos 51% (m/m) do total da formulação, podendo ser submetidas ao processo de fermentação utilizando as culturas do iogurte (Brasil, 2005). Em 2010, o Brasil importou US\$ 39 milhões em soro de queijo e exportou US\$ 8,145 (Brasil, 2012). Dados que demonstram a elevada demanda por soro de queijo, uma vez que o consumo interno de alimentos que utilizam o soro, como bebidas lácteas também é elevado. O consumo expressivo de bebidas lácteas está associado ao consumo de iogurtes, dada a semelhança entre eles e aos hábitos saudáveis pela ingestão de lácteos fermentados (Zhu et al., 2009).

A suplementação com bactérias probióticas e ingredientes prebióticos representa uma nova opção para agregar valor às bebidas lácteas, conforme tem sido relatado em diversos trabalhos sobre sua adequação como matriz alimentícia (Oliveira *et al.* 2002; Castro *et al.* 2009; Zoellner *et al.* 2009) e aos benefícios à saúde como a diminuição dos níveis de pressão arterial (Fluegel *et al.* 2010).

Um dos principais objetivos das indústrias de alimentos é a sua produção com boa aceitação sensorial. Para alcançar esse objetivo e sobreviver à forte concorrência no setor, os produtos devem atender às expectativas dos consumidores. Nesse contexto, o aproveitamento do soro para produção de bebidas lácteas mostra-se uma alternativa vantajosa, na medida em que bebidas lácteas apresentam atitudes positivas por parte dos consumidores, principalmente quando esses possuem um maior nível educacional (Krešić *et al.* 2010).

Entretanto, ainda faltam informações quanto ao nível exato de soro que deve ser adicionado na formulação e que resulte em uma adequada aceitação por parte dos consumidores. Para um produto contendo como ingrediente fundamental, o soro de queijo que, intrinsecamente, está relacionado aos diversos benefícios à saúde humana, como prevenção do câncer, aumento dos níveis de glutathione, função antimicrobiana e aumento da resposta à saciedade (Madureira *et al.* 2007), esta informação será fundamental. Maior quantidade de soro de queijo implica em maior aproveitamento de tão valioso resíduo industrial e menor

impacto sobre o meio ambiente. Adicionalmente, pode-se contribuir para a reavaliação da legislação brasileira vigente, com base em informações obtidas diretamente do consumidor final.

Survival Analysis é uma área da estatística com aplicações na área médica, em estudos clínicos, epidemiologia, biologia e sociologia para tratar dados intervalares, isto é, acompanhar a ocorrência de determinado evento (Hough et al., 2003).

Alguns estudos têm utilizado tais metodologias na seleção da concentração de ingredientes de formulação e na estimativa da vida de prateleira, com base em dados sensoriais. Cruz *et al.* (2010) aplicaram *Survival Analysis* para estimar a vida de prateleira de iogurtes probióticos. Os autores observaram que a vida de prateleira de iogurtes probióticos estimada pela distribuição de Weibull é superior à declarada pelo fabricante.

Giménez et al. (2008) utilizaram modelos matemáticos como *Survival Analysis*, Aceitação Global Média e Mínima Diferença Significativa para avaliar dados sensoriais obtidos pela variação da concentração de lactose hidrolisada em doce de leite. Esses autores obtiveram resultados semelhantes entre a distribuição e Weibull e a Mínima Diferença Significativa, e concluíram que a *Survival Analysis* pode ser aplicada para estimar limites de ingredientes presentes na formulação do produto, como a causa de rejeição do consumidor.

Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi a utilização de modelos matemáticos para o desenvolvimento de bebidas lácteas probióticas com diferentes níveis de soro em sua formulação, tendo como base a aceitação de consumidores habituais do produto. Foram avaliadas três metodologias matemáticas: Análise de Sobrevida, Aceitação Global Média e Mínima Diferença Significativa.

Material e métodos

Processamentos das formulações de bebidas probióticas

Para a formulação das bebidas probióticas foram utilizados leite pasteurizado (3% de gordura) e soro de queijo, obtido durante a fabricação de queijo Minas Frescal, pelo processo de coagulação enzimática, antes da etapa de salga (pH 6,26), fornecidos pela Fazenda São José (Santo Antônio de Posse, São Paulo, Brasil). Os inóculos foram preparados utilizando leite em pó desnatado (Molico, São Paulo, Brasil) reconstituído (11% m/v), e culturas de *Streptococcus thermophilus* – TA 40 (Danisco, Copenhagen, Dinamarca) e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* – LB 340 (Danisco), e cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus* – La 14 (Danisco). Foram utilizados açúcar e preparado de fruta sabor morango, contendo polpa de morango e corante natural, cedido pela Industrial Duas Rodas (Jaraguá do Sul, Santa Catarina, Brasil).

Quatro litros de cada uma das seis bebidas lácteas foram processados em escala laboratorial, amostra controle (0% de soro), e amostras contendo 20, 35, 50, 65 e 80% de soro de queijo (v/v), sendo que o volume percentual restante foi completado com leite considerando o conteúdo de inóculo. O açúcar foi adicionado na concentração de 10% (m/v) de bebida probiótica e as misturas submetidas ao tratamento térmico 83°C por 15 minutos na planta piloto do Departamento de Tecnologia de Alimentos. Após o tratamento térmico, as misturas foram resfriadas em banho de gelo até 46°C, adicionado o preparado de fruta a 1% (m/v), os inóculos do fermento na quantidade de 1% (v/v) e 2% (v/v) da cultura probiótica do volume de produto, mantidas à temperatura média de 45°C durante a fermentação. Ao atingir pH 4,7, a fermentação foi interrompida pelo resfriamento em banho de gelo até 8°C e armazenadas à $5 \pm 1^\circ\text{C}$. Os processamentos foram realizados em duas repetições.

Análises de pH e microbiológicas

pH

O pH das matérias-primas (leite e soro) foi realizado no dia do processamento (tempo zero). Nas seis amostras o pH foi medido imediatamente e 15 dias após o processamento. Foi utilizado medidor de pH Digimed DM-20

(DIGIMED, São Paulo, Brasil), equipado com eletrodo e termo-compensador (Marshall, 1993).

Contagem de *Lactobacillus acidophilus*

A enumeração de *Lactobacillus acidophilus* foi realizada em duplicata, 7 dias após o processamento das bebidas. Foi utilizado ágar MRS, suplementado com 0,15% (m/v) de sais biliares (Oxoid, São Paulo, Brasil), com incubação em aerobiose durante 3 dias a 37°C (Mortazavian et al. , 2007).

Avaliação das condições higiênico-sanitárias

Contagem de bolores e leveduras, coliformes totais (35 °C) e fecais (44,5 °C) realizadas no dia seguinte ao processamento, de acordo com a metodologia de Vanderzant e Splittstoesser (1992).

Análise Sensorial

Cinquenta e cinco provadores não treinados (Hough et al., 2007), consumidores de produtos lácteos fermentados, selecionados aleatoriamente foram convidados a realizar o teste. As seis amostras foram apresentadas à temperatura de refrigeração $5 \pm 1^\circ\text{C}$, apresentadas monadicamente, em copos plásticos de poliestireno codificados com números de três dígitos, seguindo o delineamento de apresentação das amostras sugerido por Macfie and Bratchell (1989), para diminuição do efeito *carry-over* e *first-order*. Os testes ocorreram em cabines individuais, iluminadas com luz branca e temperatura controlada de 23°C, sendo servidos 30 mL da amostra para cada consumidor. Entre a apresentação das amostras, os provadores foram instruídos a comer biscoito (*cream cracker*) e a beber água para reduzir a fadiga sensorial. Os provadores avaliaram a aceitação das amostras em escala hedônica híbrida de 9 pontos (1=desgostei extremamente; 9=gostei extremamente). Adicionalmente, responderam à seguinte pergunta para cada uma das amostras: “Você normalmente consumiria esse produto?” Devendo a resposta ser: “Sim” ou “Não”. A análise sensorial foi

realizada aos 15 dias de estocagem refrigerada, o que corresponde à metade da vida de prateleira de bebidas lácteas comerciais.

Para a realização dos testes sensoriais houve aprovação prévia do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP (Sistema Nacional de Informações sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos - CAAE - 0030.0.146.000-10).

Modelagem Matemática

Aceitação Global Média

O modelo que expressa a aceitação global média, foi obtido a partir da média das notas fornecidas pelos 55 provadores à aceitação de cada uma das amostras. Os dados foram inseridos no eixo de coordenadas x-y, sendo (y) a função que representa a nota média dos provadores em função do nível de soro presente na amostra (x). Posteriormente, foram modelados utilizando uma equação polinomial de segunda ordem:

$$Y = \beta_{11}x^2 + \beta_{22}x + \beta_0 \quad (\text{Eq. 01})$$

Mínima Diferença Significativa

O percentual máximo de soro de queijo que pode ser usado na formulação de bebida probiótica pode ser estimado pelo percentual de consumidores que notaram a primeira diferença significativa nas características sensoriais do produto avaliado, quando comparado à amostra formulada sem a adição de soro de queijo. A primeira diferença significativa notada pelos consumidores, em relação ao nível de soro de queijo, pode ser calculada pela Equação 02 (Hough *et al.* 2002; Ares *et al.* 2009):

$$S = F - Z_{\alpha} \sqrt{\frac{2 \times \text{MSE}}{n}} \quad (\text{Eq. 02})$$

Onde: S=a primeira diferença significativa na aceitabilidade da amostra contendo soro de queijo; F=aceitabilidade da amostra controle; Z_{α} =coordenada unicaudal da curva normal ao nível α de significância; MSE= quadrado médio do erro derivado da análise de variância dos dados dos consumidores; n= número de consumidores.

Survival Analysis

Para fins de definição, pode-se considerar uma variável C qualquer, sendo, por exemplo, a concentração de soro capaz de causar a rejeição da amostra. A função F(c), função rejeição (Hough *et al.* 2003), é definida como a probabilidade do consumidor (ou grupo de consumidores) rejeitar sensorialmente o produto, sendo definida como $F(c) = P(C < c)$.

A distribuição de Weibull (Equação 03), utilizado neste trabalho, já tem sido aplicada em diversos estudos envolvendo a determinação de vida de prateleira sensorial em alimentos processados, como ricota *cheese* (Hough *et al.* 1999), alface minimamente processada (Araneda *et al.*, 2008), alfajor (Gámbaro *et al.* 2004) e polpa de manga e abacate submetidas a alta pressão hidrostática (Jacobó-Velázquez *et al.* 2010).

$$F(c) = 1 - S_{sev} \left(\frac{\ln(c) - \mu}{\sigma} \right) \quad (\text{Eq. 03})$$

Onde: $S_{sev}(\bullet)$ é a função *Survival* para o menor valor extremo da distribuição: $S_{sev}(w) = \exp(-e^w)$, μ e σ são parâmetros do modelo.

As respostas dos provadores foram codificadas: 1 para a resposta “Não”, e 0 para a resposta “Sim”, e os dados inseridos no SAS[®] versão 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina) para execução da *Survival Analysis*.

Análise Estatística

Os dados do teste de aceitação foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey ao nível de 5% de significância para verificar as diferenças entre a aceitabilidade das amostras, considerando o nível soro na bebida láctea como fator fixo.

Resultados e discussão

Valores de pH e contagem de micro-organismos

Todas as amostras foram submetidas aos testes microbiológicos como contagem de bolores e leveduras e coliformes, para avaliação das condições higiênico-sanitárias do processo.

As bebidas lácteas atenderam satisfatoriamente aos padrões microbiológicos para consumo humano, permitindo assim a aplicação dos testes sensoriais.

A Tabela 1 mostra os valores de pH e a contagem de *Lactobacillus acidophilus* nas bebidas lácteas com diferentes níveis de soro. Os valores de pH das amostras, 15 após o processamento, variaram entre 4,07 a 4,14, sugerindo a ocorrência de pós-acidificação durante o armazenamento, fenômeno normalmente encontrado em produtos lácteos fermentados.

Quanto às contagens de *Lactobacillus acidophilus*, foi verificado que todas as bebidas apresentaram valor superior a 8 log UFC mL⁻¹ após 7 dias de estocagem refrigerada, indicando contagens recomendadas para o estabelecimento de benefícios para os consumidores, para compensar uma possível redução em virtude da passagem através do trato gastrointestinal (Granato *et al.* 2010).

Tabela 1: Valores de pH (tempo zero e após 15 dias) e contagens de micro-organismos probióticos após 7 dias de estocagem refrigerada .

Formulações (% soro)	pH*	pH**	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (log UFC.mL ⁻¹)***
0	4,74	4,09	8,83 ± 0,02 ^a
20	4,73	4,07	8,69 ± 0,02 ^a
35	4,52	4,14	8,70 ± 0,02 ^a
50	4,67	4,08	8,77 ± 0,05 ^a
65	4,62	4,11	8,78 ± 0,04 ^a
80	4,54	4,07	8,68 ± 0,04 ^a

* Realizado no dia do processamento.

** Realizada 15 dias após o processamento.

***Médias na mesma coluna seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

Foi observado ausência da interferência do nível de soro nas contagens de probióticos das bebidas (p>0,05), evidenciando que não há limitação na capacidade da cepa probiótica em metabolizar os peptídeos presentes no soro. Almeida *et al.* (2008; 2009) verificaram a aplicação tecnológica do soro de queijo Minas Frescal como meio adequado para o desenvolvimento de bactérias probióticas. Aplicação confirmada pelo presente estudo. Resultados similares foram relatados em outra pesquisa envolvendo bebidas lácteas (Madureira *et al.* 2010), e são comparáveis aos encontrados em outros produtos lácteos obtidos de soro de queijo (Madureira *et al.* 2005; Madureira *et al.* 2008; Madureira *et al.* 2011a,b). Adicionalmente, tais resultados reforçam o potencial da bebida láctea como matriz alimentícia adequada para suplementação de bactérias probióticas.

Aceitação dos consumidores

A Tabela 2 mostra a aceitação das bebidas lácteas probióticas com diferentes níveis de soro. Foi observado que o nível de soro apresentou efeito na aceitação das bebidas lácteas probióticas (p<0,05), sendo verificado que a máxima aceitação foi observada para a bebida com 35% de soro em sua formulação, a saber: 7,04. Maiores quantidades de soro resultaram em uma menor

aceitação por parte dos consumidores, pois as amostras que continham 65 e 80% de soro em sua formulação registraram 5,69 e 5,25, respectivamente.

Tabela 2: Aceitação sensorial de bebidas lácteas

% Soro	0	20	35	50	65	80
Aceitação média*	5,25 ^c	6,38 ^{a,b}	7,04 ^a	5,93 ^{b,c}	5,69 ^{b,c}	5,25 ^c

*Letras iguais na mesma linha indica ausência de diferença significativa pelo teste de Tukey (p>0,05).

Uma possível explicação para os resultados encontrados é o maior nível de adstringência que foi potencializada devido à maior quantidade de soro presente em sua formulação. O aumento da adstringência tem sido observado em testes sensoriais de bebidas lácteas com maiores níveis de soro, sendo o pH do produto apontado como causa (Lee and Vickers, 2008). Pode ocorrer ainda a interação das diferentes cargas das proteínas de soro com as proteínas da saliva (Beecher *et al.* 2008; Vardhanabhuti *et al.* 2010). No entanto, a extensão dessa agregação pode depender do pH da bebida láctea, da capacidade tamponante e do fluxo da saliva. Em geral baixos valores de pH e maiores fluxos de produção da saliva atenuam a adstringência (Kelly *et al.* 2010). Os resultados mostraram-se bem interessantes, uma vez que a aceitação das bebidas com níveis de soro entre 50 e 80% não deferiram estatisticamente da amostra controle (0% de soro na formulação), o que sugere um maior aproveitamento desse resíduo.

Aceitação Global Média

Para determinar os níveis de soro por aceitação global média, as soluções da equação apresentada na Figura 2 foram determinadas para Y=6, que equivale à opinião dos provadores: “gostei ligeiramente” e é a primeira opção dentro da região de aceitação da escala hedônica, sendo considerado um índice ou limite de qualidade (Munõz *et al.* 1992). Desse modo, a resolução da equação polinomial de

segunda ordem (Equação 1) resultou em duas soluções: 12 e 65% v/v de soro, respectivamente.

Mínima Diferença Significativa

O cálculo da Mínima Diferença Significativa, mostrado na Equação 04, resultou em um teor de soro de 4,26% (v/v), confirmando o caráter conservador dessa metodologia, na medida em que este foi o menor valor encontrado para a concentração de soro a ser adicionado na bebida láctea probiótica. Resultados semelhantes foram observados na otimização da concentração de lactose hidrolisada na fabricação do doce de leite (Giménez *et al.* 2008).

$$S = F - Z_{\alpha} \sqrt{\frac{2 \times MSE}{n}} = 5,25 - 1,96 \sqrt{\frac{2 \times 7,05}{55}} = 4,26\% \quad (\text{Eq.04})$$

Análise de Sobrevida

A metodologia de Análise de Sobrevida foi utilizada para estimar a concentração máxima de soro de leite, utilizando os resultados obtidos junto aos consumidores, quando perguntados se normalmente comprariam as amostras com diferentes concentrações de soro de queijo. Como não existem testes estatísticos para comparar a qualidade dos ajustes de diferentes modelos paramétricos utilizados para os dados intervalo-censurados, a avaliação visual dos modelos paramétricos para a estimativa não-paramétrica foi utilizada para escolher o modelo mais adequado (Giménez *et al.*, 2008) (Figura 1).

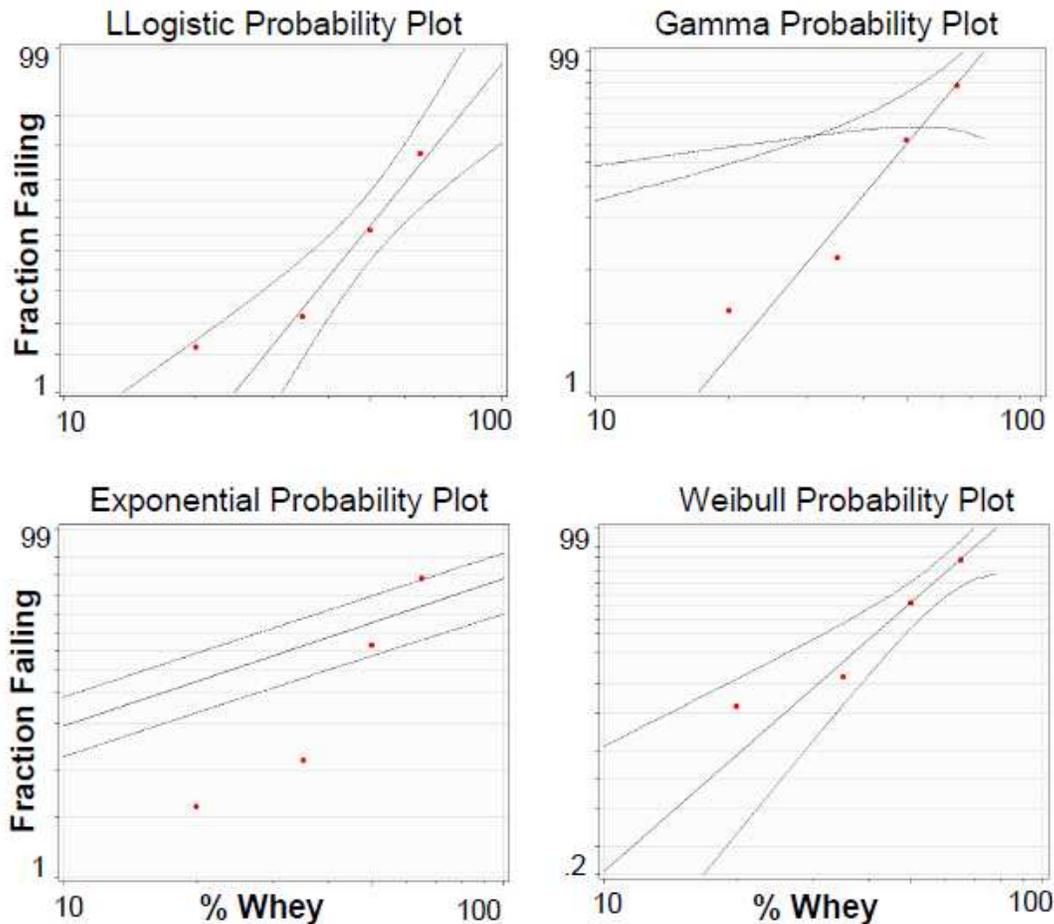


Figura 1: Probabilidade dos consumidores rejeitarem as bebidas lácteas probióticas com diferentes percentuais de soro de queijo de acordo com quatro modelos de distribuição (LLogistic, Gamma, Exponential e Weibull).

As distribuições de Weibull e LLogistic apresentaram ajustes mais apropriados. Sendo que a distribuição de Weibull foi escolhida por melhor adequação dos dados, e ser frequentemente aplicada em *Survival Analysis*. As estimativas de máxima verossimilhança dos parâmetros da distribuição Weibull correspondeu a: $\mu=3,98$ e $\sigma=0,26$. Estes parâmetros foram utilizados para traçar o gráfico do percentual de rejeição dos consumidores em função da porcentagem de soro de queijo presente na bebida láctea (Figura 2). Como apresentado na Figura 2, existe uma relação diretamente proporcional entre a concentração de soro na bebida láctea probiótica e a rejeição do consumidor, o que confirma os resultados do teste de aceitação.

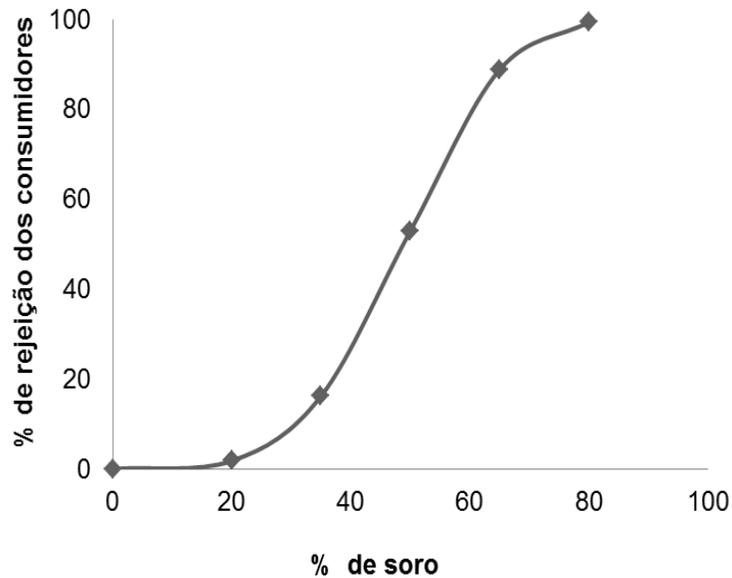


Figura 2: Rejeição percentual dos consumidores para bebidas lácteas probióticas com diferentes percentuais de soro de queijo, de acordo com a distribuição de Weibull.

Considerando 25 e 50% de rejeição dos consumidores, a Análise de Sobrevida indicou valores de 40 e 49% de soro nas formulações, respectivamente.

Entretanto, tendo em vista a elevada qualidade nutricional do soro, a necessidade cada vez mais evidente de reduzir custos de formulação, minimizar a emissão de substâncias poluentes e o aproveitamento do soro de queijo vão de encontro aos interesses da indústria de alimentos. Logo, a análise dos resultados apresentados pelas diferentes metodologias matemáticas permitiu selecionar duas formulações de bebidas probióticas: a primeira, determinada pela Análise de Sobrevida, contendo 49% de soro de queijo em sua formulação, e a segunda formulação contendo 65% de soro de queijo, pela Aceitação Global Média. Dessa forma, procurou-se conciliar a reação dos consumidores quando expostos a esses produtos, que é determinante na primeira aquisição e fidelização ao produto, atendendo às atuais demandas da indústria de alimentos.

Futuros estudos deverão incluir a utilização de testes sensoriais descritivos para determinação do perfil sensorial das bebidas lácteas, em comparação aos

produtos similares comerciais, bem como a adoção de metodologias para verificação da percepção dos consumidores com relação a esses produtos.

Conclusão

Os modelos matemáticos previamente utilizados para o desenvolvimento outros alimentos, mostraram ser adequados na seleção de formulações de bebidas lácteas probióticas. Os diferentes resultados encontrados por cada modelo se devem às características intrínsecas na obtenção dos resultados de cada uma das metodologias. Para o aproveitamento do maior volume de soro de queijo e para atender às exigências dos consumidores quando expostos ao produto, verificou-se que podem ser produzidas bebidas lácteas probióticas com 49% (obtida pela Análise de Sobrevida) e 65% de soro de queijo (obtida pela metodologia da Aceitação Global Média), respectivamente. Os resultados indicam que é possível aumentar o nível de soro na formulação das bebidas lácteas sem prejuízos na contagem de probióticos e aceitação sensorial, e desta forma justificar futuras alterações na legislação brasileira vigente.

Referências

Almeida, K.E., A.Y. Tamine and M.N. Oliveira. 2008. Acidification rates of probiotic bacteria in Minas frescal cheese whey. *LWT-Food Sci. Technol.* 41:311-316.

Almeida, K.E., A.Y. Tamine and M.N. Oliveira. 2009. Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. *LWT-Food Sci. Technol.* 42:672-678.

Araneda, M., G. Hough and E.W. De Penna. 2008. Current status survival analysis methodology to estimating sensory shelf life of ready to eat lettuce (*Lactuca sativa*). *J. Sens. Stud.* 23:162-170.

Ares, G., R. Baixauli, T. Sanz, P. Varela and A. Salvador. 2009. New functional fibre in milk puddings: Effect on sensory properties and consumers' acceptability. *LWT-Food Sci. Technol.* 42:710-716.

Beecher J.W., Drake M.A., Luck P.J. and Foegeding E.A. 2008. Factors regulating astringency of whey protein beverages. *J. Dairy Sci.* 91:2553-2560.

BRASIL, 2005. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Legislação. SISLEGIS: Sistema de Consulta à Legislação. Instrução Normativa n.16, de 23 de agosto de 2005. "Technical rules of Identify and Quality Whey-based Drinks." <<http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=7&data=24/08/2005>>

BRASIL, 2012. Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. ALICE: Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior. "System for Analysis of Foreign Trade Information via Internet (ALICEWEB)." <http://www.milkpoint.com.br/estatisticas/exportacoes_brasileiras.htm>

Castro, F.P., T.M. Cunha, P.J. Ogliari, R.F. Teófilo, M.M.C. Ferreira and E.S. Prudêncio. 2009. Influence of different content of cheese whey and oligofructose on the properties of fermented lactic beverages: Study using response surface methodology. *LWT-Food Sci. Technol.* 42:993-997.

Cruz, A.G., E.H.M. Walter, R.S. Cadena, J.A.F. Faria, H.M.A. Bolini, H.P. Pinheiro, and A.S. Sant'Ana. 2010. Survival analysis methodology to predict the shelf-life of probiotic flavored yogurt. *Food Res. Int.* 43:1444-1448.

Fluegel, S.M., T.D. Shultz, J.R. Powers, S. Clark, C. Barbosa-Leiker, B.R. Wright, T.S. Freson, H.A. Fluegel, J.D. Minch, L.K. Schwarzkopf, A.J. Miller and M.M. Di Filippo. 2010. Whey beverages decrease blood pressure in prehypertensive and hypertensive young men and women. *Int. Dairy J.* 20:753-760.

Gámbaro, A., A. Giménez, P. Varela, L. Garitta and G. Hough. 2004. Sensory shelf-life estimation of alfajor by survival analysis. *J. Sens. Stud.* 19:500-509.

Giménez, A., G. Ares and A. Gámbaro. 2008. Consumer reaction to changes in sensory profile of dulce de leche due to lactose hydrolysis. *Int. Dairy J.* 18:951-955.

Granato, D., G.F. Branco, A.G. Cruz, J.A.F. Faria and N.P. Shah. 2010. Probiotic dairy products as functional foods. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9:455-470.

Hough, G., M.L. Calle, C. Serrat and A. Curia. 2007. Number of consumers necessary for shelf life estimations based on survival analysis statistics. *Food Qual. Pref.* 18:771-775.

Hough, G., K. Langohr, G. Gomez and A. Curia. 2003. Survival analysis applied to sensory shelf life of foods. *J. Food Sci.* 68:359-362.

Hough, G., M.L. Puglieso, R. Sanchez and O.M. Silva. 1999. Sensory and Microbiological Shelf-Life of a Commercial Ricotta Cheese. *J. Dairy Sci.* 82:454-459.

Hough, G., R.H. Sánchez, G. Garbarini De Pablo, R.G. Sánchez, S. Calderón Villaplana, A.M. Giménez and A. Gámbaro. 2002. Consumer acceptability versus trained sensory panel scores of powdered milk shelf-life defects. *J. Dairy Sci.* 85:2075-2080.

Jacobo-Velázquez, D.A., P.A. Ramos-Parra and C. Hernández-Brenes. 2010. Survival Analysis Applied to the Sensory Shelf-Life Dating of High Hydrostatic Pressure Processed Avocado and Mango Pulps. *J. Food Sci.* 75:286-291.

Kelly, M.A., B. Vardhanabuthi, P.J. Luck, M.A. Drake, J. Osborne and E.A. Foegeding. 2010. Role of protein concentration and protein-saliva interactions in the astringency of whey proteins at low pH. *J. Dairy Sci.* 93:1900-1909.

Krešić, G., Z. Herceg, V. Lelas and A.R. Jambrak. 2010. Consumers' behaviour and motives for selection of dairy beverages in Kvarner region: a pilot study. *Mljekarstvo* 60:50-58.

Lee, C.A. and Z.M. Vickers. 2008. The astringency of whey protein beverages is caused by their acidity. *Int. Dairy J.* 18:1153-1156.

MacFie, H.J., N. Bratchell, K. Greenhoff and L.V. Vallis. 1989. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. *J. Sen. Stud.* 4:129-148.

Madureira, A.R., A.I. Pintado, A.M.P. Gomes, M.E. Pintado and F.X. Malcata. 2011a. Rheological, textural and microstructural features of probiotic whey cheeses. *LWT-Food Sci. Technol.* 44:75-81.

Madureira, A.R., C.I. Pereira, A.M.P. Gomes, M.E. Pintado and F.X. Malcata. 2007. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Res. Int.* 40:1197-1211.

Madureira, A.R., J.C. Soares, A.C. Freitas, M.E. Pintado, A.M.P. Gomes and F.X. Malcata. 2011b. Sweet whey cheese matrices inoculated with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* LAFTI[®] L26. *Dairy Sci. Technol.* 89: 649-655.

Madureira, A.R., J.C. Soares, A.M.P. Gomes, M.E. Pintado, A.C. Freitas and F.X. Malcata. 2008. Sweet whey cheese matrices inoculated with *Lactobacillus paracasei*. *Le Lait.* 88:649-665.

Madureira, A.R., M.S. Gião, M.E. Pintado, A.M.P. Gomes, A.C. Freitas and F.X. Malcata. 2005. Incorporation and survival of probiotic bacteria in whey cheese matrices. *J. Food Sci.* 70:160-165.

Madureira, A.R., T. Tavares, A.M.P. Gomes, M.E. Pintado and F.X. Malcata. 2010. Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *J. Dairy Sci.* 93:437-455.

Marshall, R.T. 1993. Standard methods for examination of dairy products. Washington: American Public Health Association.

Mortazavian, A.M., M.R. Ehsani, S.M. Mousavi, K. Rezaei, S. Sohrabvandi and J.A. Reinheimer. 2007. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic micro-organisms in yogurt. *Int. J. Dairy Technol.* 60:123-127.

Muñoz, A.M., V.G. Civille and B.T. Carr. 1992. *Sensory Evaluation in Quality Control*, Van Nostrand Reinhold, New York, NY.

Ranadheera, R.D.C.S., S.K. Baines and M.C. Adams. 2010. Review: Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res. Int.* 43:1-7.

Oliveira, M.N., I. Sodini, F. Remeuf, J.P. Tissier and G. Corrieu. 2002. Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures. *J. Food Sci.* 67:2336-2341.

Vanderzant, C., and D.F. Splittstoesser. 1992. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington: American Public Health Association. 3 ed.

Vardhanabhuti, B., M.A. Kelly, P.J. Luck, M.A. Drake and E.A. Foegeding. 2010. Roles of charge interactions on astringency of whey proteins at low pH. *J. Dairy Sci.* 93: 1890-1899.

Zhu, K., Z. Fan, C. Xu and L. Jia. 2009. Studies on impact of health factors on yogurt consumption behaviors of Beijing consumers. *J Chin. Inst. Food Sci. Technol.* 9:185-188.

Zoellner, S.S., A.G. Cruz, J.A.F. Faria, H.M.A. Bolini, M.R.L. Moura, L. M.J. Carvalho and A.S. Sant'ana. 2009. Whey beverage acai pulp as a food carrier of probiotic bacteria. *Aust. J. Dairy Technol.* 64: 165-169.

CAPÍTULO 3

BEBIDAS LÁCTEAS PROBIÓTICAS PROCESSADAS COM NÍVEIS CRESCENTES DE SORO: SOBREVIVÊNCIA E METABÓLITOS BACTERIANOS

Resumo

Bebidas lácteas fermentadas suplementadas com bactérias probióticas – *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* - contendo diferentes concentrações de soro em sua formulação, a saber: 0, 20, 35, 50, 65 e 80% (m/v) foram processadas e avaliadas quanto ao pH, ácidos orgânicos, compostos de aroma e contagem de bactérias lácticas e probióticas. Foi observado o efeito da concentração de soro presente nas bebidas lácteas nos diversos parâmetros analisados ($p < 0,05$). Parece existir um limite para que ele possa ser aproveitado pelas culturas microbianas, em especial as culturas probióticas. De forma geral, bebidas lácteas processadas com diferentes níveis de soro em sua formulação apresentam bom potencial como matriz alimentícia para suplementação de bactérias probióticas, com adequada produção de metabólitos orgânicos e compostos de aroma.

Palavras-chave: bebidas lácteas, probióticos, metabólitos, sobrevivência.

Introdução

O crescimento do mercado de leites fermentados constitui uma oportunidade ao desenvolvimento de bebidas derivadas de soro de queijo de elevados valores nutricionais e sensoriais, com redução nos custos do processo (Gallardo-Escamilla et al., 2005), na medida em que o nível de lactose e de outros nutrientes essenciais ao crescimento microbiano presentes naturalmente no soro de queijo proporcionam melhores condições para o crescimento e viabilidade dos micro-organismos (Panesar et al., 2007, Magalhães et al., 2011).

O soro de queijo já apresenta intrinsecamente diversos benefícios a saúde humana (Madureira et al., 2007), além de geração de peptídeos anti-hipertensivos (Madureira et al., 2010). Tem sido utilizado como matéria-prima para elaboração de filmes comestíveis antimicrobianos (Ramos et al., in press) e microcápsulas (Rodrigues et al., 2011). Recentemente o consumo de soro de queijo foi apontado como possível razão para maior longevidade de portugueses (Tavares and

Malcata, 2012). No que diz respeito aos produtos alimentícios processados, os lácteos contendo soro de queijo em sua formulação tem apresentado potencial para suplementação com bactérias probióticas, como queijos (Madureira et al. 2011) e bebidas lácteas (Dragone et al., 2009; Pescuma et al., 2010). Entretanto o impacto dos diferentes níveis da adição de soro de queijo na sobrevivência e metabolismo de bactérias probióticas ainda não foi avaliado. Neste sentido, este estudo tem como objetivo avaliar a contagem de probióticos e a formação de metabólitos em bebidas lácteas formuladas com diferentes níveis de soro.

Material e métodos

Processamento das bebidas lácteas probióticas

Para a formulação das bebidas probióticas foram utilizados leite pasteurizado (3% de gordura) e soro de queijo, obtido durante a fabricação de queijo Minas Frescal, pelo processo de coagulação enzimática, antes da etapa de salga (pH 6,26), fornecidos pela Fazenda São José (Santo Antônio de Posse, São Paulo, Brasil). Os inóculos foram preparados utilizando leite em pó desnatado (Molico, São Paulo, Brasil) reconstituído (11% m/v), e culturas de *Streptococcus thermophilus* – TA 40 (Danisco, Copenhagen, Dinamarca) e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* – LB 340 (Danisco), e culturas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* – La 14 (Danisco) e *Bifidobacterium lactis* – BI 07 (Danisco). Foram utilizados açúcar e preparado de fruta sabor morango, contendo polpa de morango e corante natural, cedido pela Industrial Duas Rodas (Jaraguá do Sul, Santa Catarina, Brasil).

Quatro litros de cada uma das seis bebidas lácteas foram processados em escala laboratorial, amostra controle (0% de soro), e amostras contendo 20, 35, 50, 65 e 80% de soro de queijo (v/v), sendo que o volume percentual restante foi completado com leite considerando o conteúdo de inóculo. O açúcar foi adicionado na concentração de 10% (m/v) de bebida probiótica e as misturas submetidas ao tratamento térmico 83°C por 15 minutos na planta piloto do Departamento de Tecnologia de Alimentos. Após o tratamento térmico, as misturas foram resfriadas em banho de gelo até 46°C, adicionado o preparado de

fruta a 1% (m/v), os inóculos do fermento na quantidade de 1% (v/v) e 2% (v/v) da cultura probiótica do volume de produto, mantidas à temperatura média de 45°C durante a fermentação. Ao atingir pH 4,7, a fermentação foi interrompida pelo resfriamento em banho de gelo até 8°C e armazenadas à $5 \pm 1^\circ\text{C}$. Os processamentos foram realizados em duas repetições.

Análises físico-químicas e microbiológicas

Enumeração de micro-organismos

Para as análises microbiológicas, as metodologias utilizadas foram: contagem de *S. thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* LB (Cruz et al., *in press*), contagem de *Bifidobacterium lactis* (Zacarchenco and Massaguer-Roig, 2004) e *Lactobacillus acidophilus* (Mortazavian et al., 2007). Todos os meios de cultura foram previamente testados, com o objetivo de garantir o crescimento seletivo desses micro-organismos. As análises microbiológicas foram realizadas em duplicata, 15 dias após o processamento.

Determinação do pH

Foi determinado segundo o método descrito por Marshall (1993). Realizado 15 dias após o processamento, por inserção direta do eletrodo do equipamento calibrado na amostra, utilizando aparelho DIGIMED (DM20, São Paulo, Brasil).

Atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi quantificada 15 dias após o processamento das bebidas lácteas, através da mensuração dos aminoácidos e peptídeos liberados pelas culturas de micro-organismos, utilizando a solução reagente contendo os seguintes reagentes: 0,5 g de dodecil sulfato de sódio (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), tetraborato de sódio decahidratado (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), 40 mg de o-ftaldialdeído (OPA) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e 1mL de metanol P.A. (Synth[®], Diadema, Brasil). A atividade proteolítica das culturas foi expressa em absorbância dos derivados do OPA a 340 nm. O relativo grau de proteólise foi

determinado como a diferença entre a atividade proteolítica da bebida láctea e atividade proteolítica da mistura soro e leite não fermentado (Church et al., 1983).

Quantificação de ácidos orgânicos e açúcares

Os ácidos orgânicos (ácido láctico e ácido acético) e açúcares (lactose e glicose) foram determinados após 15 dias de estocagem refrigerada, segundo Donkor et al. (2005).

Preparo da amostra

Foram adicionados em tubo de centrífuga 0,2 mL de ácido nítrico concentrado (15,5 mol. L⁻¹), 2 mL de água deionizada e 6 mL de amostra. A mistura foi centrifugada utilizando centrífuga (Nova Técnica, modelo NT 810, Piracicaba, Brasil) a 3500 rpm por 10 minutos para remoção de células e proteínas. O sobrenadante foi separado e o volume medido em proveta e filtrado em filtro Millipore de acetato de celulose (0,22 µm) e armazenado em frasco de vidro (*vial*) de 2 mL com septo de silicone até o momento da análise.

Método cromatográfico

A quantificação dos analitos: glicose, lactose, ácido láctico e ácido acético foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Foi utilizado cromatógrafo (Varian, modelo 9010, Califórnia, EUA) com injetor automático, detectores UV-Vis e Índice de Refração, conectados em série, coluna de troca iônica Aminex (HPX-87H, BioRad) de 300 mm x 7,8 mm x 9µm, aquecida a 35°C. A fase móvel foi H₂SO₄ (pH 2,60), com eluição isocrática e vazão 0,6 mL.min⁻¹. A detecção dos compostos foi realizada utilizando o detector UV-Vis fixado em 204nm (ácido láctico e ácido acético) e detector de índice de refração a 35°C (lactose e glicose). O tempo total da análise foi 20 minutos até que os 5 compostos pudessem ser separados e quantificados. Para identificação dos compostos, foi realizado *spiking* por injeção de padrões dos compostos a serem quantificados (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) para comparação dos tempos de retenção. Para quantificação foram construídas curvas de calibração externa,

utilizando os respectivos padrões em concentrações conhecidas e integração da área dos picos cromatográficos.

Quantificação de compostos voláteis

Os compostos voláteis (acetaldeído, diacetil e etanol) foram determinados após 15 dias de estocagem refrigerada, conforme Concurso et al. (2008).

Preparo da amostra

Dois gramas de amostra e 2 mL de solução saturada de NaCl foram adicionados em frascos de vidro (*via*) de 40 mL, fechados com septos de politetrafluretileno (PTFE) /silicone (Supelco - Bellefonte, PA, USA) e mantidos à temperatura de 40°C /15 min para equilíbrio. A fibra (Supelco, Bellefonte, PA, USA), 50/30µm divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) foi exposta por 30 min para extração dos compostos voláteis. Durante a extração, a amostra permaneceu sob agitação com auxílio de um agitador magnético do tipo “*stir bar*” a 750 rpm.

Método cromatográfico

Seguiu-se a metodologia descrita por Concurso et al. (2008) com algumas modificações. Após a extração, a fibra foi submetida à dessorção térmica a 250°C no injetor do cromatógrafo a gás por um período de 7 minutos. Para evitar efeito memória da fibra, realizou-se um branco da fibra entre cada extração, a fim de garantir a qualidade dos experimentos. Foi utilizado cromatógrafo à gás (Varian 3800, Califórnia, EUA), equipado com detector de ionização de chama e o software *Star Chromatography Workstation* (versão 4.5). Para a separação cromatográfica, empregou-se uma coluna capilar DB-WAX (J&W Scientific, EUA) (3000 mm x 0,25 mm x 0,25 µm). As condições de análises foram: injetor 250°C em modo *splitless*, por 1 min.; fluxo de purga do septo 20 mL. min⁻¹; gás de arraste (1mL. min⁻¹; rampa de temperatura a 40°C (10 s), elevando 3°C. min⁻¹ até 65°C, permanecendo nesta temperatura por 1 min).

Análises estatísticas

O experimento foi realizado em duas repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), considerando a bebida láctea probiótica como fonte de variação. Foram realizados testes de Tukey ($p < 0,05$), para avaliação da diferença entre médias. Todas as análises foram realizadas utilizando o software ASSISTAT (DEAG-CTRN-UFCG, versão 7.6 beta, 2011).

Resultados e Discussão

A Tabela 1 mostra os resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nas bebidas lácteas probióticas produzidas com diferentes níveis de soro. De forma geral, foi observado o efeito da concentração de soro presente nas bebidas lácteas nos diversos parâmetros analisados ($p < 0,05$), embora pareça existir um limite para que ele possa ser aproveitado pelas culturas microbianas, em especial as culturas probióticas. Isso pode ser entendido como uma vantagem, já que demonstra a possibilidade de desenvolvimento de produtos com altas concentrações de soro de queijo e com contagens expressivas de microorganismos benéficos à saúde humana. Porém, torna imprescindível a realização de testes com consumidores do produto para aperfeiçoar a formulação das bebidas, visando à produção de uma bebida probiótica e aceitável pelos consumidores.

As contagens de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* ($p > 0,05$) se apresentaram na faixa de $8 \log \text{ UFC.g}^{-1}$. Com relação às culturas probióticas, as contagens de *L. acidophilus* e *B. lactis* variaram de 8,69 a 8,83 e 3,00 a 4,54 $\log (\text{UFC. mL}^{-1})$, respectivamente, confirmando a aptidão da bebida láctea como matriz alimentícia capaz em ser suplementada com bactérias probióticas com contagens suficientes para benefícios a saúde humana, o que é corroborado com trabalhos prévios (Oliveira et al., 2002; Madureira et al., 2007; Zoellner et al., 2009). A baixa viabilidade de *B. lactis* pode ser atribuída à presença ou aumento do oxigênio dissolvido durante a preparação do inóculo ou processamento das bebidas durante a etapa de resfriamento, após fermentação, devido à agitação do produto para aumentar a troca de calor e minimizar a pós-acidificação. Resultados

semelhantes foram encontrados para outras linhagens de *Bifidobacterium*, como *B. longum* em queijo Cheddar (Fortin et al., 2011), demonstrando sua sensibilidade aos fatores inerentes ao processamento das bebidas lácteas. Entretanto, mesmo com uma menor contagem de *B. lactis* ($p < 0,05$), não houve diferença significativa para o nível de ácido acético encontrado nas bebidas ($0,45 - 0,59 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $p > 0,05$), que pode se constituir em uma vantagem sob o ponto de vista sensorial, pois um alto nível desse composto é responsável por decréscimo da aceitação de produtos lácteos probióticos (Granato et al., 2010; Cruz et al., 2012). Foi observado, ainda, diferença quanto ao nível de ácido láctico, com WB₈₀ apresentando menor concentração em relação a O, 20 e 35% ($p < 0,05$), indicando que mesmo com uma maior disponibilidade de peptídeos contidos no soro, há uma limitação com relação ao seu aproveitamento por parte das culturas probióticas.

Isso é confirmado pela semelhança entre os níveis de glicose presentes em todas as bebidas probióticas ($25 - 32,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $p > 0,05$), na medida em que esta é resultante do consumo da lactose pelas culturas lácticas. De fato, mesmo com aumento de soro na formulação das bebidas, com reflexos na quantidade de lactose presente, os resultados indicam que o metabolismo microbiano responsável pela hidrólise da lactose em galactose e glicose, ocorre igualmente em todas as formulações, e um nível máximo de aproveitamento pelas enzimas das culturas lácticas responsáveis por essa transformação.

Com relação aos compostos responsáveis pelo aroma, foi observado aumento nas concentrações de diacetil e acetaldeído, que foi proporcional à quantidade de soro na bebida ($p < 0,05$), o que pode ser positivo na medida em que estes compostos são responsáveis pelo aroma de produtos fermentados (Cheng, 2010). Como esses compostos são produzidos pelas culturas lácticas, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* (Pinto et al., 2009), pode ser indicativo que existe um impacto positivo dos maiores níveis do soro na formulação da bebidas, resultando em maior atividade metabólica das enzimas das culturas lácticas responsáveis pela produção desses compostos, embora isso não tenha resultado em maior viabilidade destas. Resultado semelhante foi observado em *B. longum* em queijo

cheddar (Scheller and O'Sullivan, 2011). Um fator adicional que pode estar relacionado à concentração de etanol é a presença da enzima álcool desidrogenase, metabolizando o acetaldeído em etanol. Esta enzima tem sido detectada em bactérias probióticas como *L. acidophilus* (Marshall and Cole, 1983), e pode explicar o sabor suave presente em iogurtes probióticos, como o acetaldeído apresenta menor limiar de detecção que o etanol. Um estudo mais aprofundado deverá abranger todo o armazenamento refrigerado das bebidas lácteas probióticas para obter resultados conclusivos.

Tabela 1- Análises microbiológicas (após 7 dias de estocagem a $5 \pm 1^\circ\text{C}$) e físico-químicas de bebidas lácteas (após 15 dias de estocagem a $5 \pm 1^\circ\text{C}$).

% Soro	pH	Atividade Proteolítica	ST	LB	LA	BL	Lactose mg.mL ⁻¹	Glicose mg.mL ⁻¹	Ácido Acético mg.mL ⁻¹	Ácido Láctico mg.mL ⁻¹	Diacetil μg.g ⁻¹	Acetaldeído μg.g ⁻¹	Etanol μg.g ⁻¹
0	4,09	0,39 ^{b,c}	8,77 ^a	8,31 ^a	8,83 ^a	4,24 ^a	25,7 ^b	25,0 ^a	0,45 ^a	8,89 ^a	31,05 ^d	3,83 ^e	40,41 ^d
20	4,07	0,29 ^c	8,66 ^a	8,28 ^a	8,69 ^a	4,15 ^a	26,3 ^b	26,4 ^a	0,59 ^a	8,74 ^a	63,13 ^c	14,53 ^{c,d}	73,67 ^a
35	4,14	0,46 ^b	8,82 ^a	8,02 ^a	8,70 ^a	4,15 ^a	30,7 ^{a,b}	29,4 ^a	0,52 ^a	8,45 ^a	44,00 ^{c,d}	8,55 ^{d,e}	70,15 ^{a,b}
50	4,08	0,47 ^b	8,63 ^a	8,05 ^a	8,77 ^a	3,00 ^b	35,2 ^a	28,9 ^a	0,45 ^a	8,06 ^{a,b}	109,18 ^b	26,22 ^b	52,52 ^{b,c,d}
65	4,11	0,64 ^a	8,82 ^a	8,02 ^a	8,78 ^a	4,00 ^a	36,5 ^a	32,5 ^a	0,54 ^a	7,14 ^{a,b}	37,60 ^d	21,14 ^{b,c}	47,02 ^{c,d}
80	4,07	0,48 ^b	8,73 ^a	8,08 ^a	8,69 ^a	4,54 ^a	35,5 ^a	30,3 ^a	0,50 ^a	6,08 ^b	256,00 ^a	43,32 ^a	62,80 ^{a,b,c}

S. thermophilus (ST), *L. bulgaricus* (LB), *L. acidophilus* (LA) e *B. lactis* (BL) estão em expressos em log UFC.mL⁻¹.

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam presença de significância estatística ($p < 0,05$) pelo Teste Tukey.

Conclusão

Os resultados desse trabalho indicam que bebidas lácteas processadas com crescentes níveis de soro em sua formulação, apresentam-se como matrizes alimentícias adequadas para suplementação de bactérias probióticas, independente da concentração de soro presente na formulação. De forma geral, adequada produção de ácidos orgânicos bem como de nível de compostos de aroma foram observados nas formulações. Não houve diferença entre as amostras para os níveis de glicose e ácido acético. E a concentração de ácido láctico foi inversamente proporcional ao nível de soro presente na formulação. Testes sensoriais hedônicos com consumidores do produto tornam-se necessários para avaliação da aceitação das bebidas, de forma a prover o desenvolvimento de produto lácteo probiótico com potencial de comercialização.

Referências

Cheng, H. 2010. Volatile flavor compounds in yogurt: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50:938–50.

Church, F.C., H.E. Swaisgood, D.H. Porter, and G.L. Catignani. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66:1219–27.

Condurso, C., A. Verzera, V. Romeo, M. Ziino, and F. Conte. 2008. Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry analysis of dairy product volatiles for the determination of shelf-life. *Int. Dairy J.* 18:819–25.

Cruz, A.G., R.S. Cadena, J.A.F. Faria, H.M.A. Bolini, C. Dantas, M.M.C. Ferreira, and R. Deliza. 2012. PARAFAC: Adjustment for modeling consumer study covering probiotic and conventional yogurt. *Food Res. Int.* 45:211–5.

Cruz, A.G., W.F. Castro, J.A.F. Faria, P.C.B. Lollo, J. Amaya-Farfán, M.Q. Freitas, D. Rodrigues, C.A.F. Oliveira, and H.T. Godoy. Probiotic yogurts manufactured with increased glucose oxidase levels: post acidification, proteolytic patterns, survival of probiotic microorganisms, and production of organic acid and aroma compounds. *J. Dairy Sci.* (*in press*).

Donkor, O.N., A. Henriksson, T. Vasiljevic, and N.P. Shah. 2005. Probiotic strains as starter cultures improve angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in soy yogurt. *J. Food Sci.* 70:375–81.

Dragone, G., S.I. Mussatto, J.M. Oliveira, and J.A. Teixeira. 2009. Characterization of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chem.* 112:929–35.

Fortin, M.-H., C.P. Champagne, D. St-Gelais, M. Britten, M.P. Fustier, and M. Lacroix. 2010. Effect of time of inoculation, starter addition, oxygen level and salting on the viability of probiotic cultures during Cheddar cheese production. *Int. Dairy J.* 21:75–82.

Gallardo-Escamilla, F.J., A.L. Kelly, and C.M. Delahunty. 2005. Influence of starter culture in flavor and headspace volatile profiles of fermented whey and whey produced from fermented milk. *J. Dairy Sci.* 88:3745–53.

Granato D., G.F. Branco, A.G. Cruz, J.A.F. Faria, and F. Nazarro. 2010. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts and products. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9:292–302.

Madureira, A.R., M. Amorim, A.M. Gomes, M.E. Pintado, and F.X. Malcata. 2011. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Res. Int.* 44:465–70.

Madureira, A.R., C.I. Pereira, A.M.P. Gomes, M.E. Pintado, and F.X. Malcata. 2007. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Res. Int.* 40:1197–1211.

Madureira, A.R., T. Tavares, A.M.P. Gomes, M.E. Pintado, and F.X. Malcata. 2010. *Invited review*: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *J. Dairy Sci.* 93:437–55.

Magalhães, K.T., G. Dragone, G.V.M. Pereira, J.M. Oliveira, L. Domingues, J.A. Teixeira, J.B. Almeida e Silva, and R.F. Schwan. 2011. Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. *Food Chem.* 126:249–53.

Marshall, R.T. 1993. Standard methods for the examination of dairy products. Washington: American Public Health Association.

Marshall, V.M., and W.M. Cole. 1983. Threonine and alcohol dehydrogenase activities in *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* and their contribution to flavour production in fermented milks. *J. Dairy Res.* 50:375–9.

Mortazavian, A.M., E.M. Ehsani, S.M. Mousavi, K. Rezaei, S. Sorrabvandi, and J.A. Reinheimer. 2007. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic microorganisms in yogurt. *Int. J. Dairy Technol.* 60:123–7.

Oliveira M.N., I. Sodini, F. Remeuf, J.P. Tissier, and G. Corrieu. 2002. Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures. *J. Food Sci.* 67:2336–41.

Panesar, P.S., J.F. Kennedy, D.N. Gandhi, and K. Bunko. 2007. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chem.* 105:1–14.

Pescuma, M., E.M. Hérbert, F. Mozzi, and G.F. de Valdez. 2010. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 141:73–81.

Pinto S.M., M.G. Clemente, and L.R. Abreu. 2009. Behaviour of volatile compounds during the shelf-life of yogurt. *Int. J. Dairy Technol.* 62:215-22.

Ramos Ó.L., S.I. Silva, J.C. Soares, J.C. Fernandes, M.F. Poças, M.E. Pintado, and F.X. Malcata. (*in press*). Features and performance of edible films obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. *Food Res. Int.*

Rodrigues, D., S. Sousa, T. Rocha-Santos, J.P. Silva, J.M. Sousa Lobo, P. Costa, M.H. Amaral, M.M. Pintado, A.M. Gomes, F.X. Malcata, and A.C. Freitas. 2011. Influence of L-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. *Int. Dairy J.* 21:869– 76.

Scheller, M., and D.J. O'Sullivan. 2011. Comparative analysis of an intestinal strain of *Bifidobacterium longum* and a strain of *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis* in Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 94:1122-31.

Tavares, T.G., and F.X. Malcata. 2012. The *Portuguese paradox*: Why do some inhabitants of Portugal appear to live so long when their diet is based on whey cheese? *Food Chem.*131:727–9.

Zacarchenco, P.B., and S. Massaguer-Roig. 2004. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. *Ciên. Tecnol. Alim.* 24: 674–9.

Zoellner, S.S., A.G. Cruz, J.A.F. Faria, H.M.A. Bolini, M.R.L. Moura, L.M.J. Carvalho, and A.S. Sant'Ana. 2009. Whey beverage with acai pulp as a food carrier of probiotic *bacteria*. *Aust. J. Dairy Technol.* 64:165–9.

CAPÍTULO 4

**Perfil de compostos de aroma, ácidos orgânicos e
parâmetros de qualidade em bebidas lácteas contendo
probióticos durante estocagem refrigerada**

Resumo

Foram realizadas análises para comparação da qualidade e estabilidade de bebidas lácteas fermentadas convencionais (não-probióticas) e bebidas lácteas probióticas formuladas com 49 e 65% de soro de queijo, estocadas sob refrigeração durante 35 dias. As bebidas lácteas foram avaliadas quanto ao pH, proteólise, viscosidade, contagens microbianas (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*) e seus metabólitos (ácido láctico e ácido acético) e compostos voláteis (etanol, diacetil e acetaldeído). Os resultados mostraram a necessidade de melhor padronização do produto o que poderá contribuir para aumento do consumo, uma vez que foram observadas, grandes variações quanto aos atributos de identidade e qualidade. As bebidas lácteas formuladas apresentaram resultados próximos aos produtos comerciais. Com base nesses resultados, faz-se necessária a avaliação sensorial de tais produtos para melhor caracterizar as bebidas lácteas, sejam probióticas ou não.

Palavras chave: bebidas lácteas, probióticos, vida de prateleira

Introdução

O soro habitualmente descartado como resíduo com elevado potencial poluidor, tornou-se atrativo à indústria de lácteos devido ao seu valor nutricional e de conversão do mesmo em bebidas lácteas (Gandhi and Patel, 1994, Almeida et al., 2008). Bebida láctea fermentada é o produto fermentado mediante a ação de cultivo de microrganismos específicos, e obtido a partir de leite ou leite reconstituído e/ou derivados de leite, reconstituídos ou não, fermentado ou não, com ou sem adição de outros ingredientes, onde a base láctea represente pelo menos 51% (cinquenta e um por cento) massa/massa (m/m) do total de ingredientes do produto (BRASIL, 2005). As culturas lácticas utilizadas nos processamentos de bebidas lácteas fermentadas são as mesmas para a produção de iogurtes (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*) que possuem atividade metabólica sobre proteínas, carboidratos e lipídios presentes no leite,

melhorando a digestibilidade e conservação, bem como promovendo melhorias sensoriais (aroma, sabor e textura) do produto final (Wood, 1997; Pescuma et al., 2008). Outros micro-organismos podem ser adicionados em lácteos fermentados, como por exemplo, bactérias probióticas dos gêneros lactobacilli e bifidobactérias, promovendo benefícios à saúde humana (Prasad et al., 1998, Dunne et al., 1999, Vinderola et al., 2002). Vários trabalhos tem abordado a capacidade de lácteos em veicular probióticos na alimentação humana, iogurtes (Cruz et al., in press, Ejtahed et al., 2011, Farnworth et al., 2007), queijos (Gomes et al., 2011, Ong and Shah, 2009, Buriti et al., 2005), sobremesas (Aragon-Alegro et al., 2007, Heenan et al., 2004, Hekmat and McMahon, 1992), porém, trabalhos abordando bebidas lácteas fermentadas probióticas ainda são poucos. Talvez isso se deva à imagem do produto estar associada como uma possível alternativa ao iogurte, com parcial substituição do leite por soro de queijo, permitindo redução de custos e, conseqüentemente, a falsa idéia de um produto menos nobre. Entretanto, o aumento do consumo de leites fermentados tornou-se uma oportunidade de avanço e desenvolvimento de produtos que contem soro de queijo, com interessantes características nutricionais e sensoriais sem a necessidade de elevados custos tecnológicos de produção (Sienkiewicz and Riedel, 1990, Gallardo-Escamilla et al., 2005). A vida de prateleira desse alimento é conseqüência da presença de produtos metabolicamente ativos, que provocam alterações durante a estocagem refrigerada, como a pós-acidificação, causada pela produção de ácido láctico (redução do pH) por *Lactobacillus bulgaricus* que leva a perda de viabilidade dos probióticos, prejudicando a qualidade do alimento (Dave and Shah, 1997, Pescuma et al., 2010). Trabalhos têm avaliado a substituição de sólidos do leite por sólidos de soro para melhorar a textura e reduzir defeitos como a sinérese em leites fermentados, especialmente em iogurtes (Modler and Kalab, 1983; González-Martínez et al., 2002; Gallardo-Escamilla et al., 2005). As alterações sensoriais causadas pela sinérese que é a separação da fase líquida e sólida e a mudança no perfil de ácidos orgânicos e voláteis em lácteos fermentados são as principais causas de rejeição de tais produtos. Este trabalho teve por objetivo caracterizar bebidas lácteas comerciais

convencionais (não probióticas) e bebidas probióticas (49 e 65% m/v de soro) quanto aos parâmetros de qualidade, compostos de aroma e ácidos orgânicos durante 35 dias de estocagem refrigerada. Espera-se com isso, fornecer informações para o desenvolvimento de bebidas lácteas probióticas ainda não disponíveis no mercado, e melhor padronização dos produtos já existentes, dadas às variações encontradas, mesmo que permitidas pela legislação brasileira vigente.

Material e métodos

Para a realização desse estudo foram selecionadas duas formulações de bebidas lácteas probióticas, com 49 e 65% (m/m) de soro, como descrito no Capítulo 2 (Modelos matemáticos para avaliar bebidas lácteas probióticas). As bebidas lácteas probióticas foram comparadas a outras quatro bebidas lácteas fermentadas comerciais sabor morango (não probióticas) adquiridas no mercado local de Campinas (São Paulo–Brasil). O estudo de estabilidade foi realizado durante 35 dias de estocagem refrigerada a $5 \pm 1^\circ\text{C}$.

Elaboração das bebidas lácteas probióticas

Para a formulação das bebidas probióticas foram utilizados leite cru e soro de queijo, obtido durante a fabricação de queijo Minas Frescal, pelo processo de coagulação enzimática, antes da etapa de salga, fornecidos pela Fazenda São José (Santo Antônio de Posse, São Paulo, Brasil). Os processamentos ocorreram em batelada na planta piloto de processamento do Laboratório de Embalagens da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP. Foi utilizado um tacho encamisado, que permite injeção de vapor e água gelada, com capacidade total de 40 litros. As culturas DVS de *Streptococcus. Thermophilus* – TA 40 (Danisco, Copenhagen, Dinamarca) e *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* – LB 340 (Danisco), e culturas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* – La 14 (Danisco) e *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* – BI 07 (Danisco) foram adicionadas nas concentrações de 0,1 g de probiótico e 0,05 g do fermento, ambos para cada litro de mistura (leite e soro). Foi utilizado açúcar (Caravelas – Ariranha-SP, Brasil) e

preparado de fruta sabor morango, contendo polpa de morango e corante natural, cedido pela Industrial Duas Rodas (Jaraguá do Sul, SC, Brasil). Foram formulados 30 litros de cada uma bebidas, contendo 49 e 65% (v/v) de soro de queijo. O açúcar foi adicionado na concentração de 10% (m/v) de bebida probiótica e as misturas submetidas ao tratamento térmico 83°C por 15 minutos. Após o tratamento térmico, as misturas foram resfriadas até 46°C, adicionado o preparado de fruta sabor morango a 1% (m/v), e as culturas DVS adicionadas ao produto e mantidas à temperatura média de 45°C durante a fermentação. Ao atingir pH 4,7, a fermentação foi interrompida pelo resfriamento até $10 \pm 2^\circ\text{C}$, envasadas manualmente em garrafas de polietileno tereftalato (PET), com tampa tipo rosca torção, 300 mL de volume total e armazenadas sob refrigeração ($5 \pm 1^\circ\text{C}$).

Bebidas lácteas comerciais

Bebidas lácteas fermentadas (não probióticas) sabor morango de quatro marcas distintas foram adquiridas no mercado local de Campinas (São Paulo-Brasil). As amostras de cada produto pertenciam ao mesmo lote de produção, e suas respectivas vidas de prateleira atendiam ao período em estudo (35 dias). Uma das marcas estudadas, considerada líder de mercado, estava acondicionada em garrafa de PEAD (polietileno de alta densidade) de 900 g. Os demais produtos eram apresentados em embalagem tipo almofada de PEBD (polietileno de baixa densidade) pigmentado com dióxido de titânio, sendo dois dos produtos em volume de 850 mL e o outro 1.000 mL. Todos os produtos adquiridos estavam devidamente rotulados e estocados em boas condições de refrigeração.

Enumeração de micro-organismos

Para as análises microbiológicas, as metodologias utilizadas foram: contagem de *S. thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* (Cruz et al., *in press*), contagem de *Bifidobacterium lactis* (Zacarchenco and Massaguer-Roig, 2004) e *Lactobacillus acidophilus* La 14 (Mortazavian et al., 2007). Todos os meios de cultura foram previamente testados, com o objetivo de garantir o crescimento

seletivo desses micro-organismos. As análises microbiológicas foram realizadas em duplicata.

Análises físico-químicas

As análises foram realizadas nos tempos 1, 10, 21 e 35 dias após o processamento das bebidas lácteas probióticas.

Acidez titulável e pH

Foram determinados segundo o método descrito por Marshall (1993). O pH foi determinado por inserção direta do eletrodo do equipamento calibrado na amostra, utilizando aparelho DIGIMED (DM20, São Paulo, Brasil). A acidez foi determinada em triplicata por titulação da amostra com solução Dornic (NaOH 0,1N) e o resultado expresso em graus Dornic (°D). A acidez titulável foi determinada nas amostras de leite e soro utilizadas para o processamento das bebidas lácteas probióticas.

Atividade proteolítica

O filtrado obtido pela mistura de 5mL de amostra e 10 mL de solução 0,75% (m/v) de ácido tricloroacético P.A. (Synth[®], Diadema, Brasil) foi coletado em béquer. Foram adicionados a tubo de tampa rosqueada 150 µL do filtrado e 3 mL do reagente obtido por 0,5g de dodecil sulfato de sódio (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), 0,9g tetraborato de sódio decahidratado (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), 40 mg de o-ftaldialdeído (OPA) (Sigma-Aldrich,) solubilizado em 1mL de metanol P.A. (Synth[®], Diadema, Brasil) e volume completado para 50 mL com água deionizada. A atividade proteolítica foi quantificada através da mensuração dos aminoácidos e peptídeos liberados pelas culturas de micro-organismos, e expressa em absorbância dos derivados do OPA a 340 nm. O grau relativo de proteólise foi determinado como a diferença entre a atividade proteolítica da bebida láctea e atividade proteolítica da mistura soro e leite não fermentado (Church et al., 1983).

Viscosidade

Foi realizada em reômetro (Brookfield, modelo DV-III, Massachusetts/USA) acoplado a banho termostático (Marconi, MA184, Piracicaba - Brasil) a 5°C. As leituras foram realizadas após 3 minutos do início do ensaio, utilizando sensor (número 21) com rotação de 25 rpm.

Análises de composição centesimal

As análises de composição centesimal (teor de gordura, teor de proteínas, extrato seco total e cinzas) foram realizadas em triplicata, seguindo os métodos oficiais descritos na Instrução Normativa nº 68 (Brasil, 2006).

Teor de gordura

Realizada pelo método de Bligh e Dyer.

Teor de proteínas

Foi realizado pelo método de micro-Kjeldahl, para caracterização das matérias-primas (leite e soro) utilizadas no processamento das bebidas lácteas probióticas.

Extrato seco total (sólidos totais)

Cinco gramas da amostra misturadas a 10g de areia tratada (J.T.Backer) com auxílio de bastão de vidro em cápsula de porcelana. O conjunto (amostra, areia, bastão e cápsula) foi pesado em balança analítica e deixado a 105°C em estufa até peso constante.

Cinzas

As amostras foram previamente secas em chapa aquecedora para reduzir a umidade ao ponto de evitar perda de amostra e o cadinho foi submetido à temperatura 550°C em mufla (Quimis, modelo 318, São Paulo, Brasil).

Quantificação de ácidos orgânicos e açúcares

Os ácidos orgânicos (ácido láctico e ácido acético) e açúcares (glicose e lactose) foram determinados nos tempos inicial (1 dia) e final (35 dias) do estudo de vida de prateleira segundo Donkor et al. (2005).

Preparo da amostra

Foram adicionados em tubo de centrifuga 0,2 mL de ácido nítrico concentrado ($15,5 \text{ mol. L}^{-1}$), 2 mL de água deionizada e 6 mL de amostra. A mistura foi centrifugada utilizando centrífuga (Nova Técnica, modelo NT 810, Piracicaba, Brasil) a 3500 rpm por 10 minutos para remoção de células e proteínas. O sobrenadante foi separado e o volume medido em proveta e filtrado em filtro Millipore de acetato de celulose ($0,22 \mu\text{m}$) e armazenado sob congelamento em frasco de vidro (*vial*) de 2 mL com septo de silicone até o momento da análise.

Método cromatográfico

A quantificação dos analitos: glicose, lactose, ácido láctico e ácido acético foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Foi utilizado cromatógrafo (Varian, modelo 9010, Califórnia, EUA) com injetor automático, detectores UV-Vis e Índice de Refração, conectados em série, coluna de troca iônica Aminex (HPX-87H, BioRad) de 300 mm x 7,8 mm x $9\mu\text{m}$, aquecida a 35°C . A fase móvel foi H_2SO_4 (pH 2,60), com eluição isocrática e vazão $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A detecção dos compostos foi realizada utilizando o detector UV-Vis fixado em 204nm (ácido láctico e ácido acético) e detector de índice de refração a 35°C (lactose e glicose). O tempo total da análise foi 20 minutos até que os 5 compostos pudessem ser separados e quantificados. Para identificação dos compostos, foi realizado *spiking* por injeção de padrões dos compostos a serem quantificados (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) para comparação dos tempos de retenção. Para quantificação foram construídas curvas de calibração externa, utilizando os respectivos padrões em concentrações conhecidas e integração da área dos picos cromatográficos.

Quantificação de compostos voláteis

Os compostos voláteis (acetaldeído, diacetil e etanol) foram determinados nos tempos inicial (1 dia) e final (35 dias) do estudo de vida de prateleira conforme Concurso et al. (2008).

Preparo da amostra

2 g de amostra e 2 mL de solução saturada de NaCl foram adicionados em frascos de vidro (*vial*) de 40 mL, fechados com septos de politetrafluretileno (PTFE) /silicone (Supelco - Bellefonte, PA, USA) e mantidos à temperatura de 40°C /15 min para equilíbrio. A fibra (Supelco, Bellefonte, PA, USA), 50/30µm divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) foi exposta por 30 min para extração dos compostos voláteis. Durante a extração, a amostra permaneceu sob agitação com auxílio de um agitador magnético do tipo “*stir bar*” a 750 rpm.

Método cromatográfico

Seguiu-se a metodologia descrita por Concurso et al. (2008) com algumas modificações. Após a extração, a fibra foi submetida à dessorção térmica a 250°C no injetor do cromatógrafo a gás por um período de 7 minutos. Para evitar efeito memória da fibra, realizou-se um branco da fibra entre cada extração, a fim de garantir a qualidade dos experimentos. Foi utilizado cromatógrafo à gás (Varian 3800), equipado com detector de ionização de chama e o software *Star Chromatography Workstation* (versão 4.5). Para a separação cromatográfica, empregou-se uma coluna capilar DB-WAX (3000 mm x 0,25 mm x 0,25 µm) J&W Scientific (EUA). As condições de análises foram: injetor 250°C em modo *splitless*, por 1 min.; fluxo de purga do septo 20 mL. min⁻¹; gás de arraste (1mL. min⁻¹; rampa de temperatura a 40°C (10 s), elevando 3°C. m in⁻¹ até 65°C, permanecendo nesta temperatura por 1 min).

Frações proteicas com SDS-PAGE

Os perfis protéicos de soroalbuminas, lactoferrinas, caseínas, β-lactoglobulinas, α-lactoalbuminas foram determinadas nas bebidas lácteas

utilizando método descrito por Laemmli (1970). A análise foi realizada um dia após o processamento das bebidas lácteas probióticas. Essa análise foi realizada para fins de comparação entre as amostras comerciais e as formuladas, uma vez que o nível de soro das amostras comerciais é desconhecido.

Análises estatísticas

O experimento foi realizado em duas repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), considerando a bebida láctea como fonte de variação. Foram realizados testes de Tukey ($p < 0,05$), para avaliação da diferença entre médias. Todas as análises foram realizadas utilizando o software ASSISTAT (DEAG-CTRN-UFCG, versão 7.6 beta, 2011).

Resultados e discussão

O leite (pH 6,65) e o soro (pH 6,60) utilizados para o processamento das bebidas lácteas probióticas, tiveram acidez titulável de 22,90 D e 12,23 D , respectivamente.

De acordo com a Tabela 1, todas as amostras atenderam à legislação brasileira para bebidas lácteas, que exige o mínimo de 1,2 g de proteínas de origem láctea para cada 100g de produto. Dos produtos avaliados, as amostras com 49% de soro e a comercial 3 foram as que apresentaram maiores níveis protéicos. Entretanto, as bebidas comerciais 1 e 2, tiveram níveis protéicos inferiores às demais.

Tabela 1– Composição centesimal das matérias-primas e bebidas lácteas.

Produto	Umidade (g/100g)	Proteínas (g/100g)	Lipídios (g/100g)	Cinzas (g/100g)
Leite*	86,59 ^b	3,78 ^a	3,74 ^a	0,80 ^b
Soro*	92,88 ^a	1,24 ^e	1,02 ^e	0,55 ^e
49% soro	81,50 ^e	2,61 ^b	2,14 ^b	0,62 ^{cd}
65% soro	81,76 ^d	2,04 ^c	1,41 ^d	0,60 ^d
Com.1	82,34 ^c	1,66 ^d	1,07 ^e	0,47 ^f
Com.2	81,40 ^e	1,69 ^d	0,93 ^e	0,89 ^a
Com.3	81,06 ^f	1,79 ^d	1,93 ^c	0,64 ^c
Com.4	78,41 ^g	2,52 ^b	2,05 ^{bc}	0,53 ^e

Letras minúsculas subscritas distintas numa mesma coluna indicam presença de diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras ($n=8$). * Matérias primas utilizadas nos processamentos das bebidas lácteas com 49 e 65% de soro. Com.1: bebida láctea comercial 1; Com.2: bebida láctea comercial 2; Com.3: bebida láctea comercial 3; e Com.4: bebida láctea comercial 4.

Quanto aos valores de pH das amostras (Figura 1), a comercial 4 apresentou menor pH inicial, 4,1, já as bebidas com 49 e 65% de soro foram as que apresentaram maiores valores de pH iniciais, 4,4 e 4,6, respectivamente. Porém, durante a estocagem refrigerada, ocorreu redução do pH (pós-acidificação), devido à produção de ácido lático e ácido acético. Essa redução de pH foi mais intensa (curvas com maior inclinação) nas bebidas probióticas, provavelmente devido à presença de co-culturas que aumentam a capacidade acidificante. Houve pouca variação de pH na amostra comercial 2 durante a estocagem, que pode ser explicada pela adição de fosfato tricálcico à formulação (descrito no rótulo). Sabe-se que o fosfato tricálcico atua como tamponante do meio, evitando variações bruscas no pH, que possivelmente contribuiriam para rejeição do produto.

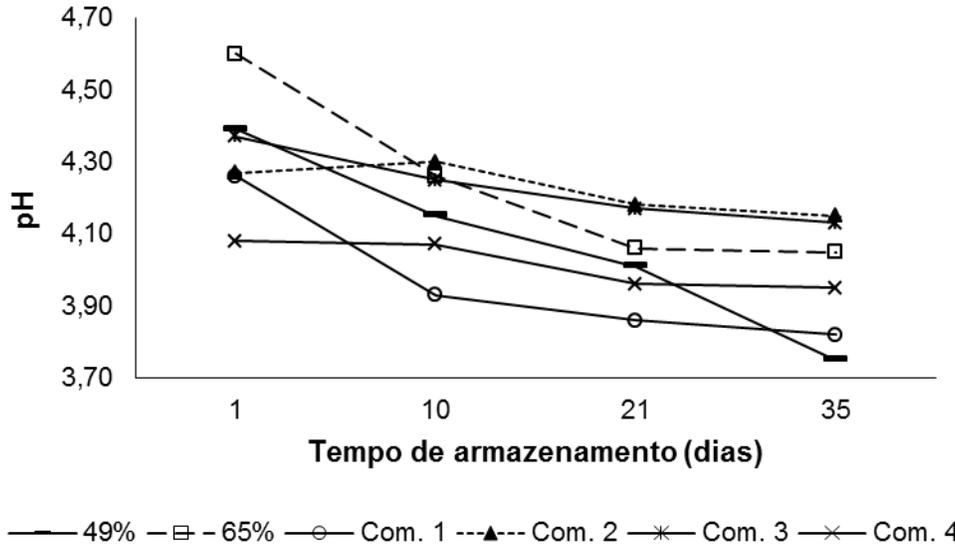


Figura 1: Variação do pH das amostras durante o armazenamento. 49%: bebida probiótica com 49% de soro, 65%: bebida probiótica com 65% de soro, Com.1: bebida comercial 1; Com.2: bebida comercial 2; Com.3: bebida comercial 3; e Com.4: bebida comercial 4.

Dada a semelhança entre bebidas lácteas fermentadas e iogurtes, o decréscimo de pH durante o armazenamento foi bastante semelhante entre esses produtos. Os valores de pH para bebidas lácteas estão próximos aos reportados para iogurtes de frutas contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Kailasapathy, Harmstorf, Phillips, 2008). Os autores avaliaram iogurtes probióticos durante 35 dias de armazenamento refrigerado, e encontraram valores na faixa de 4,5 e 4,4 para o tempo inicial e 4,3 e 4,2 no tempo final de estocagem.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) da proteólise (Figura 2) nas bebidas probióticas durante o armazenamento, sendo essas as amostras que apresentaram maior nível proteolítico em relação aos demais produtos. As amostras comerciais 2 e 3 diferiram quanto à proteólise, apenas após 21 dias de estocagem refrigerada. As amostras comerciais 1 e 4 apresentaram pouca variação proteolítica durante a estocagem, sendo que a comercial 1 foi a amostra que apresentou menor proteólise em relação às demais avaliadas.

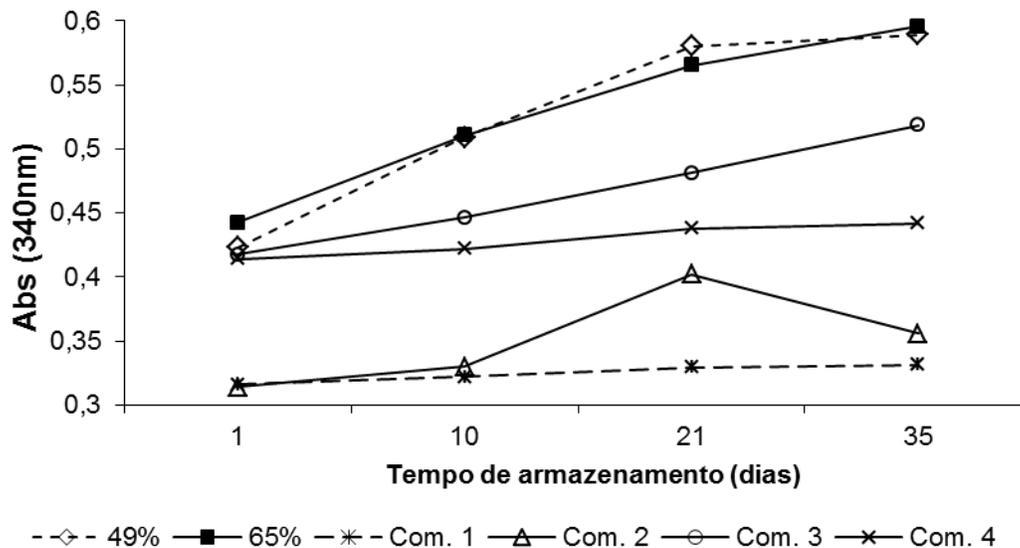


Figura 2: Proteólise das amostras durante o armazenamento. 49%: bebida probiótica com 49% de soro, 65%: bebida probiótica com 65% de soro, Com.1: bebida comercial 1; Com.2: bebida comercial 2; Com.3: bebida comercial 3; e Com.4: bebida comercial 4.

A atividade proteolítica das bactérias do ácido lático, incluindo bactérias do fermento e as probióticas têm sido estudadas extensivamente, sendo suas enzimas isoladas e caracterizadas (Shihata and Shah, 2000). Dessa forma, os resultados de proteólise encontrados para as bebidas probióticas, que foram superiores aos resultados das amostras comerciais 2 e 3 ($p < 0,05$), podem ser justificados pela atividade proteolítica também dos micro-organismos *L. acidophilus* e *B. lactis*, capazes de clivar as cadeias protéicas em oligopeptídeos e, ou aminoácidos livres.

A amostra comercial 2 (Figura 3) foi a que apresentou maior viscosidade durante todo o estudo, verificou-se que foi utilizado amido em sua formulação, o que certamente aumentou a viscosidade do produto. As amostras com 49 e 65% de soro foram formuladas sem a utilização de espessantes. No entanto, a amostra com 49% de soro apresentou maior viscosidade que a amostra comercial 1, que continha em sua formulação aditivos como amido modificado, pectina cítrica e gelatina em pó. A bebida probiótica com 65% não apresentou diferença

significativa ($p>0,05$) para a viscosidade em relação à amostra comercial 1, para nenhum dos tempos estudados. As amostras comerciais 3 e 4, também não diferiram entre si ($p>0,05$) quanto à viscosidade.

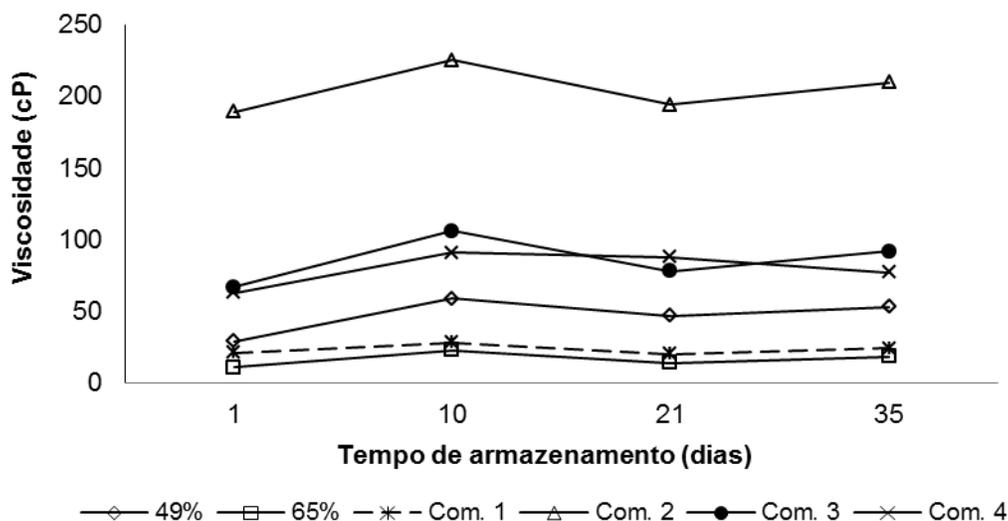


Figura 3: Perfil de viscosidade das amostras durante 35 dias de estocagem refrigerada. 49%: bebida probiótica com 49% de soro, 65%: bebida probiótica com 65% de soro, Com.1: bebida comercial 1; Com.2: bebida comercial 2; Com.3: bebida comercial 3; e Com.4: bebida comercial 4.

Os resultados de eletroforese (Figura 4) demonstram que algumas amostras possuíam menos leite que as demais, uma vez que a banda 3 (caseínas) é menos expressiva como nas amostras comerciais 1 e 2 (colunas B e C, respectivamente). Tais resultados comprovam as alegações do rótulo, uma vez que a amostra comercial 2, apresentava como ingrediente majoritário o preparado de morango. Igualmente para α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, as amostras 1 e 2 possuem menores frações dessas proteínas que as demais amostras avaliadas. As amostras probióticas, com 49 e 65% (colunas D e E, respectivamente), apresentaram maiores frações de β -lactoglobulina (Banda 2) em relação às outras amostras.

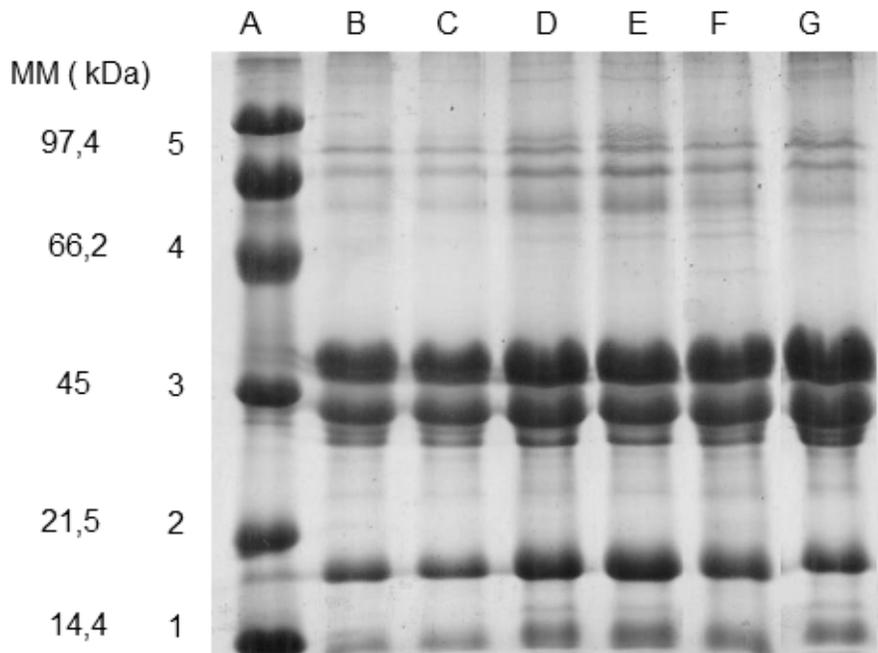


Figura 4: SDS-PAGE (15%) análise de grupos protéicos nas amostras: Coluna A, padrão; Coluna B, comercial 1; Coluna C, comercial 2; Coluna D, bebida probiótica com 49% de soro; Coluna E, bebida probiótica com 65% de soro; Coluna F, comercial 3 e Coluna G, comercial 4. Banda 1: α -lactoalbumina; Banda 2: β -lactoglobulina; Banda 3: caseínas; Banda 4: lactoferrina e Banda 5: soroalbuminas.

Durante o armazenamento, todas as amostras analisadas apresentaram contagens superiores a $7,30 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ para *Streptococcus thermophilus* (Tabela 2). Sendo a amostra comercial 4 a que apresentou menor contagem para esse micro-organismo. A amostra com 49% de soro sofreu redução significativa ($p < 0,05$) durante o armazenamento para *L. bulgaricus*, com redução de 2 ciclos log entre o tempo inicial e final. A amostra comercial 1 foi a que apresentou menor contagem inicial ($p < 0,05$) em comparação às demais para *L. bulgaricus*, tendo sua contagem final estimada em $1,4 \log \text{UFC.mL}^{-1}$. As bebidas probióticas, com 49 e 65% de soro, tiveram contagens de *Lactobacillus acidophilus* superiores a $7,45 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ durante todo o período de estocagem refrigerada. As contagens de *Bifidobacterium lactis* foram superiores a 6 ciclos log apenas para o tempo inicial, sendo que após 35 dias de estocagem refrigerada as contagens chegaram aos valores mínimos próximos a 4 ciclos logaritmos. Tal ocorrência pode ser explicada pela alta sensibilidade das bifidobactérias ao oxigênio. A incorporação de oxigênio

aos produtos pode ter ocorrido durante o processamento na etapa de resfriamento, mediante agitação para facilitar a troca de calor. Alguns autores têm utilizado tecnologias para reduzir a concentração de oxigênio presente em lácteos e minimizar o efeito tóxico sobre as bifidobactérias. Cruz et al. (2010) adicionaram enzima glicose oxidase em iogurtes probióticos contendo com *Bifidobacterium longum*. Os autores utilizaram superfície de resposta para otimizar a concentração de enzima capaz de viabilizar os probióticos e concluíram que 62,32 mg.L⁻¹ de glicose oxidase e 4,35 mg.L⁻¹ de glicose foi a melhor combinação para maximizar a contagem de *B. longum* em iogurte probiótico.

Kailasapathy et al. (2008) observaram maior viabilidade de *L. acidophilus* na faixa de pH de 4,1-4,5 a 4°C, e 4,4-4,5 para *B. animalis* subsp. *lactis*, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho, que demonstram maior sensibilidade do *B. lactis* às variações de pH durante o armazenamento. Entretanto, a sobrevivência dos probióticos durante o armazenamento também é variável em função da cepa utilizada. Ng et al. (2011) estudaram cinco cepas de *Lactobacillus acidophilus* em iogurtes fabricados com culturas lácticas, durante 28 dias de armazenamento a 4°C, e perceberam que a sobrevivência foi inferior à 10% após 28 dias e próximo a 100% em apenas uma das cepas estudadas.

Gueimonde et al. (2004) avaliaram a viabilidade das populações de probióticos dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em leites fermentados comerciais. Dos cinco produtos avaliados para *Lactobacillus*, todos apresentaram contagens próximas a 7 ciclos log, após cinco dias de armazenamento refrigerado, porém um amostra teve redução de dois ciclos log após 30 dias de armazenamento. Já dos sete produtos avaliados para *Bifidobacterium*, dois já apresentavam contagens inferiores a 6 log, após 5 dias de estocagem refrigerada, e contagens da ordem de 4 ciclos log após 30 dias. Tais resultados corroboram com os encontrados no presente trabalho, porém os níveis encontrados de *Lactobacillus acidophilus* superam os resultados encontrados para produtos avaliados pelos autores.

Tabela 2- Enumeração dos micro-organismos durante 35 dias de armazenamento a 5±1°C.

Amostras	Dias	ST	LB	LA	BL
49%	1	8,93 ^{aA}	7,91 ^{aA}	9,03 ^{aA}	6,37 ^{aA}
65%		8,71 ^{aB}	7,57 ^{aB}	9,05 ^{aA}	6,04 ^{aB}
Com.1		8,61 ^{aB}	6,00 ^{aD}	-	-
Com.2		8,54 ^{aB}	7,14 ^{aC}	-	-
Com.3		8,56 ^{aB}	7,94 ^{aA}	-	-
Com.4		8,69 ^{aB}	7,04 ^{aC}	-	-
49%	10	8,50 ^{bA}	7,78 ^{aA}	9,03 ^{aA}	5,43 ^{bA}
65%		8,43 ^{bA}	7,34 ^{bB}	8,43 ^{bA}	5,50 ^{bA}
Com.1		8,36 ^{bA}	4,36 ^{bD}	-	-
Com.2		8,50 ^{aA}	7,09 ^{aC}	-	-
Com.3		8,39 ^{bA}	7,66 ^{bA}	-	-
Com.4		8,32 ^{bA}	6,93 ^{aC}	-	-
49%	21	8,29 ^{cAB}	7,79 ^{aA}	8,79 ^{aA}	5,03 ^{cA}
65%		8,31 ^{bcAB}	6,98 ^{cC}	8,28 ^{bB}	5,36 ^{bA}
Com.1		8,32 ^{bA}	1,68 ^{cE}	-	-
Com.2		8,19 ^{bB}	7,10 ^{aC}	-	-
Com.3		7,41 ^{cC}	7,47 ^{bB}	-	-
Com.4		8,30 ^{bAB}	6,53 ^{bD}	-	-
49%	35	8,22 ^{cA}	5,70 ^{bC}	8,73 ^{aA}	4,27 ^{dB}
65%		8,18 ^{cAB}	7,10 ^{cA}	7,45 ^{cB}	4,97 ^{cA}
Com.1		8,07 ^{cB}	<1,40 ^{CD} (est.)	-	-
Com.2		7,30 ^{cC}	6,84 ^{bA}	-	-
Com.3		7,30 ^{cC}	7,06 ^{cA}	-	-
Com.4		8,05 ^{cB}	6,33 ^{cB}	-	-

**S. thermophilus* (ST), *L. bulgaricus* (LB), *L. acidophilus* (LA) e *B. lactis* (BL) estão em expressos em log UFC.mL⁻¹. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística (p<0,05) pelo teste Tukey durante o armazenamento das amostras (n=6). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística (p<0,05) pelo teste Tukey entre os tratamentos. 49%: bebida probiótica com 49% de soro, 65%: bebida probiótica com 65% de soro, Com.1: bebida comercial 1; Com.2: bebida comercial 2; Com.3: bebida comercial 3; e Com.4: bebida comercial 4.

Serra et al. (2009) encontram reduções significativas nas contagens de *Lactobacillus bulgaricus* em iogurtes produzidos com leite homogeneizado por alta pressão. Após 28 dias de estocagem as contagens de *L. bulgaricus* estiveram próximas a 2 ciclos log, resultados similares aos encontrados para a bebida láctea comercial 1.

As bebidas probióticas apresentaram os maiores níveis de lactose (Tabela 3) no tempo inicial, e a amostra com 49% de soro apenas não diferiu ($p>0,05$) da comercial 3, após 35 dias de estocagem. As amostras com 65%, comerciais 2, 3 e 4 não apresentaram variação significativa ($p>0,05$) quanto ao teor de lactose entre os tempos inicial e final. Para glicose, a amostra comercial 1, diferiu significativamente ($p<0,05$) das demais, para ambos tempos de estocagem avaliados. A amostra comercial 2 não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) durante a estocagem para o nível de ácido láctico. As amostras probióticas foram as que apresentaram menores teores de ácido láctico no tempo inicial, sendo que a amostra com 49% não diferiu ($p>0,05$) das amostras comerciais 1, 3 e 4 no tempo inicial. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre as concentrações iniciais e finais de ácido acético nas amostras probióticas. A amostra comercial 3 apresentou comportamento diferente das demais amostras, apresentando concentrações de etanol constantes ou decrescentes durante a estocagem, já a amostra 4 apresentou aumento significativo ($p<0,05$). Da mesma forma foi observado para o diacetil na amostra 1, que apresentou aumento significativo durante a estocagem. As bebidas probióticas diferiram entre si ($p<0,05$) no tempo inicial para diacetil, o que não foi observado no tempo final do estudo, pois, ambas não diferiram das amostras 2 e 3. A comercial 2 apresentou maior concentração de acetaldeído no tempo inicial e a comercial 4, menor concentração no tempo final, sendo as amostras com 65% e comercial 3, tiveram suas concentrações crescentes durante o armazenamento, os demais tratamentos apresentaram concentrações decrescentes durante a estocagem.

Tabela 3- Compostos voláteis e ácidos orgânicos derivados do metabolismo microbiano.

Amostras	Dia	Lactose (mg.mL ⁻¹)	Glicose (mg.mL ⁻¹)	Ácido Láctico (mg.mL ⁻¹)	Ácido Acético (mg.mL ⁻¹)	Diacetil (µg.g ⁻¹)	Acetaldeído (µg.g ⁻¹)	Etanol (µg.g ⁻¹)
49%		30,17 ^a	34,56 ^{cde}	4,55 ^{ef}	0,42 ^{ab}	64,79 ^{bc}	36,13 ^{bc}	227,21 ^{bc}
65%		32,61 ^a	36,10 ^{bcd}	3,82 ^f	0,42 ^{ab}	13,33 ^e	19,19 ^{ef}	85,51 ^{de}
Com.1	0	23,34 ^{bc}	46,89 ^a	5,25 ^{cde}	0,39 ^{abc}	67,87 ^b	35,74 ^{bc}	263,35 ^b
Com.2		20,66 ^{cd}	40,12 ^b	7,03 ^{ab}	0,24 ^{cde}	41,75 ^d	64,67 ^a	119,56 ^{de}
Com.3		23,73 ^{bc}	31,96 ^{de}	4,82 ^{def}	0,33 ^{abcd}	92,42 ^a	30,62 ^{cd}	155,20 ^{cd}
Com.4		13,43 ^e	33,79 ^{cde}	5,14 ^{cde}	0,23 ^{cde}	13,31 ^e	43,21 ^b	246,90 ^{bc}
49%		25,63 ^b	34,35 ^{cde}	7,05 ^{ab}	0,36 ^{abcd}	11,06 ^e	30,54 ^{cd}	71,85 ^{de}
65%		33,51 ^a	37,99 ^{bc}	5,69 ^{cd}	0,47 ^a	11,66 ^e	26,60 ^{de}	50,41 ^e
Com.1	35	9,44 ^e	48,19 ^a	5,96 ^{bc}	0,13 ^e	92,60 ^a	17,26 ^f	44,31 ^e
Com.2		18,43 ^d	38,04 ^{bc}	7,28 ^a	0,31 ^{abcd}	11,82 ^e	40,83 ^b	80,29 ^{de}
Com.3		21,82 ^{bcd}	30,41 ^e	5,18 ^{cde}	0,28 ^{bcde}	53,95 ^c	42,99 ^b	117,01 ^{de}
Com.4		13,38 ^e	33,87 ^{cde}	5,26 ^{cde}	0,22 ^{de}	10,63 ^e	6,99 ^g	623,86 ^a

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam presença de significância estatística ($p < 0.05$) pelo Teste Tukey entre as amostras ($n=6$). 49%: bebida probiótica com 49% de soro, 65%: bebida probiótica com 65% de soro, Com.1: bebida comercial 1; Com.2: bebida comercial 2; Com.3: bebida comercial 3; e Com.4: bebida comercial 4.

As concentrações de compostos voláteis apresentaram grande variação entre as amostras avaliadas e entre os tempos de armazenamento, isso pode ser atribuído à variedade de cepas de micro-organismos utilizados, probióticos ou não, pois mesmo as bactérias lácticas homofermentativas convertem completamente a fonte de energia disponível (lactose) em ácido láctico via piruvato para produzir energia e equilibrar o potencial redox. Entretanto, o piruvato pode originar outros metabólitos como etanol, acetato, diacetil e acetaldeído (Leroy and De Vuyst, 2004). Consequentemente, dando origem a vários compostos de sabor e aroma, com concentrações tão variáveis como as encontradas nesta pesquisa.

Conclusão

As bebidas lácteas apresentaram grande variabilidade nas características avaliadas. Isso pode ser atribuído à grande diversidade de aditivos permitidos pela legislação brasileira vigente. Ou ainda, pela substituição do soro por água na formulação de tais produtos. Sob o ponto de vista nutricional, as bebidas probióticas mostram-se de excelente potencial para a alimentação humana, além da capacidade expressiva em carrear micro-organismos probióticos, principalmente *Lactobacillus acidophilus*. Para obtenção de maiores contagens de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, alguns ajustes deverão ser realizados na linha de processamento, de maneira a minimizar a incorporação de oxigênio ao produto.

Mesmo ainda considerado como um alimento de baixo valor de mercado, o estudo demonstrou a viabilidade de desenvolvimento de bebidas lácteas fermentadas probióticas, que certamente aumentariam as possibilidades de aproveitamento do enorme volume de soro de queijo gerado, e tornaria disponível um produto com apelo à saúde pela adição de micro-organismos e funcionalidade de peptídeos do soro. Estudos sensoriais deverão ser realizados de maneira a caracterizar e avaliar a reação dos consumidores.

Referências

Almeida, K.E., A.Y. Tamine, and M. N. Oliveira. 2008. Acidification rates of probiotic bacteria in Minas frescal cheese whey. *LWT- Food Sci Technol.* 41:311 – 316.

Aragon-Alegro, L. C., J. H. A. Alegro, H. R. Cardarelli, M. C. Chiu, and S. M. I. Saad. (2007). Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. *LWT- Food Sci..Technol.* 40: 669-675.

Brasil, 2005. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. INSTRUÇÃO NORMATIVA N.º 16, DE 23 DE AGOSTO DE 2005. REGULAMENTO TÉCNICO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE BEBIDA LÁCTEA. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=gravarAtoPDF&tipo=INM&numeroAto=00000016&seqAto=000&valorAno=2005&orgao=MAPA&codTipo=&desItem=&desItemFim=>> Acessado 04 ago. 2011.

Brasil, 2006. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº68, de 12 de Dezembro de 2006. Métodos Oficiais de análises físico-químicas para produtos lácteos. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17472>> Acessado 12 abr. 2012.

Buriti, F. C. A., J. S. da Rocha, E. G. Assis, S. M. I. Saad. 2005. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. *LWT- Food Sci. Technol.* 38: 173-180.

Church, F. C., H. E. Swaisgood, D. H. Porter, and G. L. Catignani. 1983. Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. *J. Dairy Sci.* 66:1219–1227.

Concurso, C., A., V. V. Romeo, M. Ziino, and F. Conte. 2008. Solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry analysis of dairy product volatiles for the determination of shelf-life. *Int. Dairy J.* 18:819–825.

Cruz, A. G., J. A. F. Faria, E. H. M. Walter, R. R. Andrade, R. N. Cavalcanti, C. A. F. Oliveira, and D. Granato. 2010. Processing optimization of probiotic yogurt

containing glucose oxidase using response surface methodology. *J. Dairy Sci.* 93: 5059-5068.

Cruz, A. G., W. F. Castro, J. A. F. Faria, P. C. B. Lollo, J. Amaya-Farfán, M. Q. Freitas, D. Rodrigues, C. A. F. Oliveira, and H. T. Godoy. (*in press*). Probiotic yogurts manufactured with increased glucose oxidase levels: post acidification, proteolytic patterns, survival of probiotic microorganisms, production of organic acid and aroma compounds. *J. Dairy Sci.*

Dave, R.I., and N.P. Shah. 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yogurts made from commercial starter cultures. *Int. Dairy J.* 7: 31–41.

Donkor, O.N., S.I.I. Nilmini, P. Stolic, T. Vasijeciv and N.P. Shah. 2007. Survival and activity of selected probiotic organism in set-type yogurt during cold storage. *Int. Dairy J.* 17:657-665.

Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., G. G. Thornton, Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, E. M. M. Quigley, G. C. O'Sullivan, F. Shanahan, and K. Collins. 1999. Probiotics: From myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Ant. van Leeu.* 76:279–292.

Ejtahed, H. S., J. Mohtadi-Nia, A. Homayouni-Rad, M. Niafar, M. Asghari-Jafarabadi, V. Mofid, and A. Akabarian-Moghari. 2011. Effect of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. *J. Dairy Sci.* 94:3288–3294.

Farnworth, E. R., I. Mainville, M.-P. Desjardins, N. Gardner, I. Fliss, C. Champagne. 2007. *Int. J. Food Micr.* 116: 174-181.

Gallardo-Escamilla, F. J., A. L. Kelly, and C. M. Delahunty. 2005. Influence of Starter culture on flavor and headspace volatile profiles of fermented whey and whey produced from fermented milk. *J. Dairy Sci.* 88:3745–3753.

Gandhi, D. N., and R. S. Patel. 1994. Technology and keeping quality of fermented whey concentrate. *Cult. Dairy Prod. J.* 29:25-27.

Gomes, A. A., S. P. Braga, A. G. Cruz, R. S. Cadena, P. C. B. Lollo, C. Carvalho, J. Amaya-Farfán, J. A. F. Faria, and H. M. A. Bolini. 2011. Effect of the inoculation level of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic cheese on the phytochemical features and sensory performance compared with commercial cheeses. *J. Dairy Sci.* 94: 4777-4786.

González-Martínez, C., M. Becerra, M. Cháfer, A. Albors, J. M. Carot, and A. Chiralt. 2002. Influence of substituting milk powder for whey powder on yogurt quality. *Trends Food Sci. Technol.* 13:334–340.

Gueimonde, M., S. Delgado, B. Mayo, P. Ruas-Madiedo, A. Margolles, C. G. de los Reyes-Gavilán. 2004. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. *Food Res. Int.* 37:839-850.

Heenan, C. N., M. C. Adams, R. W. Hosken, and G. H. Fleet. 2004. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a non-fermented frozen vegetarian dessert. *LWT- Food Sci. Technol.* 37: 461-466.

Hekmat, S., and D. J. McMahon. 1992. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. *J. Dairy Sci.* 75:1415-1422.

Kailasapathy, K., I. Harmstorf, and M. Phillips. 2008. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in stirred fruit yogurts. *LWT – Food Sci. Technol.* 41:1317-1322.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.

Leroy, F. and L. De Vuyst. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15:67-78.

Marshall, R.T. 1993. *Standard Methods for Examination of Dairy Products*. Washington: American Public Health Association.

Modler, H. W., and M. Kalab. 1983. Microstructure of yogurt stabilized with milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66:430–437.

Mortazavian, A.M., E. M. Ehsani, S. M. Mousavi, K. Rezaei, S. Sorrabvandi, and J. A. Reinheimer. 2007. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic micro-organisms in yogurt. *Int. J. Dairy Technol.* 60:123–127.

Ng, E. W., M. Yeung and P. S. Tong. 2011. Effects of yogurt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus*. *Int. J. Food Micr.* 145: 169-175.

Ong, L., and N. P. Shah. 2009. Probiotic cheddar cheese: influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic profiles. *LWT- Food Sci. Technol.* 42:1260-1268.

Pescuma, M., E. M. Hébert, F. Mozzi, G. F. de Valdez. 2010. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. *Int. J. Food Micr.* 141:73-81.

Prasad, J., H. Gill, J. Smart, and P. K. Gopal. 1998. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int. Dairy J.* 8:993–1002.

Serra, M., A. J. Trujillo, B. Guamis and V. Ferragut. 2009. Flavour profiles and survival of starter cultures of yoghurt produced from high-pressure homogenized milk. *Int. Dairy J.* 19:100–106.

Shihata, A. and N. P. Shah. 2000. Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* 10:401–408.

Sienkiewicz, T., and C-L. Riedel. 1990. *Whey and Whey Utilization*. Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen-Baer, Germany.

Vinderola, C.G., G. A. Costa, S. Regenhardt and J.A. Reinheimer. 2002. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* 12:579–589.

Wood, B.J.B., 1997. *Microbiology of Fermented Foods*. Blackie Academic & Professional, London.

Zacarchenco, P.B., and S. Massaguer-Roig. 2004. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida-de-prateleira de leites

fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. Ciên. Tecnol. Alim. 24: 674-679.

CAPÍTULO 5

Avaliação de bebidas lácteas por ADQ, Perfil Livre e Mapa Projetivo utilizando grupos de assessores com diferentes graus de treinamento

Formatado segundo as normas do FOOD QUALITY AND PREFERENCE

Resumo

O objetivo desse trabalho foi avaliar sensorialmente bebidas lácteas comerciais e formuladas probióticas, por aplicação de testes de consumidor e testes descritivos. A percepção sensorial relatada por consumidores é essencial no desenvolvimento de produtos, visto que nenhum equipamento ou outro meio seja capaz de medir as sensações percebidas pelos humanos diante de um alimento. Inúmeros métodos podem ser utilizados para avaliar a qualidade sensorial, desde testes com consumidores (provadores não treinados) a testes com equipes treinadas e familiarizadas com a utilização de escalas hedônicas. Nesta pesquisa foram aplicados testes com consumidores (Aceitação e Escala do Ideal) utilizando um grupo de 120 pessoas e Mapa Projetivo (35 provadores não treinados) que avaliaram seis amostras de bebidas lácteas. Dois testes descritivos foram realizados, a Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) aplicada à equipe de 12 assessores altamente treinados, que avaliaram seis amostras de bebidas lácteas e Perfil Livre aplicado a 14 provadores não treinados, porém com experiência em testes descritivos, que avaliaram 5 amostras de bebidas lácteas. Em Perfil Livre foram levantados 14 termos descritores, sendo que dois fatores foram capazes de descrever 83% dos dados. Na ADQ os assessores utilizaram dez termos descritores e as duas primeiras componentes principais explicaram 87% dos dados para as seis amostras avaliadas. O Mapa Projetivo utilizado para caracterizar as amostras quanto às semelhanças foi explicado por 18 termos sensoriais e dois fatores (69% acumulado). No teste de aceitação, os consumidores foram organizados em 3 grupos de acordo com características demográficas e dados sensoriais. Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) foi aplicada em cada um dos grupos obtidos por HCA para correlacionar a aceitabilidade das bebidas lácteas (Y) e os termos descritores (variáveis-X) levantados na ADQ.

Palavras-chave: Análise Quantitativa Descritiva, Perfil Livre, Mapa Projetivo, Aceitação, Bebidas Lácteas Fermentadas.

1 Introdução

O perfil sensorial pode orientar a equipe de desenvolvimento de produtos de maneira a alterar a formulação dos mesmos, para se aproximar da referência que o consumidor possui para um produto específico (Moussaoui & Varela, 2010). Um modo eficaz de realizar comparações entre alimentos convencionais com o alimento em desenvolvimento é a realização de testes como análise descritiva e testes com consumidores (de Melo et al., 2009).

Testes descritivos são aplicados a uma equipe de assessores treinados, que geralmente passaram na seleção por meio de testes discriminativos, enquanto os testes afetivos são aplicados a um grupo de consumidores, sem treinamento, que irão expressar o quanto gostaram ou desgostaram do produto em teste (Stone & Sidel, 1993).

A dificuldade em ter amostras com características semelhantes durante todo o estudo sensorial se deve aos diversos fatores que contribuem para o fim da vida de prateleira das bebidas lácteas e iogurtes, como alteração das propriedades físico-químicas, mudanças na aparência e textura devido à pós-acidificação e à sinérese, aspectos importantes na aceitação pelos consumidores (Zare et al., 2011). A pós-acidificação ocorre devido à presença de micro-organismos viáveis que acabam por causar aumento de acidez durante o armazenamento refrigerado pela produção de ácidos orgânicos (Shah & Ravula, 2000).

A aceitação de bebidas lácteas fermentadas foi avaliada em diversos trabalhos, a maioria deles realizados no Brasil, por ser a origem do produto e possuir grande aceitação nesse país.

Bebidas lácteas sabor manga formuladas com 20, 40, 60 e 80% de soro foram avaliadas por 60 consumidores (Santos et al., 2008a). Quatro leites fermentados incluindo bebida láctea contendo *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus* foram avaliados por 35 consumidores (Zacarchenco & Massauguer-Roig, 2004). Sessenta consumidores utilizaram escala hedônica de 9 pontos para avaliar a aceitação de bebidas lácteas fermentadas sabor umbu, elaboradas com 20, 40, 60 e 80% (v/v) de soro de queijo (Santos et al., 2008b).

Penna et al., (2001) avaliaram a aceitação de bebidas lácteas sabor morango de cinco marcas comerciais, utilizando escala estruturada de 5 pontos (1=inaceitável a 5=excelente). Trabalhos que utilizam outros métodos sensoriais para avaliação de bebidas lácteas além do teste de aceitação ainda são limitados. Outro teste afetivo é a Escala do Ideal que auxilia na determinação do nível ótimo de um ou mais atributos do produto em teste no qual o consumidor não expressa o quanto gostou/desgostou da amostra, mas o quanto cada atributo dista ou se aproxima do ideal.

Recentemente, outros testes com consumidores vêm se tornando mais comuns, dentre eles o Mapa Projetivo. Mapa Projetivo é um método de análise multivariada na qual a coleta de dados ocorre a partir da disposição dos produtos avaliados em um plano cartesiano de acordo com as semelhanças e diferenças entre eles (Pagès, 2005, Albert et al., 2011). Essa metodologia tem sido usada para descrever vários produtos como queijo de leite de ovelhas (Bárcenas et al., 2004), chá gelado de limão (Veinand et al., 2011), avaliação de embalagens e informações contidas nos rótulos dos produtos com variação de cenários (Carrilo et al., 2012).

Como os testes afetivos acontecem em sessões únicas, por não serem função das sessões de levantamento de atributos, treinamentos e a aplicação do teste propriamente dito que requerem repetições, os testes descritivos tornam-se complicados e tediosos, seja pela pós-acidificação ou mesmo pela temperatura da apresentação das amostras (Albert et al., 2011).

A Análise Descritiva Quantitativa (QDA) é o método descritivo mais aplicado, e baseia-se no princípio de que o assessor selecionado seja capaz de verbalizar as percepções de um produto de maneira confiável. Nesses todos os membros da equipe sensorial após o treinamento utilizem de linguagem comum e consensual para obter a completa descrição quantitativa do produto (Stone et al., 1974, Moussaoui & Varela, 2010).

A metodologia descritiva de Perfil Livre foi desenvolvida partindo do princípio de que os provadores expressam de maneiras distintas os mesmos atributos sensoriais de um alimento. Dessa forma os provadores utilizam quantos

e quais atributos julgarem necessários, dispensando o treinamento para uniformidade da linguagem e utilização das escalas (Oreskovich et al. 1991, Deliza et al. 2005), permitindo redução no tempo de análise, mediante a não realização de sessões de treinamento.

Visto que nem sempre os dados de aceitação são homogêneos e apresentam normalidade, técnicas como a Análise Hierárquica de Grupos (HCA) baseiam-se na identificação de grupos de consumidores por meio do comportamento e semelhança nas notas da escala hedônica (Bayarri et al., 2011b). Portanto, os dados dos consumidores são analisados para os grupos em separado.

Ao relacionar dados de consumidores com dados descritivos, o pesquisador pode descobrir relações entre os atributos do produto (levantados por equipe treinada) e a aceitação do consumidor final (Meilgaard, Civille & Carr, 1999). Assim, a regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) permite modelar os dados de aceitação com base nos dados de painel treinado, com a identificação de subgrupos de consumidores com diferentes padrões de preferência (Bayarri et al., 2011a).

O objetivo desse estudo foi avaliar por aplicação de testes afetivos e descritivos bebidas lácteas probióticas sabor morango em comparação aos produtos comerciais similares não funcionais: Os testes foram o Mapa Projetivo, Aceitação e o Perfil Livre e Análise Descritiva Quantitativa (ADQ).

2 Material e métodos

2.1 Processamentos das bebidas lácteas

Para a formulação das bebidas probióticas foram utilizados leite cru e soro de queijo, obtido durante a fabricação de queijo Minas Frescal, pelo processo de coagulação enzimática, antes da etapa de salga, fornecidos pela Fazenda São José (Santo Antônio de Posse, São Paulo, Brasil). Os processamentos ocorreram em batelada na planta piloto de processamento do Laboratório de Embalagens da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP. Foi utilizado um tacho

encamisado, que permite injeção de vapor e água gelada, com capacidade total de 40 litros. As culturas DVS de *Streptococcus. Thermophilus* – TA 40 (Danisco, Copenhagen, Dinamarca) e *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* – LB 340 (Danisco), e culturas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* – La 14 (Danisco) e *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* – BI 07 (Danisco) foram adicionadas nas concentrações de 0,1 g de probiótico e 0,05 g do fermento, ambos para cada litro de mistura (leite e soro). Foi utilizado açúcar (Caravelas – Ariranha-SP, Brasil) e preparado de fruta sabor morango, contendo polpa de morango e corante natural, cedido pela Industrial Duas Rodas (Jaraguá do Sul, SC, Brasil). Foram formulados 30 litros de cada uma bebidas, contendo 49 e 65% (v/v) de soro de queijo. O açúcar foi adicionado na concentração de 10% (m/v) de bebida probiótica e as misturas submetidas ao tratamento térmico 83°C por 15 minutos. Após o tratamento térmico, as misturas foram resfriadas até 46°C, adicionado o preparado de fruta sabor morango a 1% (m/v), e as culturas DVS adicionadas ao produto e mantidas à temperatura média de 45°C durante a fermentação. Ao atingir pH 4,7, a fermentação foi interrompida pelo resfriamento até $10 \pm 2^\circ\text{C}$, envasadas manualmente em garrafas de polietileno tereftalato (PET), com tampa tipo rosca torção, 300 mL de volume total e armazenadas sob refrigeração ($5 \pm 1^\circ\text{C}$).

2.2 Bebidas lácteas comerciais

Bebidas lácteas fermentadas sabor morango de quatro marcas distintas foram adquiridas no mercado local de Campinas (São Paulo-Brasil). As amostras de cada produto pertenciam ao mesmo lote de produção, e suas respectivas vidas de prateleira atendiam ao período de estudo. Uma das marcas estudadas é líder de mercado, apresentada em garrafa de PEAD (polietileno de alta densidade) de 900 g. Os demais produtos estavam em embalagem tipo almofada de PEBD (polietileno de baixa densidade) pigmentado com dióxido de titânio, sendo dois produtos em volumes de 850 mL e o outro de 1000 mL. Todos os produtos adquiridos estavam estocados em boas condições de refrigeração e com informações dos rótulos bem visíveis.

2.3 Testes sensoriais

Para a realização de todos os testes sensoriais descritos nesse trabalho, houve aprovação prévia do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP (Sistema Nacional de Informações sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos - CAAE - 0030.0.146.000-10).

Os assessores em potencial foram recrutados na Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP (Campinas, Brasil). Os testes foram realizados nos Laboratórios de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) e do Departamento de Alimentos e Nutrição (DEPAN) – FEA/UNICAMP. As cabines de análise sensorial eram equipadas com iluminação branca (lâmpada fluorescente), com divisórias, em ambiente climatizado a 23°C.

Inicialmente, as pessoas que se disponibilizaram a participar dos testes foram orientadas a ler o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO I). Após a concordância do provador, foi apresentado ao mesmo a Ficha de Recrutamento (ANEXO II) para coleta de dados sensoriais e demográficos. E somente aqueles que alegaram não apresentar nenhum tipo de alergia ou rejeição ao produto em estudo, participaram das etapas seguintes. Entre a degustação de cada amostra, foi solicitado que os provadores consumissem biscoito *cream-craker* e água. Os efeitos *first-order* e *carry-over* foram balanceados através de delineamento próprio (MacFie et al,1989).

2.4 Metodologias descritivas

A etapa de pré-seleção dos provadores consistiu em realizar nove testes triangulares (ANEXO III), divididos em três sessões. Os testes foram aplicados utilizando amostras de iogurtes sabor morango formulados com diferentes teores de sacarose (7 e 11% m/v). Foram pré-selecionados os provadores com percentual de acerto maior ou igual a 70%.

Os provadores selecionados foram orientados a classificarem as amostras de acordo com os atributos sensoriais, para isso foi utilizado o Método de Rede (ANEXO IV), que consistiu na apresentação das amostras aos pares, com descrição de diferenças e similaridades entre elas.

2.4.1 Perfil livre

O Perfil Livre foi conduzido de acordo com o método descrito por Williams & Langron (1984). Inicialmente cada assessor realizou o método de Rede (ANEXO IV) para levantamento de atributos, que descreviam as amostras. Em outra sessão individual com cada assessor foram definidos os termos relevantes e o conceito de cada termo sensorial foi definido.

As fichas de cada provador foram elaboradas utilizando os atributos levantados na etapa anterior. Para auxiliar o assessor durante as análises das amostras, foram criadas listas com definições dos termos descritores. Como cada provador utilizou termos descritores para descrever as amostras, cada um possuía uma lista pessoal de definições dos termos, servindo para consulta durante os testes descritivos das amostras. A equipe de Perfil Livre foi composta por 14 provadores não treinados, porém com experiência prévia em testes descritivos.

Foram realizadas três repetições dos testes, realizadas em dias distintos para minimizar a fadiga sensorial. Os resultados foram tabulados e tratados por Análise Procrustes Generalizada (GPA), utilizando o software XLSTAT, *Trial Version* (Addinsoft).

2.4.2 Análise descritiva quantitativa (ADQ)

A Análise Descritiva Quantitativa foi realizada segundo o método descrito por Stone et al. (1974).

A partir do Método de Rede (ANEXO IV), em reunião com os 16 assessores, foram definidos os atributos que melhor descreviam as seis amostras de bebidas lácteas a serem avaliadas, bem como os padrões de extremidade da escala para cada um dos atributos. No encontro seguinte, os assessores avaliaram os padrões e julgaram necessário o aperfeiçoamento de alguns padrões, para melhor utilização da escala hedônica não estruturada de 9 cm.

Após a definição e concordância da equipe com os padrões e lista de definições (ANEXO V) dos termos descritores, sucederam as análises de validação do treinamento.

O treinamento foi validado da seguinte forma: o assessor provou cada amostra em 3 repetições que ocorreram em dias distintos, com delineamento em blocos completos balanceados, com apresentação monádica das amostras (ANEXO VI). Para a seleção final dos assessores, foram utilizados p de F amostra < 0,3 e p de F repetição > 0,05. A equipe final foi composta por 12 assessores, que realizaram mais quatro sessões de treinamento, utilizando os padrões e as amostras a serem avaliadas.

Os testes finais ocorreram em 3 sessões distintas e em turnos variados de acordo com disponibilidade de cada assessor.

Os resultados foram tabelados e analisados pelo SAS (*SAS Institute Inc.*) para avaliar os dados da ANOVA. O gráfico de teia, com as médias dos atributos sensoriais avaliados, foi obtido pelo Excel, versão 2007 (Microsoft Office) e para a Análise de Componentes Principais (ACP) foi utilizado o software XLSTAT, *Trial Version* (Addinsoft).

2.5 Testes afetivos

Os testes afetivos foram realizados com 120 consumidores recrutados na Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP.

Após os consumidores preencherem as fichas (ANEXO I e II), seis amostras foram apresentadas monadicamente em copos codificados com números de 3 dígitos contendo 30 mL de amostra. As amostras foram apresentadas a $6 \pm 1^\circ\text{C}$ em blocos completos balanceados (MacFie et al., 1989).

2.5.1 Teste de aceitação

Os consumidores foram instruídos a avaliar as bebidas lácteas quanto à aparência, aroma, sabor, textura e impressão global, utilizando escala hedônica estruturada (ANEXO VII – parte 1) de 9 pontos (variando de 1=desgostei extremamente até 9=gostei extremamente) (Villanueva & Da Silva, 2009). Adicionalmente, a aceitação e a intenção de compra do produto foram avaliadas utilizando escala binomial (sim/não).

Os dados foram tabelados e a Normalidade avaliada pelo ASSISTAT, versão 7.6 beta (2011). Em caso de não-Normalidade dos dados de cada amostra, procedeu-se a Análise Hierárquica de Grupos (HCA – *Hierarchical Cluster Analysis*) por XLSTAT *Trial Version* (Addinsoft). Grupos com número de consumidores inferiores a 30 devem ser evitados. A partir de cada grupo obtido, os valores médios de cada atributo para cada amostra foram calculados e os resultados expressos para cada grupo, em função do atributo de cada amostra avaliada.

A análise de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS-*Partial Least Squares*) foi aplicada a cada um dos grupos obtidos na HCA, na tentativa de obter modelos capazes de relacionar a impressão global (aceitação) das amostras com os termos descritores obtidos pela Análise Descritiva Quantitativa. Dessa forma, a aceitabilidade da amostra (componente -Y) foi prevista pelos termos descritores (variáveis - X). Foi utilizado o XLSTAT *Trial Version* (Addinsoft) para tratamento dos dados.

2.5.2 Escala do ideal

Os consumidores avaliaram seis amostras de bebidas lácteas para as seguintes características sensoriais: cor, acidez, doçura e textura. Foi solicitado aos mesmos expressar o quanto cada característica da amostra se encontrava mais ou menos ideal, utilizando uma escala estruturada de 5 pontos (ANEXO VII – parte 2).

Os resultados foram avaliados por XLSTAT *Trial Version* (Addinsoft).

2.5.3 Mapa projetivo

Foi utilizado delineamento em blocos completos balanceados, com apresentação monádica das amostras. Foram recrutados 35 consumidores de produtos lácteos fermentados para levantamento de 5 termos sensoriais descritores relevantes (ANEXO VIII) capazes de descrever cada uma das seis amostras de bebidas lácteas. Os assessores foram instruídos a projetar as amostras num plano apresentado na tela do computador de dimensões folha A4,

de acordo com seus critérios individuais, sendo que as amostras dispostas próximas foram consideradas semelhantes e as distantes apresentavam pouca similaridade (Pagès, 2005). Os dados com as coordenadas (x,y) de projeção das amostras e os termos sensoriais para descrição das mesmas compuseram a matriz de dados que foram analisados por XLSTAT *Trial Version* (Addinsoft).

3 Resultados e discussão

3.1 Perfil livre

Visto que as análises descritivas (Perfil Livre e ADQ) ocorreram em épocas distintas, uma das amostras utilizadas no estudo foi retirada de venda para reformulação do produto, segundo informações da rede de hipermercados onde as amostras eram adquiridas.

Houve variação entre o número de termos descritores levantados pela equipe, sendo o mínimo de nove termos e o máximo de quatorze, que foram considerados para a análise de GPA (*Generalized Procrustes Analysis*).

Para análise sensorial, preconiza-se um mínimo de 75% de variabilidade acumulada explicada, sendo que para a análise de Perfil Livre com dois fatores, foi obtido percentual de explicação igual 82,96% (Figura 1).

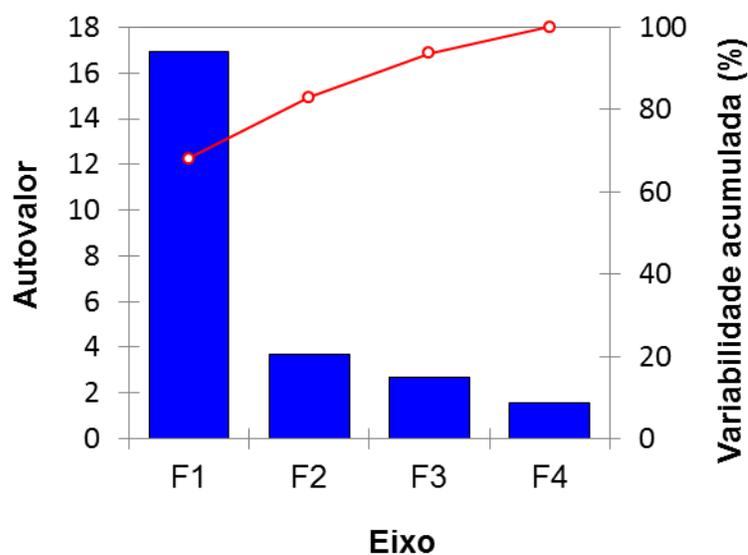


Figura 1: Variabilidade acumulada para os primeiros fatores (F) analisados por Análise de Procrustes Generalizada (GPA).

Os dados foram coletados em três repetições para cada assessor, porém no gráfico de Análise de Componentes Principais foi representada apenas a média das repetições. Como observado na Figura 2, o primeiro fator foi capaz de explicar 68,15% dos dados e o segundo 14,81%. Apesar, de não ter ocorrido treinamento dos assessores para a realização dessa análise descritiva, os assessores já possuíam experiência em testes descritivos e uso de escalas como ocorre em Análise Descritiva Quantitativa (ADQ), o que facilitou no levantamento de termos descritores e na definição dos mesmos.

A equipe de assessores conseguiu discriminar bem as amostras, uma vez que os respectivos códigos não se apresentam sobrepostos no gráfico.

A análise de componentes principais não é conclusiva, e apesar da metodologia de Perfil Livre não fornecer os coeficientes de Pearson para avaliação das correlações entre os vetores que representam cada um dos termos descritores, observa-se que alguns termos são contraditórios, o que pode ser devido à ausência de treinamento da equipe de assessores. Tais pontos contraditórios são a proximidade dos vetores de aroma artificial de morango e sabor natural de morango e a oposição dos vetores gosto ácido e aroma ácido.

Pela disposição no plano a amostra comercial 3 teve características sensoriais diferenciadas das demais amostras, dada a proximidade entre as amostras probióticas em relação à primeira componente principal, bem como as amostras comerciais 1 e 2.

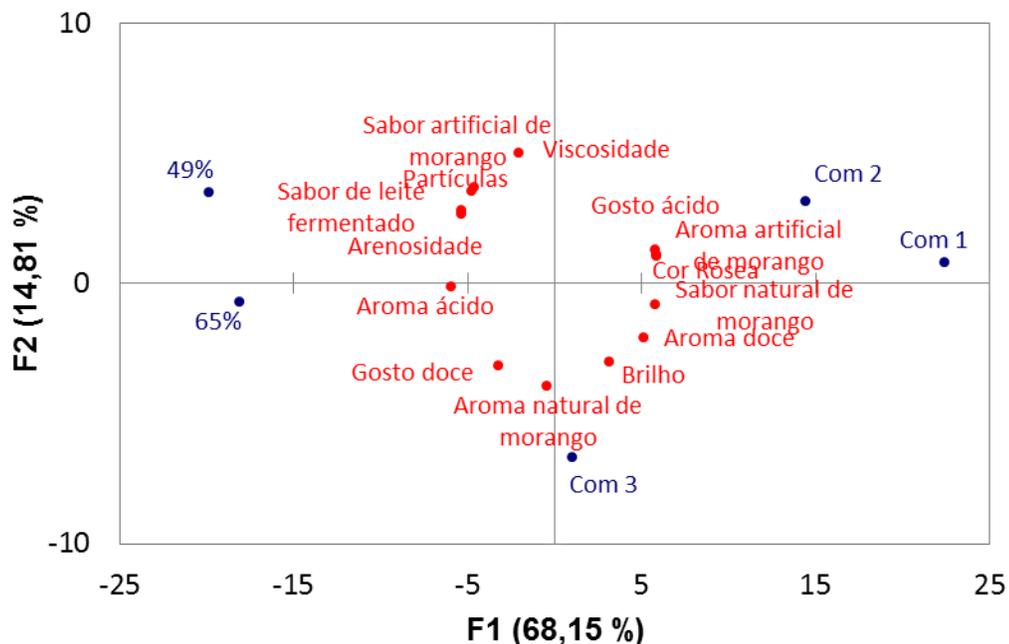


Figura 2: Análise de Procrustes Generalizada para cinco bebidas lácteas avaliadas por Perfil Livre (82,96%). A saber: 49%: bebida probiótica com 49% de soro, 65%: bebida probiótica com 65% de soro, Com.1: bebida comercial 1; Com.2: bebida comercial 2 e Com.3: bebida comercial 3.

3.2 Análise descritiva quantitativa

As médias dos atributos sensoriais para as seis amostras de bebidas lácteas avaliadas por 12 assessores treinados estão apresentadas na Tabela 1.

A amostra comercial 1 diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) das demais amostras para cor rósea, e as amostras probióticas foram as que apresentaram menor nota média para este atributo, o que já era esperado devido à utilização apenas de corante natural de morango.

Para viscosidade aparente, a amostra comercial 1 apresentou maior nota média em relação às demais ($p < 0,05$), enquanto que as amostras probióticas a com maior teor de soro (65%) foi a que apresentou menor média ($p < 0,05$).

Para aroma de iogurte natural as amostras com 49% e a comercial 3 não diferiram entre si ($p > 0,05$), mas foram as que apresentaram maior média.

Tabela 1: Média dos atributos sensoriais para cada amostra de bebida láctea.

ATRIBUTOS	49%	65%	Com. 1	Com. 2	Com. 3	Com. 4
Aparência						
Cor rósea	0,78 ^e	1,13 ^e	8,05 ^a	6,01 ^c	2,14 ^d	6,89 ^b
Viscosidade Aparente	2,36 ^d	1,43 ^e	2,84 ^d	6,88 ^a	4,06 ^c	5,12 ^b
Aroma						
logurte natural	3,76 ^{a,b}	3,11 ^b	0,92 ^c	3,33 ^b	4,51 ^a	0,83 ^c
Artificial de <i>tutti-frutti</i>	0,70 ^c	0,64 ^c	7,13 ^a	2,22 ^b	0,83 ^c	7,02 ^a
Morango	2,82 ^b	2,90 ^b	1,64 ^c	4,94 ^a	5,34 ^a	1,87 ^{b,c}
Sabor						
Gosto ácido	3,59 ^b	1,67 ^c	3,46 ^b	3,78 ^b	4,93 ^a	3,47 ^b
Gosto doce	3,76 ^d	5,19 ^{a,b}	5,80 ^a	4,33 ^{b,c,d}	4,11 ^{c,d}	4,93 ^{a,b,c}
Artificial de <i>tutti-frutti</i>	0,95 ^c	1,34 ^c	7,59 ^a	2,79 ^b	1,22 ^c	7,08 ^a
Morango	3,79 ^b	3,68 ^b	1,63 ^c	5,29 ^a	6,11 ^a	1,77 ^c
Textura						
Viscosidade	3,38 ^b	2,16 ^c	2,04 ^c	6,44 ^a	3,44 ^b	3,35 ^b

* Médias numa mesma linha seguidas por letras minúsculas subscritas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, (n=6). A saber: 49%: bebida probiótica com 49% de soro, 65%: bebida probiótica com 65% de soro, Com.1: bebida comercial 1; Com.2: bebida comercial 2; Com.3: bebida comercial 3; e Com.4: bebida comercial 4.

As amostras comerciais 1 e 4 apresentaram maiores médias para aroma artificial de *tutti-frutti* e as amostras probióticas e a comercial 3 apresentaram menores médias para o mesmo atributo.

As amostras comerciais 2 e 3 apresentaram maiores médias para aroma de morango, mas diferiram das demais (p<0,05).

Em relação ao gosto ácido, a amostra probiótica com 65% de soro foi a que apresentou menor média, diferindo das demais (p<0,05); a comercial 3 apresentou maior valor para gosto ácido e também diferiu das demais (p<0,05).

As amostras com 65% de soro e as comerciais 1,2 e 4 não diferiram entre si (p>0,05) para gosto doce.

As bebidas comerciais 1 e 4 foram as que apresentaram maior sabor artificial de *tutti-frutti*, enquanto que as bebidas probióticas e a comercial 3 foram as que tiveram menor média para o mesmo atributo.

Para sabor de morango as amostras 2 e 3 tiveram maiores médias, a comercial 4 menor média, mas as probióticas não diferiram entre si ($p>0,05$).

Com relação à viscosidade, a amostra 4 apresentou maior valor ($p<0,05$), as amostras com 49% de soro e comerciais 3 e 4 não diferiram entre si, e da mesma forma, as amostras com 65% de soro e comercial 1.

O perfil sensorial das seis amostras de bebidas lácteas pode ser visualizado na Figura 3.

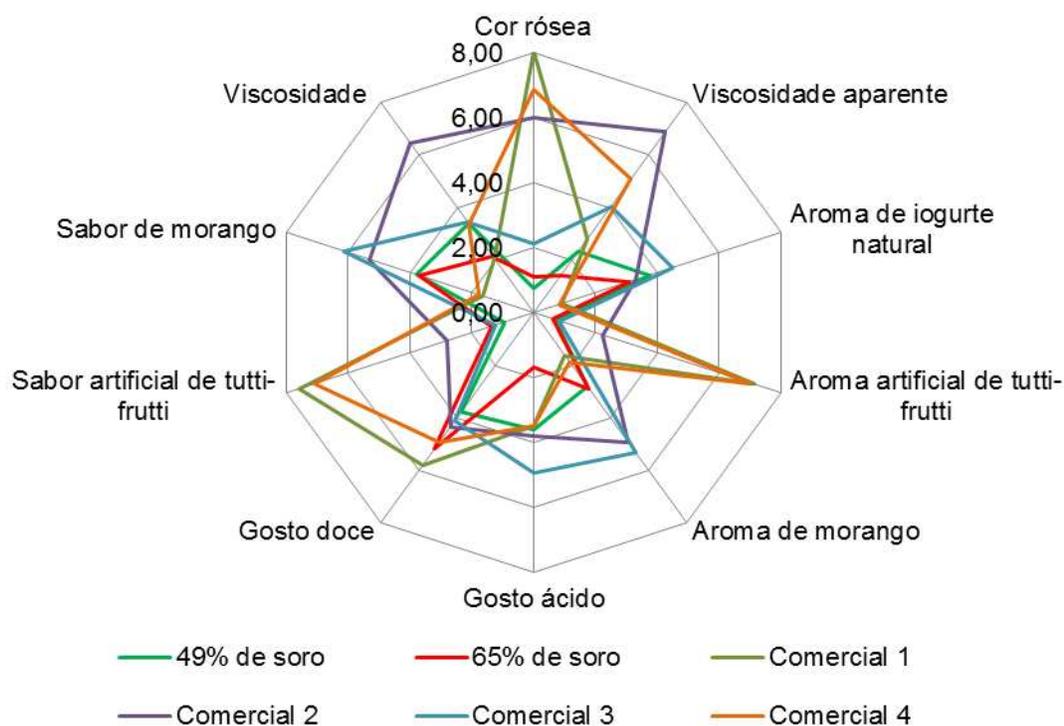


Figura 3: Gráfico de radar para os dez atributos avaliados durante a Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) em seis amostras de bebidas lácteas.

Por meio dos dados coletados para cada provador, em relação cada amostra, foi possível realizar a Análise de Componentes Principais (ACP) e a variabilidade acumulada em função do número de fatores é apresentado na Figura 4. Nota-se que dois fatores explicam juntos mais de 80% das variações entre as

amostras de bebidas lácteas. Fato esse que atende ao mínimo de 75% de explicação preconizada para métodos sensoriais com provadores treinados.

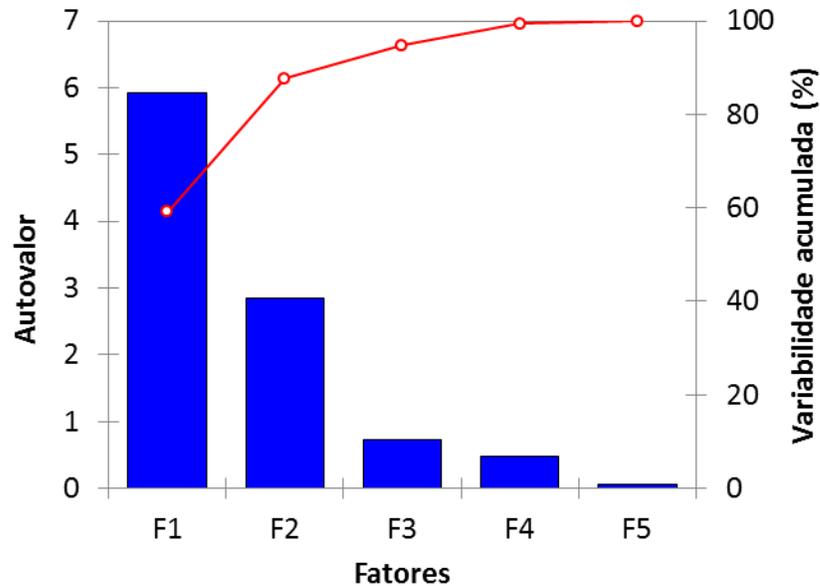


Figura 4: Variabilidade acumulada de explicação dos dados em função do número de fatores (F) para a Análise Descritiva Quantitativa.

A Figura 5 permite melhor visualização dos vetores que representam cada atributo, mesmo que sem representação das amostras.

A Componente Principal 1 está explicada pelos seguintes termos: gosto doce, aroma de iogurte natural, aroma de morango, sabor de morango, aroma artificial de *tutti-frutti* e sabor artificial de *tutti-frutti*.

A Componente Principal 2 está explicada pelos termos: viscosidade aparente, gosto ácido, viscosidade e cor rósea.

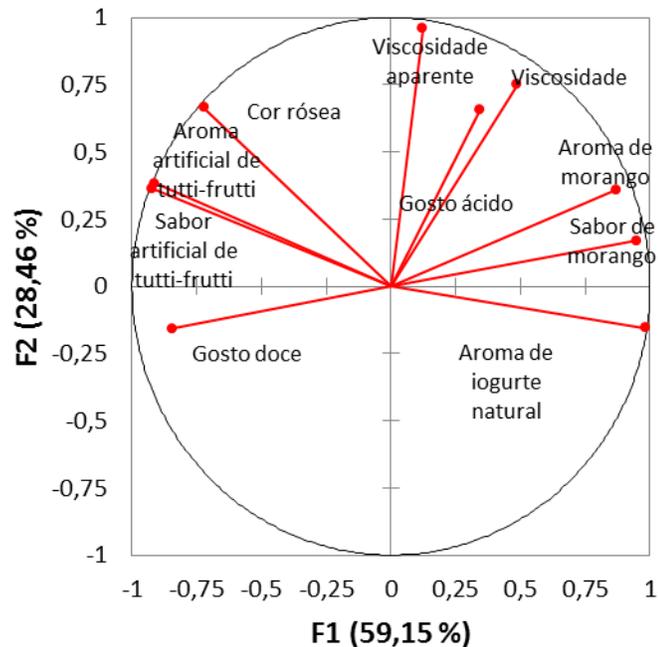


Figura 5: Análise de componentes principais para os dez atributos avaliados com dois fatores em Análise Descritiva Quantitativa (87,61%).

Os testes sensoriais foram realizados em triplicata para cada provador, porém para a realização da Análise de Componentes Principais foram utilizados os valores médios de cada provador para cada atributo. Portanto, a representação das amostras (Figura 6) é dada por pontos na cor azul, e não por triângulos, nos quais cada vértice expressa uma repetição.

A amostra 1 (Com 1) ficou caracterizada pelo aroma e sabor artificial de *tutti-frutti* e pelo gosto doce. A amostra 2 (Com 2) ficou caracterizada pela viscosidade aparente, gosto ácido e viscosidade. A amostra 3 (Com 3) foi melhor caracterizada pelo aroma de morango e sabor de morango. A amostra 4 (Com 4) ficou caracterizada pela cor rósea. A amostra probiótica com 49% de soro ficou melhor caracterizada pelo aroma de iogurte natural, todavia a respeito da amostra com 65% de soro nada se pode afirmar.

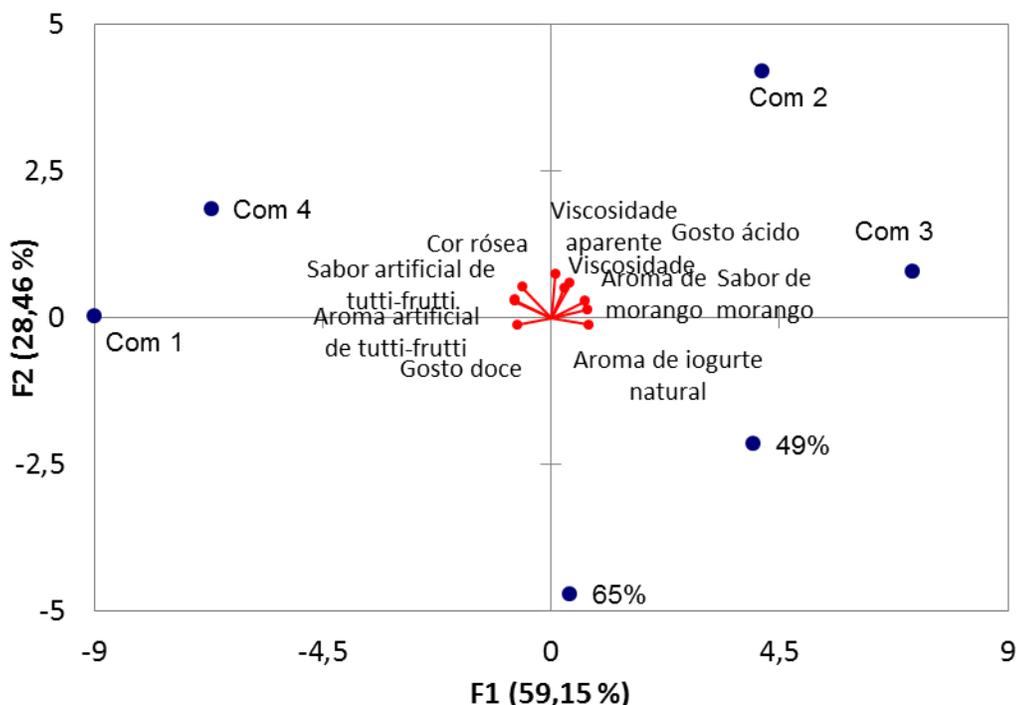


Figura 6: Análise de componentes principais para os dez atributos avaliados em seis amostras de bebidas lácteas avaliadas por Análise Descritiva Quantitativa (87,61%). A saber: 49%: bebida probiótica com 49% de soro, 65%: bebida probiótica com 65% de soro, Com.1: bebida comercial 1; Com.2: bebida comercial 2; Com.3: bebida comercial 3; e Com.4: bebida comercial 4.

3.3 Mapa projetivo

O Mapa Projetivo, apesar de ser um teste afetivo com consumidores, o qual não requer treinamento dos assessores que participam da análise, possibilita a descrição e caracterização das amostras avaliadas.

A técnica de coletas de termos descritores consistiu no levantamento de 5 termos capazes de descrever cada amostra, além das disposições das amostras num plano apresentado na tela do computador, no qual o assessor posicionava as amostras conforme critérios próprios de similaridade e diferenças entre as amostras.

Por se tratar de uma análise multivariada a matriz de dados é composta pelos termos levantados pelos assessores, levando-se em consideração o número

de vezes que cada termo foi citado e as coordenadas (x,y), fornecidas pelo posicionamento das amostras no plano cartesiano.

Pela análise de componentes principais, observou-se que duas componentes já explicam aproximadamente 70% dos dados coletados (Figura 7).

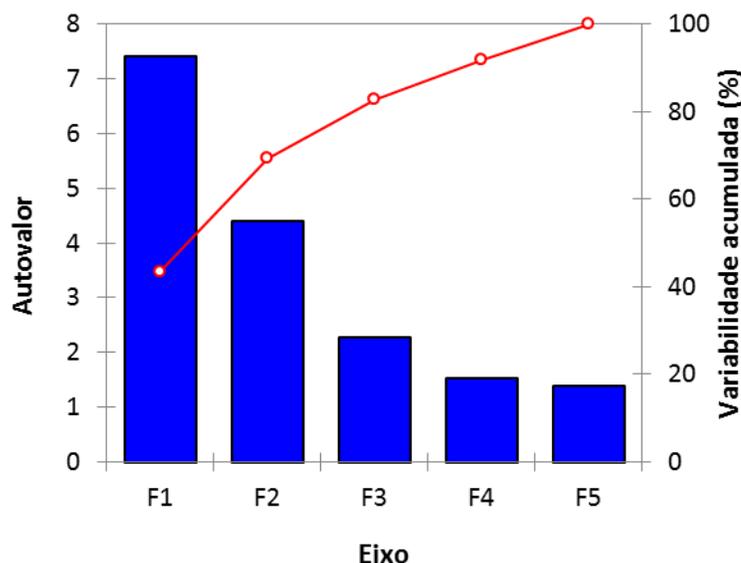


Figura 7: Percentual de variabilidade acumulado (69,38%) em função dos dois primeiros fatores (F) avaliados por Mapa Projetivo.

O fator 1 (43,55%) está explicado pelos termos descritivos de fluidez, sabor de leite, aroma de morango, gosto ácido, aroma estranho, viscosa, cor e sabor residual. O fator 2 (25,83%) está explicado por sabor de queijo, gosto amargo, gosto doce, sabor estranho, sabor artificial de morango, adstringência, arenosidade, aparência e sabor natural de morango.

A amostra 1 (Com 1) foi caracterizada pelo gosto doce, sabor estranho e sabor artificial de morango. A amostra 2 (Com 2) foi caracterizada pelos termos sabor residual, cor e viscosa. A amostra 3 (Com 3) ficou caracterizada pela fluidez, aroma de morango e sabor de leite. A amostra 4 (Com 4) caracterizou-se pelos termos: arenosidade, adstringência, sabor residual e sabor artificial de morango. A amostra probiótica com 49% de soro ficou caracterizada pelos termos: gosto amargo, gosto ácido e viscosa. A amostra probiótica com 65% de soro caracterizou-se pelos termos aparência, sabor natural de morango e sabor de leite.

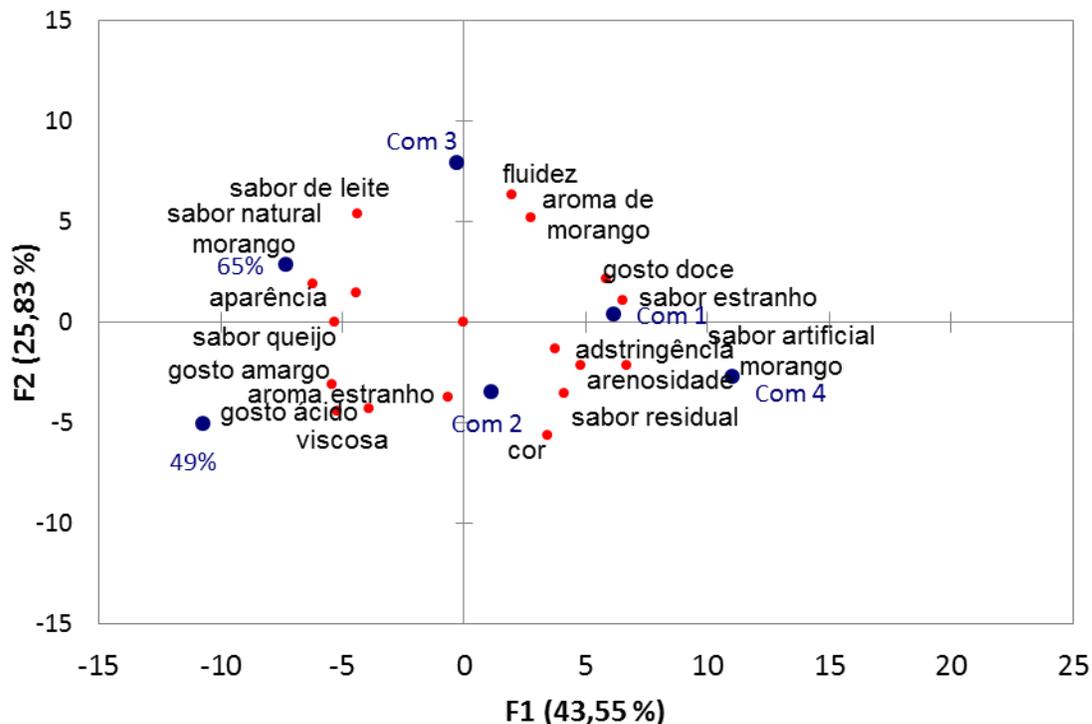


Figura 8: Análise Múltipla de Fatores (MFA) para seis bebidas lácteas avaliadas em função dos atributos sensoriais levantados por Mapa Projetivo. A saber: 49%: bebida probiótica com 49% de soro, 65%: bebida probiótica com 65% de soro, Com.1: bebida comercial 1; Com.2: bebida comercial 2; Com.3: bebida comercial 3; e Com.4: bebida comercial 4.

3.4 Escala do ideal (*Just About Right*)

As amostras de bebidas lácteas foram avaliadas para os atributos de cor, doçura, acidez e textura, e quanto cada um desses se aproxima do ideal para cada um dos consumidores.

A amostra comercial 1 (Figura 9) foi avaliada como ideal para os quatro atributos para pelo menos 52% dos consumidores. A amostra comercial 2 foi avaliada como ideal para cor e acidez para 50% dos consumidores, para 40% dos consumidores a doçura do produto está ideal, e a textura foi avaliada como ideal por apenas 33% dos avaliadores. Cinquenta e oito por cento dos consumidores avaliaram a cor e a doçura como ideais para a amostra comercial 3, 48% julgaram como acidez ideal 34% como textura ideal. Para a amostra comercial 4, 28%

julgaram a cor como ideal, e 46% julgaram a cor como sendo extremamente mais intensa que a ideal. 43% dos consumidores julgaram a doçura como ideal, 39% como acidez ideal e 14% como textura ideal, sendo que 46% julgaram a textura como sendo extremamente menos intensa que a ideal.

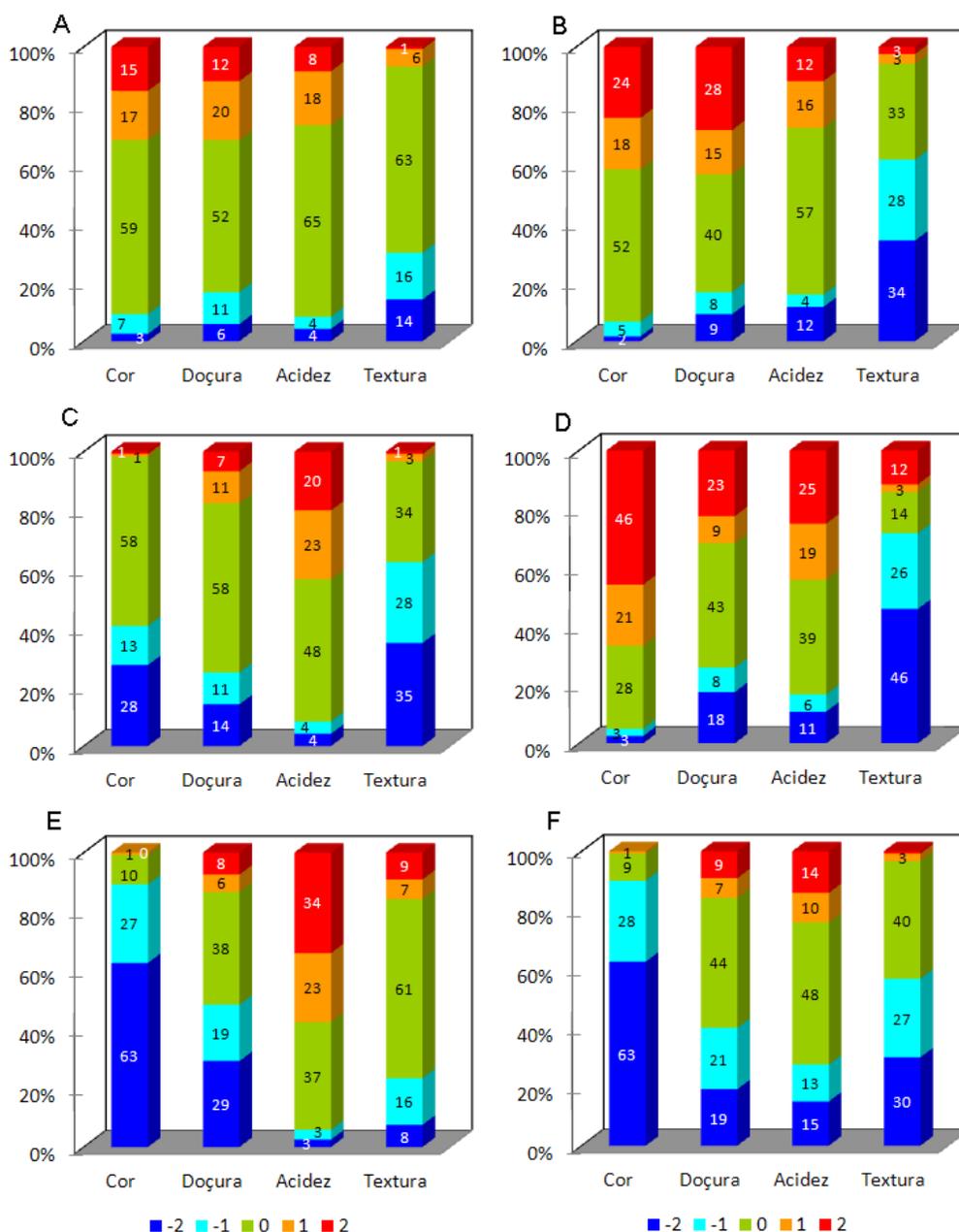


Figura 9: Níveis da escala do ideal para as amostras de bebidas lácteas: A: Comercial 1, B: Comercial 2, C: Comercial 3, D: Comercial 4, E: Probiótica com 49% de soro e F: Probiótica com 65% de soro. Escalas: -2 (extremamente menos que o ideal), 0 (Ideal), e +2 (extremamente mais que o ideal).

Para a amostra probiótica com 49% de soro, 63% dos consumidores julgaram que a cor da amostra era extremamente menos intensa que o ideal. 38% dos consumidores avaliaram a amostra como doçura ideal, 37% como acidez ideal e 61% como textura ideal. Os mesmos 63% dos consumidores julgaram a cor da amostra probiótica como 65% de soro como sendo extremamente menos intensa que o ideal, 44% julgaram a doçura como ideal e 48% como a acidez ideal e 40% julgaram a textura como sendo ideal.

3.5 Teste de aceitação

O teste de aceitação foi aplicado aos 120 consumidores, recrutados na Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP. 65% dos consumidores eram do sexo feminino e 35% do sexo masculino (Figura 15). Do total 21% dos consumidores tinham idade inferior a 20 anos, 73% estavam na faixa etária entre 20 e 30 anos, 5% entre 31 e 40 anos e 1% entre 41 e 50 anos (Figura 16). Dos entrevistados 80% afirmaram ter o hábito de consumir alimentos probióticos, os 20% restantes afirmaram não ter o hábito ou desconheciam tal alimento (Figura 17).

Quanto à frequência de consumo, apenas 20% dos provadores consumiam alimentos probióticos diariamente, o que ainda é muito pouco, visto que a recomendação ideal de ingestão de probióticos seria diária. 40% dos provadores consumiam probióticos pelo menos uma vez por semana, 20% a cada 15 dias e 10% consumiam uma vez por mês.

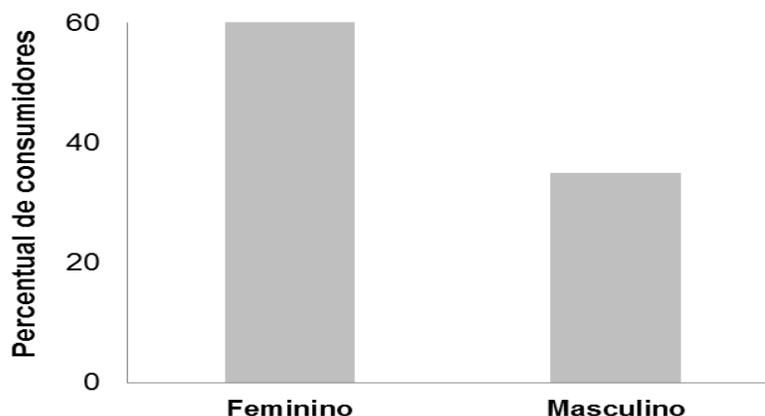


Figura 10: Distribuição percentual de 120 consumidores quanto ao gênero.

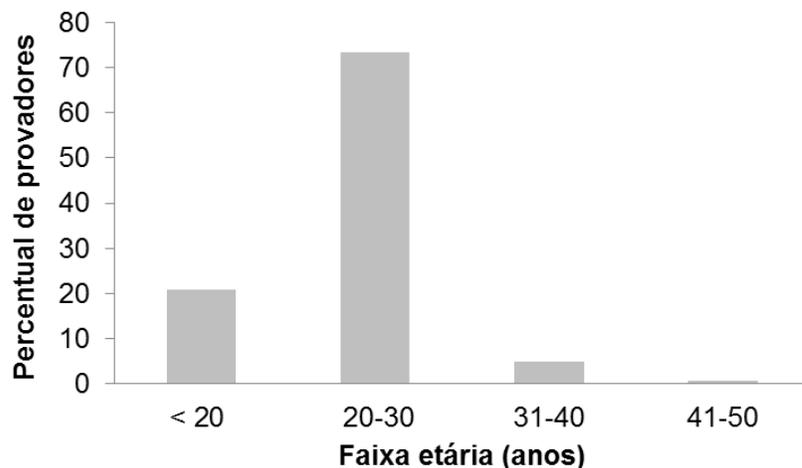


Figura 11: Distribuição percentual de 120 consumidores de acordo com a faixa etária.

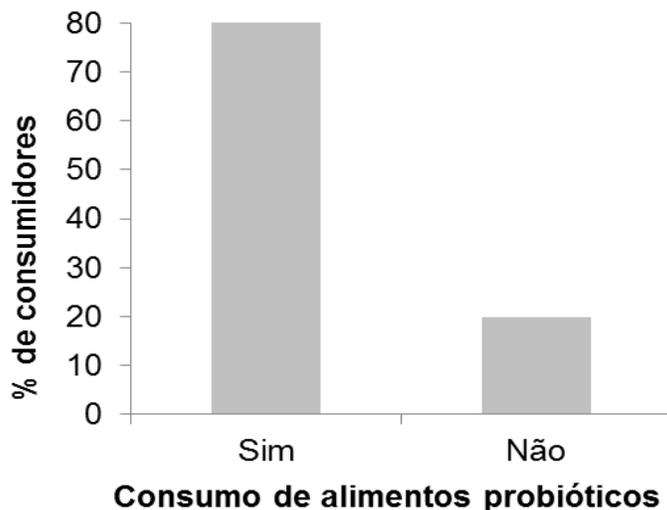


Figura 12: Distribuição percentual de 120 consumidores de acordo com hábito em consumir alimentos probióticos.

Quanto aos fatores que determinam a compra de alimentos probióticos (Figura 19), 66% dos consumidores julgaram o sabor como sendo o fator mais importância na decisão de compra. O segundo fator mais importante foi o preço do produto, seguido pela marca do mesmo. 40% dos consumidores alegaram que o tipo de embalagem foi o fator menos importante na decisão de compra, o que pode ser favorável para o setor de bebidas lácteas, uma vez que a maioria das marcas utiliza embalagens tipo “travesseiro” de polietileno de baixa densidade,

pigmentado com dióxido de titânio. Um tipo de embalagem de baixo custo e ainda capaz de garantir a estabilidade do produto.

As informações no rótulo sobre probióticos também foi um dos fatores com menor importância na decisão de compra de alimentos probióticos, pois 61% dos consumidores julgaram como sendo pelo menos o 4º fator na ordem de importância.

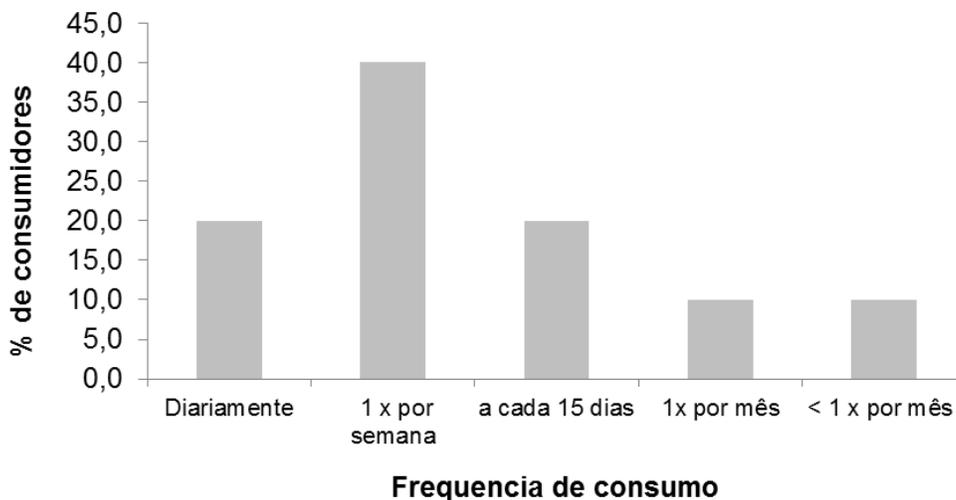


Figura 13: Distribuição percentual de 120 consumidores de acordo com frequência de consumo de alimentos probióticos.

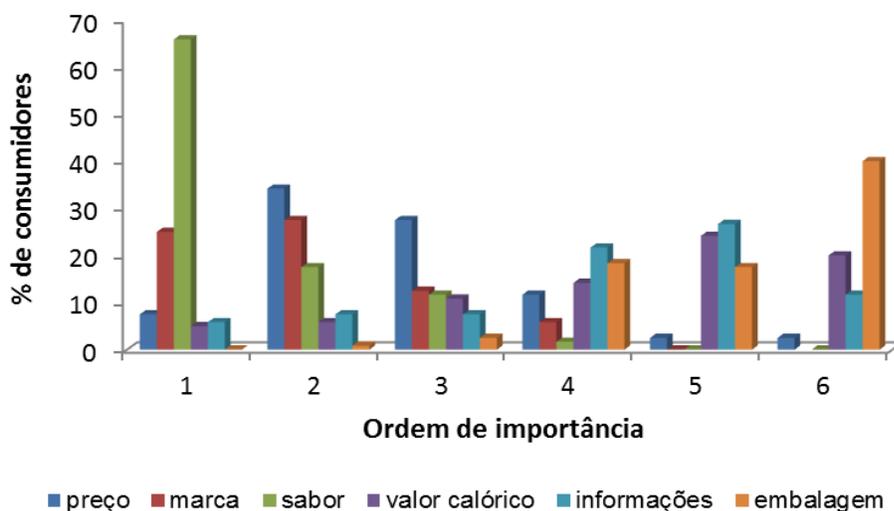


Figura 14: Distribuição percentual de 120 consumidores de acordo com a ordem de importância para a compra de alimentos probióticos, sendo 1= mais importante e 6=menos importante.

No teste de aceitação as amostras foram avaliadas por 120 consumidores utilizando escala hedônica de 9 pontos. As amostras comerciais 1 e 3 foram as que apresentaram maior média (Tabela 2) para a aparência do produto, 6,8 e 6,63, respectivamente. E as amostras probióticas apresentaram menor média para o mesmo atributo.

Quanto ao aroma as amostras comerciais 2 e 3 tiveram maior média ($p < 0,05$) que as demais, e as probióticas apresentaram menor média e não diferiram entre si ($p > 0,05$).

Para sabor, as amostras probióticas e a comercial 4 não diferiram entre si ($p > 0,05$) e tiveram médias inferiores que as amostras comerciais 1, 2 e 3.

A textura das amostras comerciais 2 e 3 não diferiram ($p > 0,05$) da bebida probiótica com 49% de soro, sendo que a amostra 4 teve menor média que as demais ($p < 0,05$).

As amostras 1, 2 e 3 tiveram médias próximas a 6,0 ($p > 0,05$) para impressão global, e as amostras 4 e probióticas tiveram médias em torno de 5,0 ($p > 0,05$).

Tabela 2: Médias para cada um dos atributos avaliados no teste de aceitação das seis amostras de bebidas lácteas por 120 consumidores.

Amostras	Aparência	Aroma	Sabor	Textura	Impressão Global
49% de soro	4,93 ^d	5,26 ^c	5,07 ^b	6,61 ^{a,b}	5,24 ^b
65% de soro	4,81 ^d	4,98 ^c	4,71 ^b	5,85 ^c	5,12 ^b
Comercial 1	6,80 ^a	6,53 ^{a,b}	6,51 ^a	5,63 ^c	5,95 ^a
Comercial 2	6,04 ^{b,c}	6,68 ^a	6,18 ^a	6,80 ^a	6,43 ^a
Comercial 3	6,63 ^{a,b}	7,03 ^a	6,15 ^a	6,07 ^{b,c}	6,38 ^a
Comercial 4	5,81 ^c	6,15 ^b	4,65 ^b	4,32 ^d	4,94 ^b

Médias numa mesma coluna seguidas por letras subscritas iguais não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$) pelo teste Tukey, ($n=6$).

Aproximadamente 22% dos consumidores (Figura 15) atribuíram nota 6 (gostei ligeiramente) e 18% atribuíram 7 (gostei modernamente) para a impressão global das bebidas probióticas. Vinte e sete por cento dos consumidores atribuíram nota 7 e 21% atribuíram nota 8 para a impressão global da amostra 1. Para a amostra 2, 23% atribuíram nota 6 e 19% atribuíram nota 7, 26% atribuíram nota 7 e o mesmo percentual deu nota 8 para a comercial 3. Para a amostra 4, 16% nota 3 (desgostei moderadamente), 19% atribuíram nota 4 (desgostei ligeiramente), 16% nota 6 e 17% nota 7.

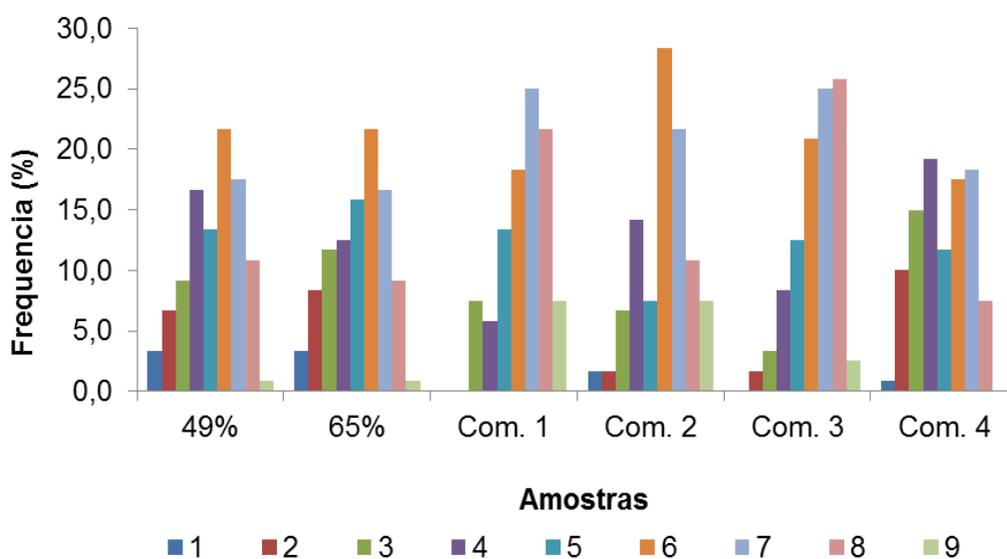


Figura 15: Frequências das notas de aceitação, na escala estruturada de 9 pontos (1= desgostei extremamente até 9= gostei extremamente), para as seis amostras avaliadas. A saber: 49%: bebida probiótica com 49% de soro, 65%: bebida probiótica com 65% de soro, Com.1: bebida comercial 1; Com.2: bebida comercial 2; Com.3: bebida comercial 3; e Com.4: bebida comercial 4.

Frequentemente, os dados obtidos de escala hedônica são analisados por análise de variância, porém duas situações errôneas ocorrem devido a essa abordagem: geralmente os dados hedônicos não obedecem a normalidade e homocedasticidade (O'Mahony 1982, Vie et al. 1991, Bayarri et al., 2011a) e as respostas de preferência dos consumidores vem diferentes critérios, logo os

valores médios não refletem a situação real (Costell et al., 2010, Bayarri et al., 2011b).

Dessa forma os resultados da aceitação foram avaliados quanto à normalidade, sendo observado que não obedecem à distribuição Normal, portanto foi aplicada a Análise Hierárquica de Grupos (*Hierarchical Cluster Analysis* - HCA). Foram utilizados dados centrados na média como pré-processamento, e o método de Ward de aglomeração, na tentativa de agrupar os consumidores de acordo com as características demográficas (dados não sensoriais) e suas respectivas preferências de consumo de bebidas lácteas (dados sensoriais). O grupo 1 (Cluster 1) foi composto por 36 consumidores, o grupo 2 (Cluster 2) por 43 e o grupo 3 (Cluster 3) por 41 consumidores (Figura 16).

O grupo 1 foi composto por 28% dos consumidores do sexo masculino, 17% com idades inferiores a 20 anos, 78% com na faixa etária entre 20 e 30 anos e os demais entre 31 e 40 anos. A notas médias de aceitabilidade (Figura 17) foi 7 (gostei moderadamente) para a bebida com 49% de soro, 6 (gostei ligeiramente) para a bebida com 65% e comerciais 1, 2 e 3. A comercial 4 obteve nesse grupo nota média igual a 4 (desgostei ligeiramente).

O segundo grupo com 67% dos consumidores eram sexo feminino, 23% menores de 20 anos de idade, 70% com idade entre 20 e 30 anos, 5% na faixa de 31 a 40 anos e 2% com idades entre 41 e 50 anos. As bebidas probióticas tiveram notas médias igual a 3 (desgostei moderadamente), as comerciais 2 e 4 obtiveram nota 4, e as comerciais 1 e 3, obtiveram nota 6.

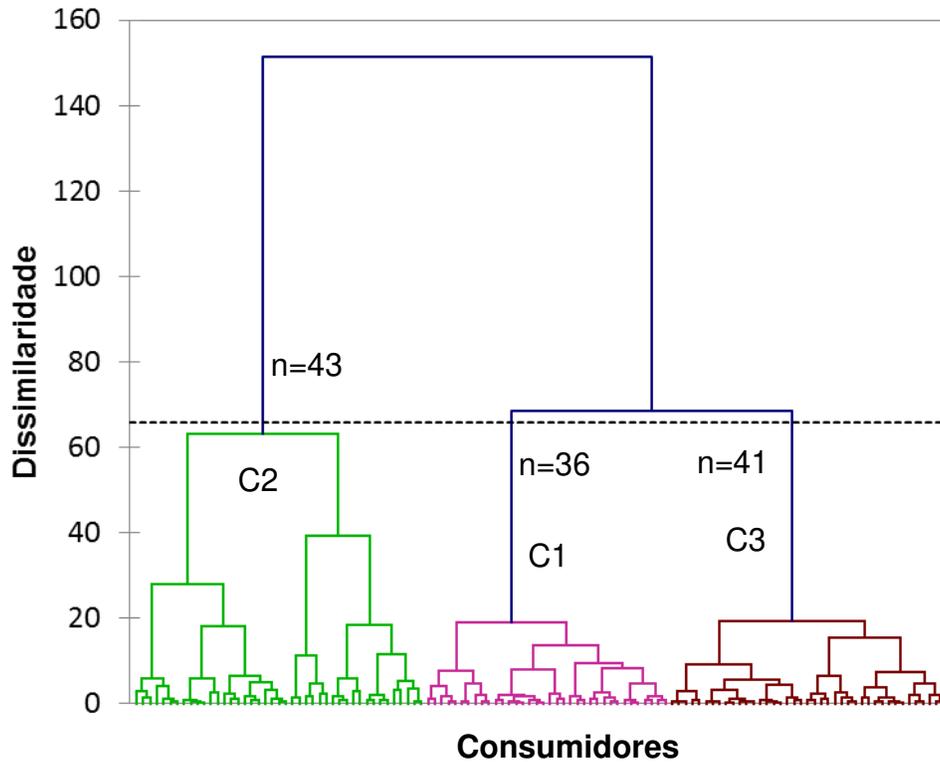


Figura 16: Agrupamento dos consumidores (n=120) por Análise Hierárquica de Grupos (HCA).

O grupo 3 com 61% e 39% dos consumidores dos sexos feminino e masculino, respectivamente. Dos quais, 22% tinham menos de 20 anos de idade, 73% entre 20 e 30 anos e 5% entre 31 e 40 anos. As bebidas probióticas e a comercial 4 tiveram nota 6 (gostei ligeiramente), as comerciais 1 e 3 tiveram nota 7 (gostei moderadamente) e a comercial 2 obteve nota média 8 (gostei muito).

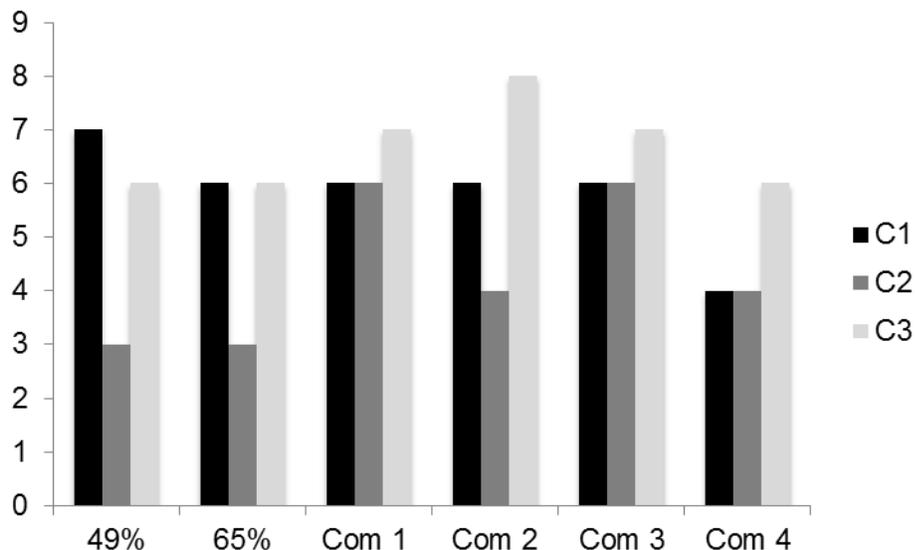


Figura 17: Notas médias de aceitabilidade para as amostras nos três grupos obtidos por HCA. Onde, C1: cluster 1, C2: cluster 2 e C3: cluster3. A saber: 49%: bebida probiótica com 49% de soro, 65%: bebida probiótica com 65% de soro, Com 1: bebida comercial 1; Com 2: bebida comercial 2; Com 3: bebida comercial 3; e Com 4: bebida comercial 4.

Os quadrados mínimos parciais (PLS) foram calculados para cada um dos grupos, na tentativa de se ajustar modelos capazes de explicar os dados obtidos e prever a aceitabilidade de bebidas lácteas mediante dados de aceitação (impressão global) e termos descritivos obtidos por equipe altamente treinada na ADQ.

Foram obtidos três modelos (Tabela 3), nos quais as variáveis correspondem aos termos descritores (X) e o modelo de predição (Y) corresponde à aceitação dos produtos, todos levando em consideração a primeira componente.

Para o primeiro grupo de consumidores (n=36), o modelo Y1 ajustou-se a 68,6% dos dados. O modelo para o segundo grupo de consumidores (n=43), o modelo Y2 explicou 70,8% dos dados e o modelo para o terceiro grupo de consumidores (n=41), o modelo Y3 explica 78,3% dos dados.

Apesar dos modelos obtidos explicarem percentuais consideráveis dos dados, é interessante avaliar o quanto cada modelo é capaz de prever a aceitação (\hat{Y}). Para avaliar a predição dos modelos os valores de Q^2 devem ser analisados.

Os valores de Q^2 para os três grupos foram 0,306 para o grupo 1, para o grupo 2 foi de 0,033 e para o grupo 3 foi de 0,289. Portanto, nenhum dos modelos obtidos foi capaz de prever bem a aceitação das bebidas lácteas mediante a quantificação dos dados obtidos no teste descritivo, apesar dos ajustes (R^2) terem sido satisfatórios.

Tabela 3: Coeficientes dos modelos obtidos por PLS (*Partial Least Square*) para ajuste da aceitação média em 3 grupos de consumidores (Y1= aceitação do cluster 1, Y2= aceitação do cluster 2 e Y3= aceitação do cluster 3) na primeira componente de regressão.

Variável	Aceitação		
	Y1	Y2	Y3
Intercepto	5,629	2,179	4,968
Cor rósea	-0,032	0,072	0,039
Viscosidade aparente	-0,004	0,101	0,076
Aroma de iogurte natural	0,105	-0,033	-0,008
Aroma artificial de <i>tutti-frutti</i>	-0,048	0,048	0,021
Aroma natural de morango	0,090	0,068	0,064
Gosto ácido	0,033	0,257	0,130
Gosto doce	-0,125	0,052	0,024
Sabor artificial de <i>tutti-frutti</i>	-0,049	0,050	0,022
Sabor natural de morango	0,085	0,026	0,034
Viscosidade	0,044	0,066	0,061
R^2	0,686	0,708	0,783
Q^2	0,306	0,033	0,289
Desvio Padrão	0,681	0,577	0,287

Os coeficientes padronizados para os atributos sensoriais obtidos por PLS foram significativos, quando a importância da variável de projeção (VIP) foi maior que 0,8 (Wold et al., 2001).

Dessa forma, para o grupo 1 não foram considerados como atributos importantes na aceitabilidade de bebidas lácteas os atributos de viscosidade aparente, gosto ácido e viscosidade (Figura 18). Os atributos que contribuíram positivamente na aceitabilidade foram aroma de iogurte natural, aroma natural de morango e sabor artificial de *tutti-frutti*. Os atributos que contribuíram negativamente para a aceitabilidade foram cor rósea, aroma artificial de *tutti-frutti*, gosto doce e sabor natural de morango. Vale ressaltar que o grupo 1,

correspondeu a 30% do total de consumidores que participaram da pesquisa. Para avaliar a eficiência de predição dos modelos obtidos, devem-se levar em consideração os valores de Q^2 . O valor de Q^2 para o grupo 1 está de acordo com o encontrado por Tenenhaus et al. (2005), após a separação dos dados de aceitação por grupos de consumidores. Os autores encontraram o valor 0,266 para avaliação de seis amostras de sucos de laranja por grupo de 37 consumidores.

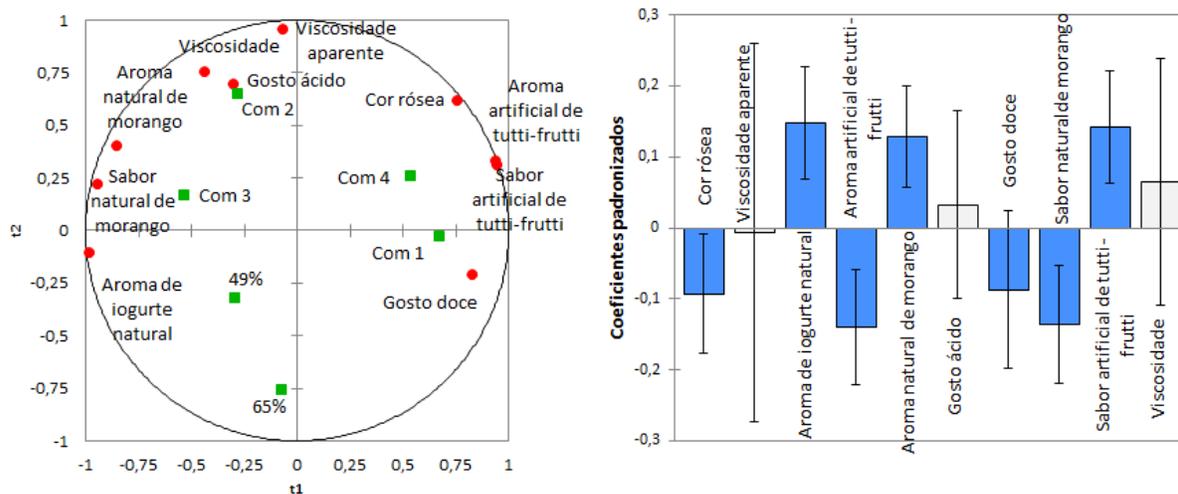


Figura 18: Quadrados mínimos parciais (PLS – *Partial Least Square*) para o Cluster 1 (n= 36).

Para o grupo 2, os atributos que não foram relevantes na aceitabilidade (Figura 19) das bebidas lácteas foram aroma de iogurte natural, aroma natural de morango, gosto doce, sabor natural de morango e viscosidade. Para esse grupo de consumidores, que correspondeu a 35,83% do total de participantes da pesquisa, não houve atributos sensoriais que contribuíssem negativamente para a aceitabilidade das bebidas lácteas. Os atributos cor rósea, viscosidade aparente, aroma artificial de *tutti-frutti*, gosto ácido e sabor artificial de *tutti-frutti* contribuíram positivamente na aceitação dos produtos. O modelo obtido para o grupo 2 possui baixo poder de previsão, visto que o valor de Q^2 é muito baixo (0,033), próximo ao encontrado por Tenenhaus et al. (2005) antes da segmentação dos dados de

aceitação de seis de laranja por 96 consumidores, que foi de 0,06, indicando que o modelo obtido é pobre e não prevê melhor que o acaso (Bayarri et al., 2011a).

Para o grupo 3 que correspondeu a 34% dos total de consumidores que participaram da análise sensorial, os termos descritores aroma de iogurte natural, aroma artificial de *tutti-frutti*, gosto doce, sabor artificial de *tutti-frutti* e sabor natural de morango não foram determinantes na aceitabilidade dos produtos avaliados. Não houve termos que contribuíssem negativamente para a aceitabilidade e os que contribuíram positivamente foram cor rósea, viscosidade aparente, aroma natural de morango, gosto ácido e viscosidade. O valor de Q^2 do modelo obtido para o grupo 3 também mostrou significativo ($>0,05$), e foi próximo ao valor encontrado para o grupo 1.

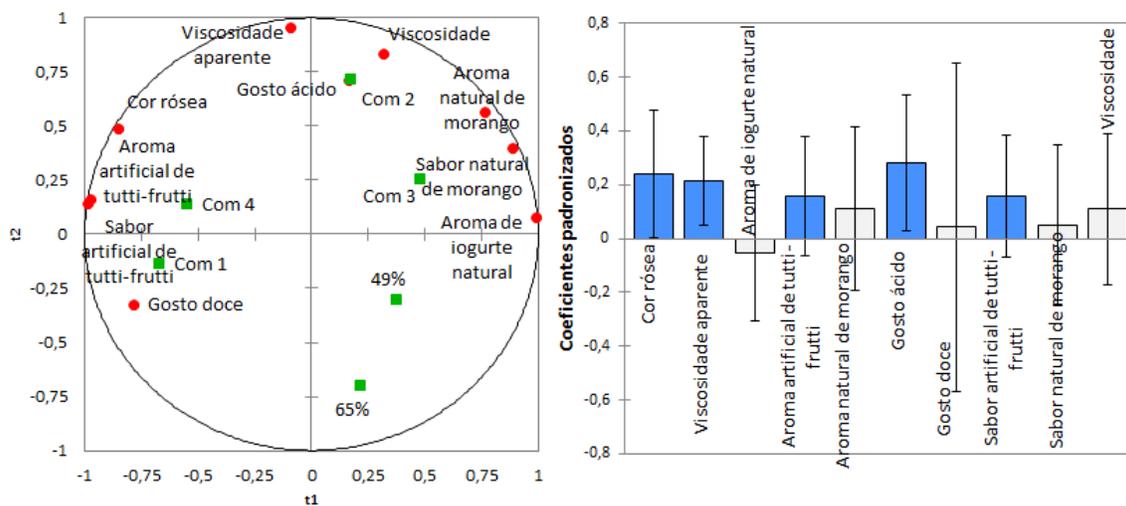


Figura 19: Quadrados mínimos parciais (PLS – *Partial Least Square*) para o Cluster 2 (n= 43).

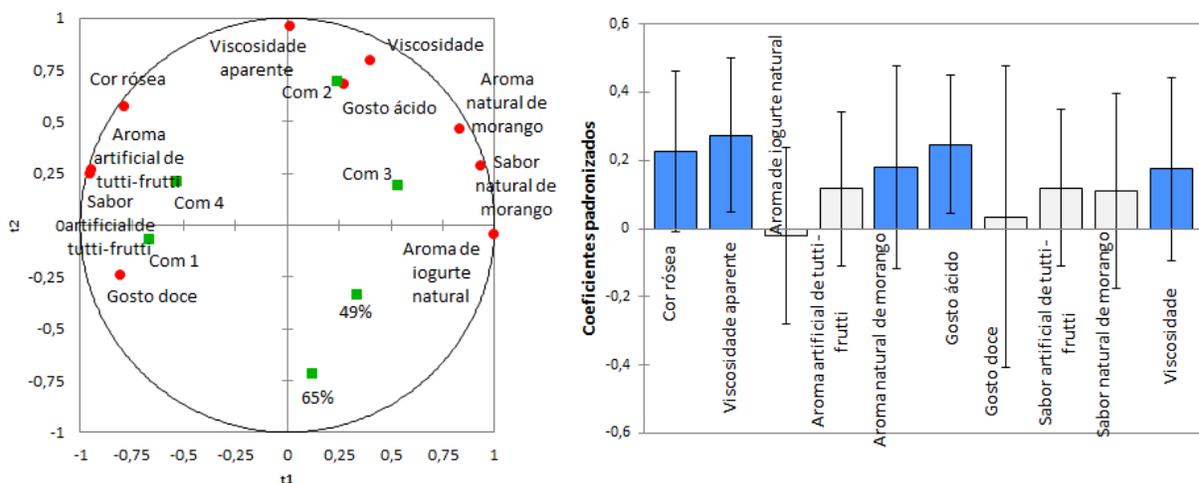


Figura 20: Quadrados mínimos parciais (PLS – *Partial Least Square*) para o Cluster 3 (n= 41).

4 Conclusões

A aceitação das bebidas lácteas probióticas pode ser melhorada por meio da utilização de aditivos capazes de conferir maior intensidade de cor e sabor de morango às formulações, uma vez que as notas para os demais atributos foram satisfatórias. O Mapa Projetivo demonstrou ser uma metodologia confiável para avaliar bebidas lácteas fermentadas, funcionais ou não, com explicação de aproximadamente 70% dos dados. O Perfil Livre apresentou resultados muito interessantes em relação à ADQ, método descritivo convencional, pois apresentou explicação de 82% dos dados, com redução do tempo de análise. Entretanto, os assessores utilizaram maior número de termos descritores para avaliar menos amostras. Apesar dos resultados das análises descritivas serem muito próximos, como a ADQ demandou mais tempo do analista para sua realização, alterações ocorreram durante o armazenamento das amostras com a pós-acidificação, causando mudanças nas amostras e padrões que podem ter elevado o nível de dificuldade da análise, mesmo para assessores altamente treinados. A realização de processamentos de bebidas lácteas probióticas ou a aquisição de novas amostras comerciais poderiam vir a tornar a análise inviável. Porém, como o Perfil Livre foi realizado em menor tempo, e os resultados foram muito semelhantes aos obtidos na ADQ, pode-se considerar que ambas as metodologias são

interessantes para descrever quantitativamente as amostras bebidas lácteas fermentadas. Melhorias nas formulações das bebidas probióticas podem favorecer positivamente a aceitação, viabilizando o lançamento de um novo produto, visto que a formulação com 49% de soro de queijo apresentou boa aceitabilidade pelos consumidores.

5 Referências bibliográficas

Albert, A., Varela, P., Salvador, A., Hough, G., & Fiszman, S. (2011). Overcoming the issues in the sensory description of hot served food with a complex texture. Application of QDA[®], flash profiling and projective mapping using panels with different degrees of training. *Food Quality and Preference*, 22, 463–473.

Bárcenas, P., Elortondo, F. J. P., & Albisu, M. (2004). Projective mapping in sensory analysis of ewes milk: A study on consumers and trained panel performance. *Food Research International*, 37, 723-729.

Bayarri, S., Carbonell, I., Barrios, E. X., & Costell, E. (2011a). Impact of sensory differences on consumer acceptability of yoghurt and yoghurt-like products. *International Dairy Journal*, 21, 111–118.

Bayarri, S., Martí, M., Carbonell, I., & Costell, E. (2011b). Identifying drivers of liking for commercial spreadable cheeses with different fat content. *Journal of Sensory Studies*, 27, 1-11.

Carrillo, E., Varela, P., & Fiszman, S. (2012). Packaging information as a modulator of consumers' perception of enriched and reduced-calorie biscuits in tasting and non-tasting tests. *Food Quality and Preference*, 25, 105-115.

Costell, E., Tarrega, A., & Bayarri, S. (2010). Food acceptance: The role of consumer perception and attitudes. *Chemosensory Perception*, 3, 42–50.

Deliza, R., MacFie, H., & Hedderley, D. (2005). The consumer sensory perception of passion-fruit juice using free-choice profiling. *Journal of Sensory Studies*, 20, 17–27.

de Melo, L. L. M. M., Bolini, H. M. A., & Efraim, P. (2009). Sensory profile, acceptability, and their relationship for diabetic/reduced calorie chocolates. *Food Quality and Preference*, 20, 138–143.

Macfie, H. J., N., Bratchell, Greenhoff, K., & Vallis, L (1989). Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. *Journal of Sensory Studies*, 4, 129–148.

Meilgaard, M., Civille, G. V., & Carr, B. T. (1999). *Sensory evaluation techniques*. Boca Raton: CRC Press.

Moussaoui, K. A., & Varela, P. (2010). Exploring consumer product techniques and their linkage to a quantitative descriptive analysis. *Food Quality and Preference*, 21, 1088–1099.

O'Mahony, M. (1982). Some assumptions and difficulties with common statistics for sensory analysis. *Food Technology*, 36, 75–82.

Oreskovich, D. C., Klein, B. P., & Sutherland, J. W. (1991). *Procrustes analysis and its application to free choice and other sensory profiling*. In *Sensory Theory and Application in Foods* (H. T. Lawless and B. P. Klein, eds.) pp. 353-394. Marcel Dekker, New York.

Pagès, J. (2005). Collection and analysis of perceived product interdistances using multiple factor analysis: application to the study of 10 white wines from the Loire Valley. *Food Quality and Preference*, 16, 642–649.

Penna, A. L. B., Sivieri, K., & Oliveira, M. N. (2001). Relation between quality and rheological properties of lactic beverages. *Journal of Food Engineering*, 49, 7–13.

Santos, C. T., Costa, A. R., Fontan, G. C. R., Fontan, R. C. I., & Bonomo, R. C. F. (2008a). Influência da concentração de soro na aceitação sensorial de bebida láctea fermentada com polpa de manga. *Alimentos e Nutrição*, 19, 55-60.

Santos, C. T., Marques, G. M. R., Fontan, G. C. R., Fontan, R. C. I., Bonomo, R. C. F., & Bonomo, P. (2008b). Elaboração e caracterização de uma bebida láctea fermentada com polpa de umbu (*Spondias tuberosa* sp.). *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 8, 111–116.

Shah, N. P., & Ravula, R. R. (2000). Influence of water activity on fermentation, organic acids production and viability of yoghurt and probiotic bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*, 55, 127–131.

Stone, H., & Sidel, J. L. (1993). *Sensory evaluation practices* (pp. 143–270). Academic Press, Inc. ISBN 0-12-672482-2.

Stone, H., Sidel, J. L. Oliver, S., Woosley, A., & Singleton, R. C. (1974). Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. *Food Technology*, 28, 24–34.

Tenenhaus, M., Pagès, J., Ambroisine, L., & Guinot, C. (2005). PLS methodology to study relationship between hedonic judgements and product characteristics. *Food Quality and Preference*, 16, 315–325.

Veinand, B., Godefroy C., Adam, C., & Delarue, J. (2011). Highlight of important product characteristics for consumers. Comparison of three sensory descriptive methods performed by consumers. *Food Quality and Preference*, 22, 474–485.

Vie, A., Gulli, D., & O'Mahony, M. (1991). Alternative hedonic measures. *Journal of Food Science*, 56, 1–5.

Villanueva, N. D. M., & Da Silva, M. A. A. P. (2009). Comparative performance of the nine-point hedonic, hybrid and self-adjusting scales in the generation of internal preference maps. *Food Quality and Preference*, 20, 1–12.

Williams, A. A., & Langron, S. P. (1984). The use of free-choice profiling for the evaluation of commercial ports. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 35, 558–568.

Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L. (2001). PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58, 109–130.

Zare, F., Boye, J. I., Orsat, V., Champagne, C. & Simpson, B.K. (2011). Microbial, physical and sensory properties of yogurt supplemented with lentil flour. *Food Research International*, 44, 2482-2488.

Zacarchenco, P. B., & Massauguer-Roig, S. (2004). Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida de prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24, 674-679.

CONCLUSÕES GERAIS

As bebidas lácteas probióticas foram produzidas utilizando soro doce fluido, o que certamente reduziu os custos de produção, possibilitando o aproveitamento imediato do subproduto da indústria de queijos. Os modelos matemáticos como Aceitação Global Média e *Survival Analysis* demonstraram ser eficientes na seleção da concentração de ingredientes de formulação com boa aceitação sensorial.

Os níveis de soro de queijo avaliados não influenciaram nas contagens de micro-organismos dos fermentos lácticos e probióticos. Portanto, mesmo com a seleção de duas formulações com 49 e 65% de soro de queijo pelos modelos matemáticos, a presença de soro não influenciou na contagem de *Lactobacillus acidophilus*. Compostos voláteis como o ácido acético, que poderiam provocar a rejeição do produto pelo consumidor também não se alterou em função do teor de soro.

Quanto à estabilidade, as bebidas lácteas probióticas com 49 e 65% mantiveram as contagens de *Lactobacillus acidophilus* superiores a 10^7 UFC/mL durante os 35 dias de armazenamento. Apesar das bebidas funcionais apresentarem maior proteólise durante o armazenamento, a viscosidade das mesmas foram intermediárias aos produtos comerciais com os quais foram comparadas. As bebidas lácteas funcionais apresentaram elevado valor nutricional, com proteínas de elevado valor biológico e de capacidade prebiótica abordada em estudos crescentes.

Os métodos utilizados para avaliação sensorial das bebidas lácteas apresentaram resultados interessantes, sendo que os testes descritivos de Perfil Livre e Análise Descritiva Quantitativa apresentaram semelhança, apesar dos termos descritivos utilizados pelos assessores apresentarem diferenças e a ausência de treinamento na realização do Perfil Livre, com redução do tempo de análise. A realização de Mapa Projetivo para avaliação de bebidas lácteas foi pioneira, uma vez que na literatura só existem trabalhos com testes de aceitação utilizando escala hedônica. No Mapa Projetivo, as amostras funcionais

apresentaram semelhança entre si e as quatro amostras comerciais foram agrupadas duas a duas. No teste de aceitação, com a segmentação dos consumidores em grupos, constatou-se que as bebidas lácteas funcionais não tiveram boa aceitação em um dos três grupos de consumidores. A aceitação da bebida láctea com 49% foi superior à bebida com 65% de soro, o que pode ter ocorrido devido à adstringência do soro de queijo.

Para estudos futuros os autores sugerem que a concentração de preparado de fruta sabor morango seja aumentada, uma vez que a cor do produto e o sabor de morango das amostras funcionais receberam avaliações inferiores que as demais amostras, muito evidente pela Escala do Ideal.

Melhorias na linha de processamento devem ser realizadas de maneira a incorporar o mínimo de oxigênio ao produto, pois as contagens de *Bifidobacterium animalis* estiveram inferiores ao desejável. Sendo assim, a bebida láctea com 49% de soro de queijo, apresentou elevado potencial em carrear micro-organismos benéficos à saúde, que mediante realização dos ajustes propostos no presente trabalho poderá se tornar um produto com propriedades funcionais a serem avaliadas e de grande valor comercial.

ANEXOS

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISA COM SERES HUMANOS

PROJETO DE DOUTORADO:

Produção e avaliação de bebidas lácteas probióticas com diversos níveis de soro de queijo

RESPONSÁVEL PELA PESQUISA: **Wellington de Freitas Castro**

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: A utilização de soro para formulação de bebidas lácteas diminui os gastos com tratamento de efluentes, por isso vem ganhando espaço no mercado brasileiro. E apesar de muitas vezes estarem associadas à alimentação de baixa renda, novos produtos como os probióticos estão sendo lançados. Ferramentas sensoriais como: teste de aceitação e metodologias descritivas serão utilizadas no presente trabalho com o objetivo de avaliar os produtos funcionais desenvolvidos e os comerciais convencionais já existentes no mercado.

PROCEDIMENTO: As bebidas probióticas destinadas ao teste de aceitação sensorial, aplicado a 120 consumidores. 30 mL de cada amostra serão servidos em copinhos plásticos, codificados com números de três dígitos, e avaliados pelo provador com relação à aparência, aroma, sabor e textura e impressão global. O provador deverá experimentar as amostras e responder ao questionário que será entregue juntamente com a amostra. O provador terá, durante a execução do projeto, toda a liberdade para questionamento de qualquer dúvida e esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada, bem como poderá deixar de participar a qualquer tempo, sem prejuízos ao mesmo. A equipe deixa claro ao provador que não há risco previsível com a sua participação na pesquisa, a menos que o provador tenha alergia aos derivados do leite, devendo o mesmo informar previamente à equipe responsável pela pesquisa. Além disso, a equipe assegura que os dados de identidade fornecidos são confidenciais e sigilosos.

Membros da Equipe:

WELLINGTON DE FREITAS CASTRO

FONE: (19) 9128-3482

JOSE DE ASSIS FONSECA FARIA

FONE: (19) 3521-4016

Comitê de Ética em Pesquisa em caso de reclamações:

Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 - Caixa Postal 6111 13083-887 Campinas – SP

Fone (19) 3521-8936 Fax (19) 3521-7187

e-mail: **cep@fcm.unicamp.br**

Assinatura do responsável pela pesquisa: _____ Data ___/___/___

Assinatura do provador: _____

RG: _____

ANEXO III

FICHA PARA APLICAÇÃO DE TESTES TRIANGULARES PARA PRÉ-SELEÇÃO DE PROVADORES

FICHA DE APLICAÇÃO		
Nome: _____	Data: _____	
Por favor, prove as amostras de iogurte de morango da esquerda para direita. Duas amostras são iguais e uma é diferente. Identifique com um círculo a amostra diferente.		
_____	_____	_____
Comentários: _____		

ANEXO IV

Ficha para Método de Rede (*The Kelly Repertory Grid Method*)

Nome: _____ Data: _____

Por favor, observe, aspire e prove as duas amostras, e indique as similaridades e diferenças entre elas em relação à aparência, ao aroma, ao sabor e à textura.

Amostras: _____ e _____

SIMILARIDADES	DIFERENÇAS
Em relação à aparência	
Em relação ao aroma	
Em relação ao sabor	
Em relação à textura	

ANEXO V

PADRÕES UTILIZADOS NA ANÁLISE DESCRITIVA QUANTITATIVA

APARÊNCIA

Cor rósea: cor característica de produto de morango

Fraco: 0,009g de anilina rosa + 75 mL de leite UHT integral Líder

Forte: 0,09g de anilina vermelha + 50mL de leite UHT integral Líder

Viscosidade aparente: viscosidade observada no produto durante agitação da taça

Pouca: 25mL de leite UHT integral Líder + 25 mL de água destilada

Muita: 25g de iogurte natural integral Nestlé + 8 mL de água destilada

AROMA

Aroma de iogurte natural: aroma característico da fermentação do leite com produção de ácido láctico

Nenhum: água destilada

Muito: 25 g de iogurte natural integral Dia

Aroma artificial de tutti-frutti: aroma artificial presente no produto, porém não característico de morango, semelhante a *tutti-frutti* ou frutas vermelhas.

Nenhum: água destilada

Muito: 25g de bebida láctea Nestlé sabor frutas vermelhas

Aroma de morango: aroma de morango seja natural ou artificial

Nenhum: água destilada

Muito: 5g de preparado de fruta sabor morango da Industrial Duas Rodas + 50 mL de água destilada

SABOR

Gosto ácido: gosto característico da fermentação do leite, próprio do ácido láctico

Fraco: 10g de iogurte natural integral Nestlé + 40 mL de água destilada

Forte: 30g de iogurte natural integral Nestlé

Gosto doce: gosto que indica a presença de açúcar (sacarose) ou frutose

Fraco: 10g de iogurte natural integral Nestlé + 2g de sacarose P.A.

Forte: 30g de iogurte natural integral Nestlé + 6g de sacarose P.A.

Sabor artificial de tutti-frutti: sabor artificial presente no produto, porém não característico de morango, podendo ser de *tutti-frutti* ou frutas vermelhas

Fraco: 5g de bebida láctea integral Nestlé de frutas vermelhas + 50mL de água destilada

Forte: 30g de bebida láctea integral Nestlé de frutas vermelhas

Sabor de morango: sabor característico de morango, podendo ser natural ou artificial

Fraco: 5g de iogurte integral Nestlé com calda de morango e pedaços (2 camadas) + 50mL de água destilada

Forte: 50g de iogurte integral Nestlé com calda de morango e pedaços (2 camadas)

TEXTURA

Viscosidade: sensação tátil-oral sentida quando o produto é ingerido

Pouca: 25mL de leite UHT integral Líder + 25mL de água destilada

Muita: 25 g de iogurte natural integral Nestlé + 8 mL de água destilada

ANEXO VI

FICHA PARA AVALIAÇÃO DOS TERMOS DESCRITORES SELECIONADOS PELA EQUIPE SENSORIAL

NOME: _____ DATA: __/__/__

AMOSTRA: _____

Repetição:

1	2	3
---	---	---

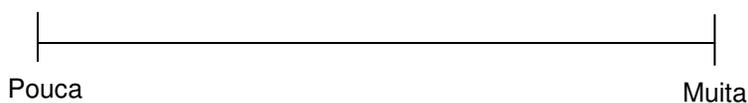
Por favor, para cada amostra de bebida láctea avalie os atributos listados abaixo utilizando a escala correspondente:

APARÊNCIA

Cor Rósea

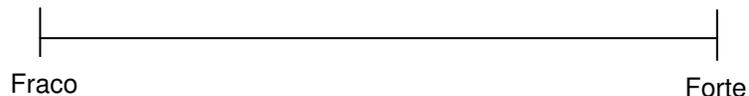


Viscosidade Aparente



AROMA

Aroma de iogurte natural



Aroma artificial de *tutti-frutti*



Aroma de morango

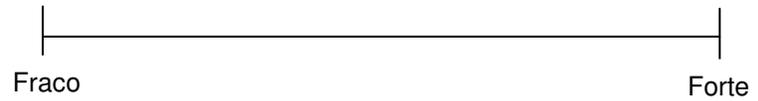


SABOR

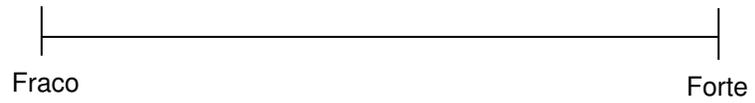
Gosto ácido



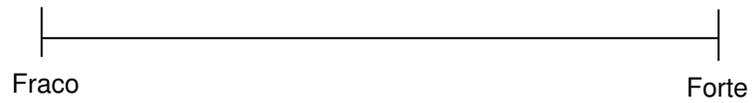
Gosto doce



Sabor artificial de *tutti-frutti*

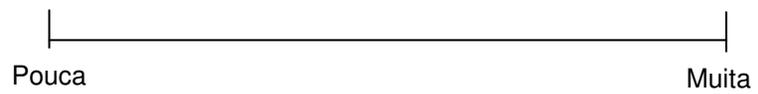


Sabor de morango



Textura

Viscosidade



ANEXO VII

FICHA PARA APLICAÇÃO DO TESTE DE ACEITAÇÃO DAS AMOSTRAS DE BEBIDAS LÁCTEAS

Ficha de Avaliação Sensorial

Nome: _____ Data: _____

- 1) Utilizando a escala abaixo, indique o quanto você gostou ou desgostou de cada amostra.

-
- 9** - Gostei extremamente (Adorei)
8 - Gostei muito
7 - Gostei moderadamente
6 - Gostei ligeiramente
5 - Nem gostei/Nem desgostei
4 - Desgostei ligeiramente
3 - Desgostei moderadamente
2 - Desgostei muito
1 - Desgostei extremamente (Detestei)
-

Amostra	Aparência	Cor	Aroma	Textura	Impressão Global
_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____	_____

- 2) Suponha que você esteja no supermercado e se depare com esse produto.
 Você compraria este produto?

Amostra	Sim	Não
_____	()	()
_____	()	()
_____	()	()
_____	()	()
_____	()	()
_____	()	()

Comentários: _____

ESCALA DO IDEAL (*Just About Right*)

- 3) Para os atributos de cor, textura, gosto doce e gosto ácido, utilize as respectivas escalas.

3.1 Cor

Observe a amostra, e utilizando a escala, indique o quão ideal se encontra a **INTENSIDADE DA COR** de cada amostra.

Amostra	Nota
_____	()
_____	()
_____	()
_____	()
_____	()
_____	()

2 – *extremamente mais* ESCURA que o ideal
 0 - cor IDEAL
 -2 – *extremamente mais* CLARA que o ideal

3.2 Textura

Prove a amostra e utilizando a escala, indique o quão ideal se encontra a **TEXTURA** de cada amostra.

Amostra	Nota
_____	()
_____	()
_____	()
_____	()
_____	()
_____	()

2 – *extremamente mais* ESPESSA que o ideal

0 - textura IDEAL

-2 – *extremamente mais* FLUIDA que o ideal

3.3 Gosto doce

Utilizando a escala, indique o quão ideal se encontra a **DOÇURA** de cada amostra.

Amostra	Nota
_____	()
_____	()
_____	()
_____	()
_____	()
_____	()

2 – *extremamente mais* DOCE que o ideal

0 – doçura IDEAL

-2 – *extremamente menos* DOCE que o ideal

3.4 Gosto ácido

Utilizando a escala, indique o quão ideal se encontra a **ACIDEZ** de cada amostra.

Amostra	Nota
_____	()
_____	()
_____	()
_____	()
_____	()
_____	()

2 – *extremamente mais* ÁCIDA que o ideal

0 – ACIDEZ ideal

-2 – *extremamente menos* ÁCIDA que o ideal

ANEXO VIII

Ficha para levantamento de termos descritores – Mapa Projetivo

NOME: _____ DATA: _____

Você está recebendo seis amostras de bebida láctea sabor morango. Prove a amostra e escreva no máximo cinco palavras que você considera adequadas para descrevê-la. Em seguida, projete as amostras na folha (*apresentada na tela do computador*) de acordo com as semelhanças e diferenças entre elas, utilizando seu próprio critério. **Não há certo ou errado.** Para efeito de esclarecimento, amostras que são percebidas como semelhantes devem ser posicionadas próximas, e amostras que são percebidas como diferentes são posicionadas distantes.

Amostras

Palavras utilizadas para descrição
