



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

RAISSA FEITOSA BEZERRA

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BEBIDA LÁCTEA PROBIÓTICA
ADICIONADA DE INULINA COMO FIBRA PREBIÓTICA**

FORTALEZA

2018

RAISSA FEITOSA BEZERRA

ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BEBIDA LÁCTEA PROBIÓTICA
ADICIONADA DE INULINA COMO FIBRA PREBIÓTICA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Bacharelado em Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Bacharelado em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Juliane Doering Gasparin Carvalho
Coorientador: Profa. Dra. Aline Sobreira Bezerra.

FORTALEZA

2018

RAISSA FEITOSA BEZERRA

ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BEBIDA LÁCTEA PROBIÓTICA
ADICIONADA DE INULINA COMO FIBRA PREBIÓTICA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Bacharelado em
Biotecnologia do Centro de Ciências da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial à obtenção do título de bacharel em
Biotecnologia.

Aprovada em: 07/12/2018

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Juliane Doering Gasparin Carvalho (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Aline Sobreira Bezerra
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Marjory Lima Holanda Araújo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Juliane Doering por me receber tão bem no Laboratório de Laticínios (LabLat) e pela orientação.

À Professora Dra. Aline Sobreira Bezerra, por ter me dado a chance de trabalhar na área de alimentos e ter me acolhido em condições tão adversas.

Às técnicas do Laboratório de Laticínios (LabLat) Gizele Almada e Lívia Machado por todo o companheirismo e ajuda nesse ano de trabalho e por terem me acolhido tão bem no time do laboratório.

Aos meus avós, tios e tias, mãe, padrasto e irmã, que compõem o núcleo central da minha família, por não deixar que nada me faltasse nesses anos de graduação e terem me apoiado nas minhas escolhas.

Aos meus amigos de colégio, que por mais de 10 anos têm se mantido ao meu lado como irmãos, comemorando cada conquista e lamentando cada tropeço.

À Dayara Oliveira e ao Augusto Filho, por me ajudarem a enfrentar todas essas complicações no percurso acadêmico e por jamais terem me deixado só.

Às amigas que a graduação me deu, às meninas que me acolheram na volta do intercâmbio e aos meus veteranos e calouros por terem tornado essa viagem mais tranquila.

Ao meu namorado, Levy Gallas Jacob, por ter aguentado os altos e baixos do fim dessa graduação e por ter estimulado todos os meus planos e sonhos.

Aos meus professores, brasileiros e norte-americanos, por formarem a pessoa que eu sou hoje, não apenas academicamente. Seus ensinamentos ecoarão seguros através de mim e todas as visões que eu construí desse mundo baseiam-se no que me foi passado.

“Fermentation equals to Civilization.”

John Ciardi

RESUMO

O leite e seus derivados são as principais fontes de cálcio na alimentação brasileira, e seu consumo tende a aumentar de acordo com o poder aquisitivo e grau de escolaridade da população. A fermentação do soro de leite implica na utilização de um coproduto de extenso valor nutricional, resíduo da indústria queijeira e que até então era tido como poluente de solos e corpos d'água; o consumo de cepas probióticas proporciona modulação da microbiota intestinal e proteção contra bactérias patogênicas no trato gastrointestinal; a inulina, fibra prebiótica, auxilia na colonização intestinal por microrganismos probióticos e fortifica a microbiota já presente. O objetivo do presente trabalho foi reunir os elementos supracitados na elaboração de produto que aproveite o principal coproduto da indústria queijeira e tenha ampla aceitação sensorial. O sabor da bebida foi baseado em produtos já consumidos e aceitos pelos brasileiros, no caso o leite de coco e o doce de leite. Três formulações, variando na proporção soro de leite e leite (1:1, 3:1 e 1:3) na base láctea, foram avaliadas por análise sensorial de aceitação com escala hedônica de nove pontos, contemplando os atributos cor, textura, aroma, sabor e aparência global, além da intenção de compra e teste de idealidade para acidez. Os dados foram tratados com análise de variância (ANOVA) e teste de médias (Tukey) ($p < 0,05$). Foram realizadas análises físico-químicas de viscosidade, cinzas, umidade, pH e acidez titulável. A análise microbiológica foi realizada pela contagem de bactérias ácido-láticas viáveis (considerando Unidades Formadoras de Colônia - UFC) nos dias 0, 7, 14 e 21 do produto, como previsto na legislação para alegar atividade probiótica. Além de contagem de coliformes a 45 °C e pesquisa de *Salmonella*. As médias de cada atributo da análise sensorial não apresentaram diferenças significativas entre si, indicando que é possível utilizar mais soro de leite na formulação e ainda assim ter um produto com boa aceitação sensorial, reduzindo os custos de produção. A quantidade mínima viável de bactérias ácido lácticas probióticas manteve-se durante os 21 dias de avaliação. Os resultados físico-químicos estão de acordo com trabalhos prévios e dentro do padrão para bebidas lácteas fermentadas.

Palavras-chave: Fermentação. Leite. Soro de Leite.

ABSTRACT

Milk and dairy products are the main source of Calcium among Brazilian foods, and its consumption tends to rise with the population's increasing basic income and level of education. The fermentation of liquid whey implies reusing a byproduct with great nutritional values, residue from cheese production and until then considered as extremely soil and water bodies pollutant; the consumption of probiotic microorganisms provides modulation of gut microbiota and protection against pathogenic bacteria in the gastrointestinal tract; inulin, a prebiotic fiber, helps the probiotic microorganisms with the colonization of human intestine and fortifies the already present microbiota. The goal of the present work is to gather all these previously cited elements in a product reusing the main byproduct from the dairy industry and having wide sensory acceptance. The beverage flavor was based on products which present good acceptance among brazilians, like coconut milk and milk caramel in this case. Three formulations, which vary in whey/milk ratio (1:1, 3:1 and 1:3), were submitted to a sensory evaluation with a 9-point hedonic scale comprehending color, texture, aroma, flavor and overall appearance as criteria, together with the buying intention poll and ideality test for acidity. The data was analyzed with ANOVA and Tukey's Test ($p < 0.05$). Physical-chemical analyses were done for viscosity, ashes, humidity, pH and acidity. Microbiological analyses were done by counting viable lactic-acid bacteria (considering Colony-Forming Units - CFU), on the days 0, 7, 14 and 21 starting from the day the product was made, as required by the Brazilian law for probiotic claiming, besides tests for thermotolerant coliforms and *Salmonella* presence. The averages for each attribute in sensory evaluation did not present significant difference between each other, indicating that it is possible to use more whey in the formulation and still have a product with good sensory acceptance, reducing production costs. The minimum viable amount of probiotic lactic-acid bacteria was kept during all the 21 days of evaluation. The results from physical-chemical analyses matched with previous works and with the standards for fermented dairy beverages.

Keywords: Fermentation. Milk. Whey.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma da rota metabólica de fermentação láctea, incluindo a glicólise para produção de piruvato e sua posterior utilização para regeneração do NAD ⁺ e consequente produção de lactato (ácido láctico).	17
Figura 2 – Bases teóricas para escolha de microrganismo com potencial probiótico	20
Figura 3 – Fórmula estrutural da inulina (frutano)	22
Figura 4 – Fluxograma de preparação da bebida láctea	28
Figura 5 – Três formulações da bebida láctea fermentada e suas respectivas composições	29
Figura 6 - Frascos estéreis fornecidos pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos para transporte de amostras, já rotulados e preenchidos com a bebida láctea.	31
Figura 7 – Disposição dos elementos na cabine de análise sensorial. Da esquerda para direita: brinde para o voluntário, bandeja com as três amostras a serem avaliadas, copo com água, borracha, lápis, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e ficha de análise sensorial	32

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Histograma dos resultados do teste de idealidade para a acidez da bebida láctea, onde 0 representa a idealidade, valores negativos sendo mais fracos que o ideal e valores positivos sendo mais fortes que o ideal 36
- Gráfico 2 – Histograma dos resultados da intenção de compra para cada amostra, sendo 1- certamente não compraria e 5- certamente compraria 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultados das análises físico-químicas para cada tratamento e seus respectivos desvios padrões. Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)	31
Tabela 2	Resultados das análises microbiológicas de bactérias ácido-láticas viáveis (UFC/g ou mL) a cada sete dias a partir da data de fabricação do produto. As amostras B são referentes ao tratamento sem inulina, enquanto as amostras A contém a fibra prebiótica (A1/B1: 1:1 soro de leite/leite, A2/B2: 3:1 soro de leite/leite, A3/B3: 1:3 soro de leite/leite).	33
Tabela 3	Resultados das médias da análise sensorial para seis atributos em escala hedônica de 1- desgostei muitíssimo a 9- gostei muitíssimo. Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ATP	Adenosina trifosfato
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
FOS	Frutooligosacarídeos
GOS	Galactooligosacarídeos
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LAB	Bactérias Ácido-Láticas (<i>Lactic-Acid Bacteria</i>)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida
PPM	Partes Por Milhão
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Leite – qualidades nutricionais e consumo no Brasil	14
1.2	Soro de Leite	15
1.3	Fermentação de alimentos	16
1.4	Produtos Simbióticos	19
1.5	Alimentos Funcionais	23
2	OBJETIVOS	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	Materiais	26
3.1.1	Leite	26
3.1.2	Soro de Leite	26
3.1.3	Agentes Fermentadores e Processo Fermentativo	26
3.1.4	Inulina	27
3.1.5	Leite de Coco	27
3.1.6	Doce de Leite	27
3.1.7	Preparo da Bebida	27
3.2	Métodos de Análise Físico-Química	29
3.3	Métodos de Análise Microbiológica	30
3.4	Métodos de Análise Sensorial	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	Resultados das Análises Físico-Químicas	33
4.2	Resultados das Análises Microbiológicas	34
4.3	Resultados da Análise Sensorial	35
5	CONCLUSÃO	39
6	PERSPECTIVAS	40
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXO 1	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	
ANEXO 2	Ficha de Análise Sensorial	

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leite - qualidades nutricionais e consumo no Brasil

O leite e seus derivados são alimentos de grande valor nutricional e as principais fontes de cálcio na alimentação, nutriente fundamental para a manutenção e formação da massa óssea, além de serem fontes de proteínas e vitaminas, como a riboflavina (vitamina B2) (MUNIZ; MADRUGA; ARAÚJO, 2013). O leite também possui naturalmente imunoglobulinas, fatores de crescimento, enzimas, peptídeos, hormônios, poliaminas e citocininas (PEREIRA, 2014). O principal carboidrato no leite é a lactose, dissacarídeo de glicose e galactose, e seus efeitos fisiológicos são diversos, como o aumento da absorção de cálcio, fósforo e magnésio pelo intestino e na utilização da vitamina D pelo organismo (HUNT; JOHNSON; ROUGHHEAD, 2009).

Os lipídeos no leite são responsáveis por carregar proteínas lipossolúveis, e sua fração lipídica é composta por 98% de triacilgliceróis (FAO, 2013). O leite de vaca possui naturalmente ácido linoléico conjugado (CLA), que é oriundo de processos metabólicos do intestino de ruminantes, e que vem se mostrando ligado à melhoria da condição cardiovascular e do sistema imunológico (BENJAMIN E SPENER, 2009).

As proteínas exclusivas do leite (que não permanecem no soro do leite após a separação) são as caseínas, e a principal função das mesmas é o transporte de minerais (cálcio, fósforo, ferro, cobre e zinco) no sangue (BOYE; WIJESINHA-BETTONI; BURLINGAME, 2012). As proteínas do leite se apresentam diferentes tanto por sua alta velocidade de absorção e por sua composição de aminoácidos (PEREIRA, 2014). Elas possuem alto valor biológico, grande quantidade de aminoácidos essenciais para a devida nutrição humana, boa digestibilidade e boa biodisponibilidade (FAO, 2013). Na hidrólise enzimática que ocorre durante a digestão das proteínas lácteas, são gerados peptídeos que apresentam propriedades bioativas, associados a atividades antifúngicas, antibacterianas, antivirais, antioxidantes, imunomodulatórias e opióides, além de auxiliarem na absorção de nutrientes pelo organismo (MILLS et al., 2011; SOUSA et al., 2012).

Os resultados da edição 2008-2009 da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) relaciona o aumento do consumo do leite e derivados com o aumento da renda familiar e com o grau de escolaridade da população, tendo o leite participação em aproximadamente 5,8% das calorias diárias ingeridas pelo brasileiro, sendo que, na região Nordeste esse número é de 4,6%. O Ceará é o

estado com maior participação do leite na alimentação diária, quando comparado com os outros estados da região Nordeste, sendo esta participação de 4,6%. O leite pasteurizado foi o produto com maior aquisição *per capita* de acordo com a POF 2008-2009, principalmente nas áreas urbanas, enquanto o leite de vaca fresco apresenta grande consumo nas áreas rurais: a média de consumo *per capita* desse produto no Brasil é de aproximadamente 9kg, já a média de consumo nas áreas rurais é de aproximadamente 30kg dentro do período estabelecido (2008-2009) (IBGE, 2010).

1.2 Soro de Leite

O soro de leite é entendido como o líquido residual obtido a partir da coagulação do leite destinado à fabricação de queijos ou caseína (BRASIL, 2005). Estima-se que a produção mundial de soro de leite por ano seja de aproximadamente 190×10^6 toneladas (BALDASSO et al., 2011). Sendo um coproduto de grande importância alimentar, uma vez que é de fácil digestibilidade e hipoalergênico (TRANJAN, 2009), o soro de leite constitui de 85% a 90% do volume do leite usado para fabricação de queijo, retendo 55% dos nutrientes do leite. O soro líquido é composto por lactose (5%), água (93%), proteínas (0.85%), minerais (0.53%) e uma quantidade mínima de gordura (0,36%).

As proteínas do soro (dentre elas: beta-lactoglobulina, alfa-lactalbumina e lactoferrina) são a fonte das propriedades funcionais benéficas do soro (KRÓLCZYK et al., 2016), apresentando alto valor biológico, e sendo superior às proteínas do ovo, soja e até à caseína do leite (SMITHERS, 2008), principalmente por conta da alta quantidade de aminoácidos essenciais de cadeia ramificada (i.e. leucina, valina e isoleucina) que estimulam rotas metabólicas específicas associadas à produção de proteína muscular e desempenham um papel importante nas respostas hormonais à alimentação, como secreção de insulina (PESCUMA, 2010). Em sequências proteicas de beta-lactoglobulina, foram encontrados peptídeos como a beta-lactotensina, que exibe atividade hipocolesterolêmica e anti-estresse, e a beta-lactorfina, que influencia os músculos macios. Já na sequência da alfa-lactalbumina, foram encontrados peptídeos como a alfa-lactorfina, que mostra efeitos semelhantes à morfina, principalmente na diminuição da pressão sanguínea (CHATTERTON et al., 2006). Por fim, a lactoferrina tem um amplo espectro de propriedades confirmadas por pesquisas científicas, como antivirais, antibacterianas, antitumorais, antiinflamatórias e antifúngicas (KRÓLCZYK et al., 2016).

Mesmo tendo alto valor nutricional, o soro de leite é considerado um coproduto extremamente poluente da indústria de laticínios, principalmente por sua alta Demanda

Química de Oxigênio (DQO) na ordem de 60,000 a 80,000 ppm e por ser rico em matéria orgânica, também elevando sua Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), tornando seu descarte um problema ambiental (MAGALHÃES, 2010) além de oneroso. O despejo de soro em corpos d'água é estritamente proibido em vários países sob legislações ambientais rígidas, uma vez que pode ter efeito deletério em ecossistemas aquáticos (RYAN e WALSH, 2016). Quanto ao despejo em terra, o soro do leite pode levar à formação de sais no solo que o danificam e afetam o crescimento de formas de vida vegetais (KOSIKOWSKI, 1979) e comprometer seu potencial redox, fazendo com que metais como ferro e manganês sejam solubilizados e acabem contaminando reservatórios aquáticos (GHALY; RUSHTON; MAHMOUD, 2007).

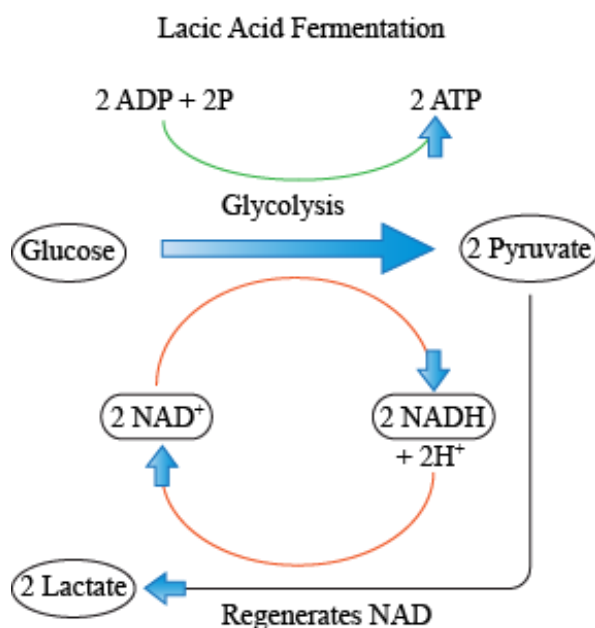
O soro do leite é uma excelente fonte de proteínas funcionais e peptídeos, além de vitaminas, minerais, lipídios e lactose, que podem ser explorados pela indústria agro-alimentar, da biotecnologia, médica e demais áreas afins dispostas a agregar valor a esse produto (SMITHERS, 2008). Uma vez que ele oferece a lactose como uma ótima fonte de carbono a microrganismos, o soro de leite pode ser utilizado em diversos processos biotecnológicos, como na produção de bioetanol, vinagre e antibióticos. A lactose também pode ser utilizada na fabricação de galactooligosacarídeos (GOS), considerados prebióticos (RYAN e WALSH, 2016). As proteínas do soro fornecem uma forma excelente de fortificar alimentos aumentando a qualidade nutricional de queijos, sobremesas lácteas, produtos de confeitaria etc (PESCUMA, 2008).

1.3 Fermentação de alimentos

A fermentação foi definida por Louis Pasteur como “la vie sans l'air” (a vida sem ar). Ela é caracterizada como uma rota metabólica alternativa que consome compostos orgânicos (i.e. carboidratos) e produz energia sem a presença de um agente oxidante exógeno (i.e. oxigênio) (BOURDICHON et al., 2012). De acordo com Tobin e Duschek (2005), é considerada a rota metabólica mais antiga, pois é a mais adequada à uma atmosfera pobre em oxigênio, quando comparada com a respiração aeróbia e fotossíntese de vegetais. Nesse processo, o NADPH reage com um aceptor de elétrons orgânico e exógeno - geralmente, o piruvato gerado durante a glicólise - com a reação produzindo NAD⁺ e um metabólito orgânico característico do processo e do microrganismo utilizado. Na presença de oxigênio, NADPH e piruvato são utilizados para a produção de ATP na respiração aeróbica (fosforilação oxidativa), e nesse caso a rota fermentativa raramente é utilizada. No entanto,

algumas cepas geneticamente modificadas de *Saccharomyces cerevisiae* preferem seguir por essa rota mesmo na presença de oxigênio (PISKUR e COMPAGNO, 2014). A Figura 1 esquematiza a utilização de uma molécula de glicose dentro da via fermentativa láctica.

Figura 1 - Fluxograma da rota metabólica de fermentação láctea, incluindo a glicólise para produção de piruvato e sua posterior utilização para regeneração do NAD^+ e consequente produção de lactato (ácido láctico)



Fonte: <https://www.shmoop.com/cell-respiration/fermentation-anaerobic-respiration.html>

Alimentos fermentados são usualmente definidos por comidas e bebidas desenvolvidas a partir de processos microbianos controlados e conversões enzimáticas de compostos no alimento, e são categorizados de acordo com os metabólitos gerados pelos microrganismos durante o processo: álcool e dióxido de carbono (fermentação alcoólica por leveduras), ácido acético (fermentação acética por bactérias do gênero *Acetobacter*), ácido láctico (fermentação láctica por bactérias ácido lácticas (LAB), como *Lactobacillus* e *Leuconostoc*) etc (MARCO et al., 2017). Esse processo começou a ser manipulado pela humanidade no período neolítico (6.000 anos a.C.) para a conservação de alimentos perecíveis (NAIR e PRAJAPATI, 2003), com o intuito primário de preservação: compostos produzidos por microrganismos durante o processo, como ácidos orgânicos (ácido láctico, ácido propiônico, ácido acético etc, que atuam diminuindo o pH do produto), bacteriocinas e etanol, são inibitórios do desenvolvimento de patógenos, muitas vezes usados em combinação com a redução da atividade da água (por ressecamento ou uso de sais) (GAGGIA et al., 2011; ROSS; MORGAN; HILL, 2002). Sob essa perspectiva, vemos a criação de produtos como a

cerveja, queijo, pão e vegetais fermentados, como o *kimchi* coreano e o *sauerkraut* alemão. As fermentações praticadas na antiguidade eram baseadas em microrganismos endógenos desconhecidos que carregavam o processo fermentativo, o que levava a pouca uniformidade dos produtos e ineficiência do processo. Nesse contexto, para se ter mais controle do processo, foram desenvolvidas culturas iniciais, ou simplesmente o uso contínuo de materiais de fermentações bem sucedidas. Essa técnica foi evoluída o suficiente para o que hoje entendemos como *starter cultures* em bioprocessos (IVEY; MASSEL; PHISTER, 2012).

Atualmente, a fermentação de alimentos não é desejada apenas por seu potencial preservativo, mas também pelo aumento da qualidade nutricional de alimentos (BOEKEL et al., 2010; POUTANEN; FANDER; KATINA, 2009) e as novas propriedades organolépticas e reológicas adquiridas durante o processo (MARILLEY et al., 2004; SMIT; SMIT; ENGELS, 2005), através de acidificação, alcoolização, proteólise ou conversão de aminoácidos (HUNGERHOLTZ, 2013; LEROY e VUYST, 2004). Durante a fermentação, a atividade enzimática da matéria-prima e a atividade metabólica dos microrganismos podem modificar as propriedades nutricionais e bioativas do alimento de uma maneira que traga consequências benéficas à saúde humana. Um exemplo claro disso é que queijos são mais facilmente digeridos por pessoas intolerantes à lactose, uma vez que durante a precipitação da caseína na fabricação de queijos, parte da lactose originária do leite fica retida no soro do leite (SAVAIANO, 2014).

Além dessas novas propriedades, está sendo cada vez mais compreendido que os efeitos benéficos dos alimentos fermentados estão muito pouco relacionados com a matéria prima em si e extremamente conectados com os resultados da fermentação e a carga microbiana presente, provendo propriedades adicionais que vão além da nutrição básica (MARCO et al., 2017). Estudos clínicos em humanos apontam efeitos benéficos relacionados com a ingestão de comidas fermentadas, como controle de peso (MOZAFFARIAN et al., 2011) e redução do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2 (CHEN et al., 2014). A interação intestino-cérebro tem sido um campo cada vez mais estudado, havendo indicações de que o consumo de alimentos fermentados pode alterar o humor e a atividade cerebral (TILLISCH et al., 2013; HILIMIRE; DEVYLDER; FORESTELL, 2015).

Por fim, os compostos produzidos em determinados tipos de fermentações mostram efeitos moduladores benéficos da saúde humana. O ácido láctico, por exemplo, produzido por LABs durante a fermentação láctica, é um metabólito que pode chegar em até 1% em determinadas bateladas. Em estudo realizado por Iraporda e colaboradores (2015), o ácido

lático (lactato) mostrou redução da secreção de citocininas pró-inflamatórias, além de alterar o potencial redox através da redução de espécies reativas de oxigênio presas em enterócitos intestinais (KAHLERT et al., 2016).

1.4 Produtos Simbióticos

Produtos simbióticos são definidos como uma seleção de probióticos e prebióticos que já tem efeitos benéficos comprovados, como aumentar a viabilidade de ativação de funções metabólicas em bactérias benéficas à saúde humana - especialmente do gênero lactobacilli e bifidobactéria - em todo o trato intestinal (PANDEY; NAIK; VAKIL, 2015). Um produto simbiótico afeta benéficamente a saúde de quem o consome através do aumento da sobrevivência e da implementação de microrganismos benéficos - oriundos de fontes dietárias - no trato gastrointestinal. Isso é possível através de estímulos seletivos no desenvolvimento e na atividade metabólica de um número restrito de bactérias promotoras de saúde (CENCIC e CHINGWARU, 2010). Tais produtos foram desenvolvidos para superar os problemas encontrados pelos probióticos: a passagem pelo trato intestinal superior, que apresenta barreiras químicas e mecânicas, dificultando o estabelecimento dos agentes probióticos no organismo (PANDEY; NAIK; VAKIL, 2015).

O termo “probiótico” vem do grego e significa “para a vida”, sendo usado para descrever microrganismos não-patogênicos e seus efeitos benéficos derivados ao organismo hospedeiro (PANDEY; NAIK; VAKIL, 2015), podendo ser a combinação de uma única espécie/cepa ou uma mistura de diversos microrganismos - sendo que os efeitos do produto podem variar dependendo da utilização da cepa sozinha ou em conjunto (CHAPMAN; GIBSON; ROWLAND, 2011). Eles atuam na ativação de processos metabólicos, melhorando a situação da saúde do hospedeiro pelo aumento da efetividade do sistema imunológico e prevenindo o aparecimento de patologias e doenças degenerativas (CHOCKCHAIWASDEE et al., 2005; THAMER E PENNA, 2006). A aceitação dos probióticos é ampla e vem crescendo ao redor do mundo, sendo este tipo de produto já bem aceito nos Estados Unidos, Japão, Europa e Austrália (SIRÓ et al., 2008). O segmento de produtos lácteos é o maior dentro do setor de probióticos, contribuindo com até 74% de participação no mercado (FROST-SULLIVAN, 2007), sendo estes a alternativa tecnológica mais adequada ao consumidor que procura produtos inovadores, diferentes e benéficos para a saúde e para o bem estar (ARAÚJO et al., 2010).

Dentre os objetivos da ingestão de probióticos estão a melhoria e a manutenção da microbiota intestinal, uma vez que crescentes evidências científicas apontam a relação entre a manutenção saudável da microbiota e a prevenção de doenças no trato gastrointestinal, incluindo infecções, desordens inflamatórias no intestino e até mesmo certos tipos de câncer (HAENEL E BENDIG, 1975; MITSUOKA, 1982; SALMINEN; OUWEHAND; ISOLAURI, 1998). Os efeitos mais bem documentados da ingestão de probióticos é a prevenção da diarreia, da constipação, das mudanças na conjugação salina da bile e aumento de atividades anti-bacterianas. Além desses efeitos, eles também contribuem para a síntese de determinados nutrientes e aumentam sua biodisponibilidade, e alguns probióticos podem inclusive apresentar atividade antioxidante (HARISH e VARGHESE, 2006).

As cepas probióticas precisam possuir certas características para receberem esse título. As bases teóricas para a seleção de microrganismos com potencial probiótico incluem segurança e aspectos tecnológicos e funcionais, que estão ilustrados na Figura 2, adaptado de Saarela e colaboradores (2000).

Figura 2 - As bases teóricas para a escolha de microrganismos com potencial probiótico incluem segurança, propriedades funcionais (aderência, sobrevivência, capacidade de colonização etc) e propriedades tecnológicas (crescimento na matéria prima, estabilidade, resistência à fagos etc)



Fonte: Adaptado do artigo "Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties", por Saarela e colaboradores (2000).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em instrução normativa, estabelece que probióticos são cepas de microrganismos viáveis, agindo como

auxiliares na recomposição da microbiota no trato digestório de animais, contribuindo para seu equilíbrio (BRASIL, 2004). Já a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) disponibiliza uma lista de espécies de microrganismos com comprovada atividade probiótica, dentre elas *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* incluindo a subespécie *B. lactis*, que são as espécies utilizadas no presente trabalho. Além disso, a ANVISA também especifica em resolução a quantidade mínima viável de microrganismos que deve haver na porção diária do produto que alegue potencial probiótico, sendo na faixa de 10^8 e 10^9 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) (BRASIL, 2002).

De acordo com Gibson e colaboradores (2004), que já definiu em 1995 prebióticos como “ingredientes alimentares não-digestíveis que afetam de forma benéfica a saúde de quem os consome através do estímulo seletivo no crescimento e/ou atividade de um ou um número restrito de bactérias benéficas no cólon”, atualmente os define como “ingredientes seletivamente fermentescíveis que permitem mudanças específicas, tanto na composição quanto na atividade, da microbiota gastrointestinal, conferindo efeitos benéficos a saúde do hospedeiro, mediante sua saúde e bem estar (GIBSON et al., 2004). Quando adicionados à alimentos, prebióticos conferem modulação da composição da microbiota de quem os consome (ROBERFROID, 2002).

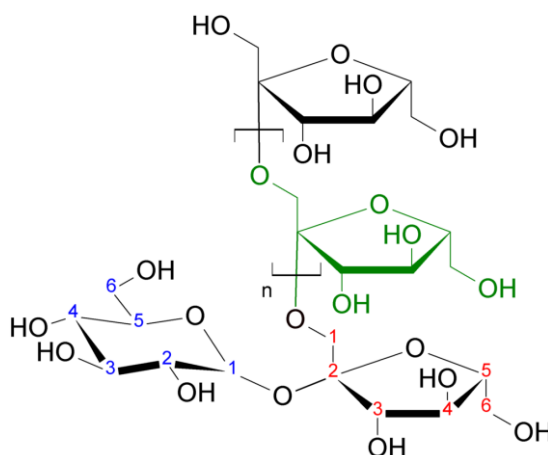
É bem estabelecido o conhecimento acerca da influência das bactérias colonizadoras da microbiota na saúde de seu hospedeiro (STEER et al., 2000). Isso traz a atenção aos probióticos como agentes reguladores e moduladores da microbiota, com o intuito de oferecer benefícios à saúde (ARYANA e MCGREW, 2007; LOSADA e OLLEROS, 2002). No entanto, o efeito dos prebióticos se mostra indireto uma vez que seletivamente alimentam um número específico de microrganismos, alterando seu metabolismo. Ou seja, não é o prebiótico em si que beneficia o hospedeiro, mas sim a microbiota modulada por ele, e as bactérias do gênero *bifidobacterium* e *lactobacillus* são as mais positivamente afetadas (TEITELBAUM e WALKER, 2002).

Dentre os prebióticos disponíveis no mercado, pode-se citar a inulina, os carboidratos frutooligossacarídeos (FOS) e galactooligossacarídeos (GOS), e a lactulose. Em um indivíduo saudável, esses produtos não são absorvidos no intestino delgado e seguem para fermentação pela microbiota do cólon, sendo transformados em ácidos graxos de cadeia curta (HERNANDEZ-HERNANDEZ et al., 2012). Nesse segmento, a inulina é um produto proeminente, consistindo de 2 a 60 subunidades de frutose unidas por ligações beta(2-1) com glicose como açúcar terminal (ROBERFROID et al., 1998), sendo uma fibra solúvel e fermentescível, não sendo digerida por enzimas do trato digestivo humano e assim não

contribuindo em calorias na dieta. Ela estimula o crescimento de bactérias benéficas no intestino, que por sua vez, suprimem o crescimento de possíveis bactérias patológicas (KOLIDA e GIBSON, 2007; JUSKIEWICZ et al., 2008).

A Figura 3 apresenta a fórmula estrutural da inulina.

Figura 3 - Fórmula estrutural da inulina (frutano)



Fonte: Wikipedia / Domínio Público

A inulina possui efeito bifidogênico, ou seja, estimula o crescimento e atividade de bactérias do gênero *bifidobacterium*, que por consequência estimula o sistema imunológico do hospedeiro, alívio de possíveis constipações, supressão de bactérias patogênicas, redução das chances de desenvolver osteoporose devido à redução comprometida de minerais (KAUR e GUPTA, 2002). Os frutanos são encontrados em plantas de diversas famílias, como *Liliaceae*, *Gramineae* e *Compositae*, e muitos membros dessas famílias são usualmente consumidos como vegetais em diversas culturas, como alho, aspargos, alcachofra, cebola e raiz da chicória - sendo esta última a fonte mais comum de inulina (VAN LOO et al., 1995; LEENHEER, 1996).

Essa fibra também já foi estudada por outros possíveis benefícios à saúde humana, como aumento da resistência contra infecções gastrointestinais (SAUER et al., 2007; WENDY et al., 2008), aumento da absorção de cálcio pelo organismo (DAHL et al., 2005; WEAVER et al., 2005) e ajuda na prevenção de hipertensão arterial (RAULT-NANIA et al., 2008) e de câncer de cólon (DAVIS e MILNER, 2009; GIBSON; MCCARTNEY; RASTALL, 2005; POOL-ZOBEL e SAUER, 2007).

Na indústria de alimentos, a inulina é utilizada como um substituto para gorduras. O pó da inulina, quando dissolvido em água, gera um líquido de textura cremosa que pode ser

incorporado em alimentos para substituir gorduras em até 100% (FRANCK, 2002). Ela também melhora a estabilidade de emulsões e espumas, podendo substituir também outros estabilizantes alimentares e melhorando sabor e textura de produtos já existentes (FRANCK e COUSSEMENT, 1997).

A ANVISA regulamenta a quantidade mínima de inulina em uma porção diária do produto para que este possa alegar que “contribui para o equilíbrio da flora intestinal”, que é de 3g para alimentos sólidos e 1,5g para alimentos líquidos (BRASIL, 2008).

1.5 Alimentos Funcionais

Nos últimos anos, a demanda do consumidor no campo da produção de alimentos tem mudado muito. Os consumidores vêm apresentado mais consciência em relação às escolhas alimentares, acreditando que a alimentação impacta diretamente em sua saúde (MOLLET e ROWLAND, 2002; YOUNG, 2000). Atualmente, os alimentos não são vistos como apenas para saciar a fome ou prover os nutrientes básicos para o ser humano, mas também prevenir doenças relacionadas à nutrição e melhorar o bem-estar físico e mental do consumidor (MENRAD, 2003). É nesse contexto que os alimentos funcionais desempenham um papel importante uma vez que a busca por esses produtos tem aumentado, especialmente por conta dos altos preços referentes ao sistema de saúde e aos medicamentos, o aumento estável da expectativa de vida em diversos países e a busca pela manutenção da qualidade de vida em idades avançadas (KOTILAINEN et al., 2006; ROBERFROID, 2000).

O termo “alimento funcional” foi primeiro cunhado por cientistas japoneses - que estudavam a relação entre nutrição, satisfação sensorial, fortificação e modulação dos sistemas biológicos (BURDOCK et al., 2006) - em 1984 para descrever alimentos fortificados com ingredientes especiais que promoviam efeitos fisiológicos benéficos (HARDY, 2000; KWAK e JUKES, 2001; STANTON et al., 2005). Atualmente, o termo “alimento funcional” define produtos alimentícios que conferem efeitos benéficos além dos valores nutricionais básicos da comida (KOLETZKO et al., 1998). Alimentos funcionais podem ser naturalmente ou artificialmente enriquecidos com substâncias de comprovados efeitos benéficos para a saúde humana: probióticos, prebióticos, ácidos graxos, flavonóides, vitaminas etc. Dessa forma, muitos produtos naturais podem ser considerados funcionais, como leite, vegetais e óleos de peixes (CLAUS et al., 2014). Niva (2007) também define alimentos funcionais como “alimentos com ingredientes tecnologicamente desenvolvidos e que proporcionem um efeito benéfico específico”. São vistas diversas definições do termo, e atualmente não há consenso

sobre a mais aceita, sendo que, na maioria dos países, não há uma definição legislativa em relação ao mesmo (ROBERFROID, 2002; ALZAMORA et al., 2005; MARK-HEBERT, 2004; NIVA, 2007).

No Brasil, a ANVISA oferece uma lista de alegações de propriedades funcionais e reúne diversos ingredientes, como ácidos graxos, fibras fermentescíveis e espécies probióticas (BRASIL, 2008).

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral: Elaborar uma bebida láctea com propriedade simbiótica e funcional, aproveitando um dos coprodutos da indústria queijeira.

Objetivos Específicos:

- Avaliar as mudanças físico-químicas na bebida láctea com diferentes concentrações de soro;
- Analisar a viabilidade de bactérias ácido-láticas probióticas ao longo do tempo e a influência da adição de inulina nessa viabilidade;
- Avaliar a influência de diferentes concentrações de soro de leite da bebida láctea na aceitação sensorial da mesma.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Leite

O leite comercial utilizado no trabalho foram da marca Betânia, tipo integral com 3% de gordura, previamente submetidos ao procedimento de esterilização pelo método Ultra High Temperature (UHT). Não foi feito tratamento térmico adicional no leite, e ele já seguiu para os reservatórios de fermentação onde foi misturado ao soro de leite.

3.1.2 Soro de Leite

Dez litros de soro de leite foram cedidos pela Fazenda Felipa, localizada no município de Morada Nova (Latitude: -5.106944 e Longitude: -38.372778) no estado do Ceará. O mesmo foi oriundo de precipitação enzimática para fabricação de queijo coalho. Antes de ser usado, o soro foi tratado termicamente no Laboratório de Nutrição, no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará (UFC), pasteurizado a 85 °C por 30 minutos, de acordo com a metodologia descrita por Caldeira et al (2010).

3.1.3 Agentes Fermentadores e Processo Fermentativo

O fermento lácteo utilizado foi da marca BioRich® e era composto por culturas de bactérias *Lactobacillus acidophilus* (cepa LA-5®) e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (cepa BB-12®). Essas espécies estão garantidas na lista da ANVISA de produtos com alegação de propriedade funcional confirmada e o fabricante garante que estas cepas sobrevivem durante a passagem pelo trato gastrointestinal (BRASIL, 2008).

O processo fermentativo foi conduzido de acordo com o recomendado pelo fabricante. Um sachê de 400mg de fermento foi adicionado por litro da mistura de leite e soro a 43±2 °C, após o tratamento térmico do soro de leite. A fermentação ocorreu em estufa BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) por 5h a 45±2 °C, até que o pH da bebida atingisse valores entre 4,5 e 5,0, considerando a metodologia aplicada por Almeida et al (2001). Após esse período, as formulações foram estocadas à 4±2 °C para interromper o processo fermentativo, como descrito por Caldeira et al (2010).

3.1.4 Inulina

A inulina da raiz da chicória (*Chicoryum intybus* L.) utilizada no trabalho foi da marca Fiber Bem, importada da Holanda em pacote de 500g. O aspecto do produto era o mesmo que o descrito por Franck (2002), como um pó branco e sem odor.

3.1.5 Leite de Coco

Foi utilizado leite de coco comercial pasteurizado da marca Sococo, cujos ingredientes são extrato vegetal de coco, água, conservadores INS 202, INS 211 e INS 223, acidulante INS 330, espessantes INS 466, INS 412 e INS 415, estabilizante INS 460, emulsificantes INS 435 e INS 471, não contendo glúten.

3.1.6 Doce de Leite

O doce de leite utilizado no presente trabalho foi preparado no Laboratório de Laticínios no Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal do Ceará (UFC). A acidez do leite comercial UHT foi corrigida até 13 graus Dornic, utilizando bicarbonato de sódio. Foi incorporado 20% de açúcar (p/v) ao leite, que foi então levado a fogo médio até que se atingisse 71 graus Brix (medido com auxílio de refratômetro portátil) de acordo com a metodologia descrita no comunicado técnico “Tecnologias de Fabricação dos Doces de Leite Pastoso em Tabletes” da EMBRAPA Amazônia Oriental (VIEIRA; LOURENÇO JR, 2004).

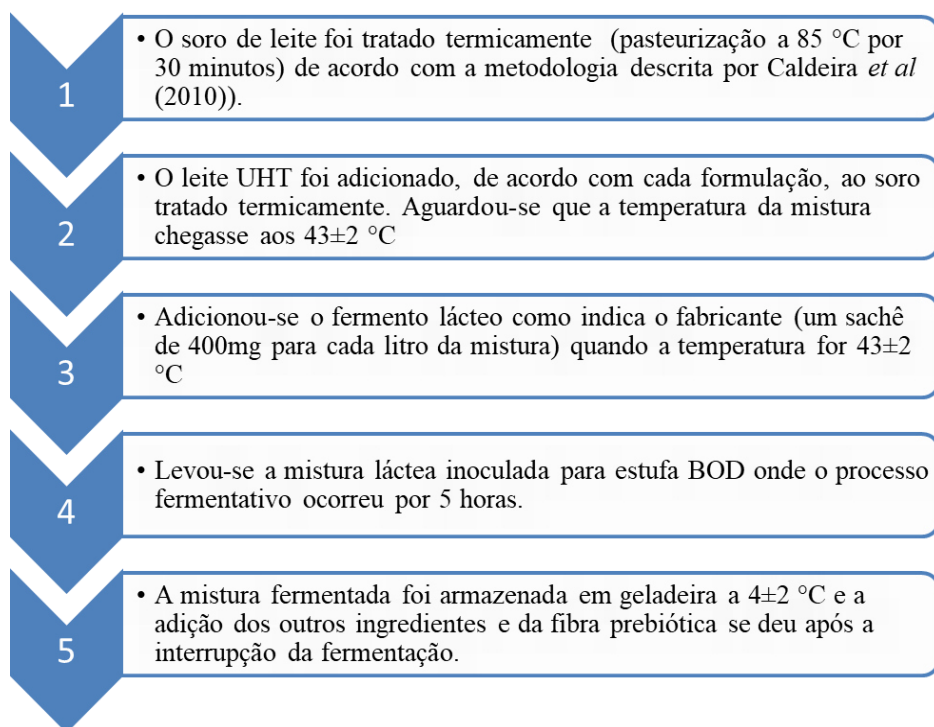
3.1.7 Preparo da bebida

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas, as mesmas são definidas como o produto obtido a partir de leite e/ou derivados, 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, 2000). Dessa maneira, foram elaboradas 3 (três) formulações de bebida láctea com 80% de base láctea que variava na proporção soro de leite/leite. Os outros ingredientes permaneceram padronizados.

Os reservatórios utilizados para a preparação das bebidas eram de vidro, com tampa rosqueada e capacidade para 3 litros. As amostras foram transferidas para garrafas PET de 2 litros para análise sensorial. O restante permaneceu no mesmo reservatório para análises físico-químicas.

A Figura 4 indica a metodologia e cronologia de produção para as bebidas lácteas. Já a Figura 5 indica as quantidades de cada ingrediente utilizado na formulação da bebida, com ênfase nos ingredientes que variam entre os tratamentos e que foram submetidos à fermentação (leite integral e soro de leite). Também é indicado os outros componentes que foram adicionados após a fermentação ser interrompida e cujas quantidades não variam entre os tratamentos (leite de coco, inulina e doce de leite).

Figura 4 – Fluxograma de preparação das bebidas lácteas



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 5 – Três formulações da bebida láctea e suas respectivas composições



Fonte: Elaborado pela autora

Foram ainda elaboradas bebidas sem inulina, para que fosse possível comparar a viabilidade e manutenção das bactérias ácido-lácticas em ambos os tratamentos. O restante da formulação manteve-se padronizado. As bebidas sem inulina foram submetidas às análises microbiológicas.

3.2 Métodos de Análise Físico-Química

As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Laticínios e no Laboratório de Frutos e Hortaliças do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará (UFC).

As análises de pH, acidez em ácido láctico, perda por dessecação (umidade) e resíduos por incineração (cinzas) foram realizadas de acordo com o livro *Métodos Físico-Químicos Para Análise de Alimentos* (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008) em cada uma das 3 formulações de bebida láctea, em triplicada. As análises foram realizadas uma semana após o preparo da bebida.

A análise de viscosidade aparente foi feita utilizando viscosímetro rotacional da marca Thermo Scientific®, modelo HAAKE Visco Tester 6L, utilizando a haste L2 e a velocidade de 60rpm.

Os resultados das análises físico-químicas foram submetidos à análise estatística ANOVA e teste de médias (Tukey) com 5% de significância.

3.3 Métodos de Análise Microbiológica

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará (UFC), que fornecia frascos estéreis de vidro para transporte e alocação das amostras destinadas à análise (Figura 5).

Para quantificação de bactérias ácido-láticas, foi utilizado o método de contagem em placas da American Public Health Association (APHA) descrita no Capítulo 19 da 4a Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (HALL; LEDENBACH; FLOWERS, 2001) e no Capítulo 8 da 7a Edição do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (FRANK; YOUSEF, 2004), também descrita por Silva et al (2017). As análises foram realizadas uma vez por semana durante os tempos 0, 7, 14 e 21 do produto, a partir da data de fabricação do mesmo para averiguar a viabilidade das bactérias ácido-láticas ao longo do prazo de validade do produto. Foram analisadas também amostras da bebida láctea sem inulina, para que a manutenção e viabilidade das bactérias ácido-láticas pudessem ser comparadas.

A ANVISA também requer análises referentes à segurança alimentar dos alimentos. Para leites fermentados (com ou sem adições e com bactérias lácteas viáveis nos números mínimos) e para bebidas lácteas (com ou sem adições), são requeridas análises microbiológicas para *Salmonella* sp/25mL e coliformes a 45 °C/g (BRASIL, 2001). A análise de coliformes foi feita utilizando o método de Número Mais Provável (NMP) da American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) e Water Environment Federation (WEF), descrita na sessão 9221 do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (HUNT E RICE, 2005), e também descrita por Silva et al (2017). As análises de *Salmonella* foram realizadas pelo método de presença/ausência ISO 6579:2002 para *Salmonella* em alimentos. Esse método é aplicável em produtos voltados para alimentação humana ou animal, e à amostras ambientais da área em que a comida está sendo produzida (SILVA et al., 2017).

Figura 6 – Frascos estéreis fornecidos pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos para transporte de amostras, já rotulados e preenchidos com a bebida láctea.



Fonte: a autora

3.4 Métodos de Análise Sensorial

A análise sensorial do produto foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará (UFC), que conta com oito cabines individuais para os provadores e sala de apoio para a preparação das amostras. Estas eram servidas em copos descartáveis de 50mL em números codificados com 3 dígitos, juntamente com um copo de 200mL de água, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1) e a ficha de avaliação sensorial (Anexo 2). A Figura 5 representa a disposição desses materiais na cabine individual para análise sensorial.

Foram consultados 60 provadores não treinados de idades entre 18 e 60 anos, de ambos os gêneros, para avaliação do produto em escala hedônica de 9 pontos (9-gostei muitíssimo, 5-Nem gostei nem desgostei e 1-desgostei muitíssimo) para cada um dos seguintes atributos: cor, aparência, aroma, sabor, consistência e aceitação global. Também foram avaliadas as intenções de compra entre as amostras (sendo a escala de 5- certamente compraria, 3- tenho dúvida se compraria e 1-certamente não compraria), bem como teste de idealidade para o atributo acidez (sendo 0-acidez ideal, +4- acidez extremamente mais forte que o ideal e -4-acidez extremamente menos forte que o ideal).

Foi utilizado delineamento completo balanceado e o tratamento estatístico de análise de variância (ANOVA) e teste de médias (Tukey), ambos com 5% de significância, foram realizados com o *software* Minitab 18. Os histogramas de frequência foram construídos no

software Microsoft Excel 2010. A disposição de elementos na cabine de análise sensorial realizada para o presente trabalho é apresentada na Figura 6.

Figura 6 – Disposição dos elementos na cabine de análise sensorial. Da esquerda para direita: brinde para o voluntário, bandeja com as três amostras a serem avaliadas, copo com água, borracha, lápis, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e ficha de análise sensorial



Fonte: a autora

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises Físico-Químicas

Os resultados das análises físico-químicas foram sumarizados na Tabela 1 e estão expressos nas seguintes unidades: grama (g) de ácido láctico por cento (m/v) para acidez titulável, centipoise (cP) para viscosidade, resíduo por incineração por cento (m/v) para cinzas e umidade a 105 °C por cento (m/m). O pH é adimensional. Os resultados representam as médias das triplicatas realizadas por tratamento em cada análise juntamente com seus respectivos desvios padrões. Apenas os valores de cinzas não apresentaram diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 1 - Resultados das análises físico-químicas para cada tratamento e seus respectivos desvios padrões. Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As amostras são reconhecidas como A1: 1:1 soro de leite/leite, A2: 3:1 soro de leite/leite, A3: 1:3 soro de leite/leite.

ANÁLISES	AMOSTRA A1 (1:1)	AMOSTRA A2 (3:1)	AMOSTRA A3 (1:3)
pH	$4,35 \pm 0,01^b$	$4,67 \pm 0,01^a$	$4,31 \pm 0,01^b$
ACIDEZ TITULÁVEL	$0,557 \pm 0,038^b$	$0,455 \pm 0,004^c$	$0,662 \pm 0,008^a$
VISCOSIDADE	$120,66 \pm 0,57^b$	$50,66 \pm 0,57^c$	$171,33 \pm 4,51^a$
CINZAS	$0,67 \pm 0,003^a$	$0,70 \pm 0,004^a$	$0,68 \pm 0,128^a$
UMIDADE	$80,88 \pm 0,04^b$	$81,64 \pm 0,04^a$	$80,77 \pm 0,31^b$

Fonte: Elaborado pela autora

Os valores de pH, acidez titulável, cinzas e umidade estão de acordo com trabalhos de Menezes (2011), Santos et al (2008) e Thamer e Penna (2005), e com o padrão aceito para bebidas lácteas fermentadas de acordo com os respectivos trabalhos.

O pH mais elevado da amostra A2, bem como seu menor teor de ácido láctico e maior teor de umidade, são resultados da maior proporção de soro de leite em sua base láctea. A substituição do leite pelo soro causa o aumento do teor relativo da água no produto, uma vez que há diminuição dos constituintes sólidos presentes no leite (OLIVEIRA et al., 2006). As amostras com igual proporção de leite e soro (A1) ou maior proporção de leite (A3), obtiveram resultados semelhantes e sem diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) nas análises de pH e umidade, justamente por não haver tanta diluição com soro.

A diluição também explica os resultados estatisticamente diferentes para viscosidade, uma vez que a amostra mais concentrada (A3) mostrou-se mais viscosa que a amostra parcialmente diluída (A1), e esta, por sua vez, mostrou-se mais viscosa que a amostra mais diluída com soro (A2).

4.2 Análise Microbiológica

Não foram detectados coliformes termotolerantes ou *Salmonella* em quantidades significativas em nenhuma das amostras em nenhum tempo analisado. Isso deve ser um reflexo do tratamento térmico prévio nos ingredientes frescos (leite e soro de leite), bem como o pH ácido (entre 4,3 e 4,6) do produto final, o qual inibe o crescimento de microrganismos patogênicos e alteradores dos alimentos de origem animal (ORDONEZ, 2005).

A Tabela 2 apresenta os resultados das análises microbiológicas para bactérias ácido-láticas viáveis ao longo de 21 dias, para tratamentos com e sem adição de inulina. O tempo T0 representa a contagem no dia de fabricação do produto e cada contagem seguinte ocorreu em intervalos de uma semana. Todas as amostras atendem à legislação no que diz respeito a quantidade mínima viável de bactérias probióticas para que seja possível alegar a propriedade funcional da bebida, considerando a porção como 100mL e que todas as bactérias presentes na contagem sejam probióticas (BRASIL, 1999).

Tabela 2 - Resultados das análises microbiológicas de bactérias ácido-láticas viáveis (UFC/mL) a cada sete dias a partir da data de fabricação do produto. As amostras B são referentes ao tratamento sem inulina, enquanto as amostras A contém a fibra prebiótica (A1/B1: 1:1 soro de leite/leite, A2/B2: 3:1 soro de leite/leite, A3/B3: 1:3 soro de leite/leite).

Amostras	T0	T1	T2	T3
A1	$1,3 \times 10^6$	$2,0 \times 10^5$	$3,2 \times 10^7$	$9,3 \times 10^7$
A2	$1,5 \times 10^7$	$4,5 \times 10^7$	$1,8 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
A3	$1,9 \times 10^7$	$2,0 \times 10^5$	$7,6 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$
B1	$1,0 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$	$5,3 \times 10^6$	$2,2 \times 10^7$
B2	$5,0 \times 10^6$	$1,9 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	$4,4 \times 10^7$
B3	$1,3 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$	$3,8 \times 10^7$

Fonte: Elaborado pela autora

De acordo com a Tabela 2, as bebidas lácteas no tratamento com adição de inulina apresentaram, no prazo final de análise, maior quantidade de bactérias ácido-láticas viáveis quando comparadas com as bebidas no tratamento sem inulina. Em trabalhos realizados por Bruno e colaboradores (2002) e Shin e colaboradores (2000) a adição de frutooligossacarídeos (FOS) e fibras prebióticas mostrou diminuição do tempo geracional de bactérias comerciais do gênero *Bifidobacterium* em produtos lácteos, o que pode explicar o crescimento bacteriano superior no tratamento com inulina. A maior ingestão de carga probiótica fornece maior garantia de colonização do trato intestinal por essas bactérias, e a inulina já mostra manter a viabilidade das mesmas desde a fabricação do produto.

Pode-se notar maior quantidade de bactérias ácido-láticas viáveis presentes ao final das amostras 2 dentro de cada tratamento (A2 e B2), sendo estas as amostras com maior teor de soro de leite e, por consequência, menor acidez. Resultados similares, onde bactérias probióticas cresceram de forma mais satisfatória em tratamentos de menor acidez, já foram reportados por Thamer et al (2005), que também fala da sensibilidade de *Bifidobacterium* e *L. acidophilus* ao abaixamento do pH, sendo estas bactérias utilizadas na elaboração da presente bebida láctea, o que explica os resultados observados quando compara-se as Tabelas 1 e 2.

Bebidas lácteas fermentadas comerciais apresentam, em média, valores em torno de 10^8 UFC/mL para bactérias ácido-láticas viáveis durante todo o prazo de validade do produto, de acordo com Andrade (2010). Mesmo que esses números não sejam constantes durante todo o prazo de validade de todas as amostras de bebida láctea do presente trabalho, eles são expressivos na contagem final (T3), e em 66,6% das amostras (com e sem inulina) durante os 21 dias de análise do produto (excluindo as amostras A1 e A3, que em T1 apresentaram $2,0 \times 10^5$ UFC/mL).

O maior número de bactérias ácido-láticas nos tratamentos com inulina indica consumo de carboidratos, podendo ser oriundos da inulina, do leite de coco e do doce de leite. Uma vez que a fermentação não ocasiona aumento da biomassa por não haver rendimento energético significativo, há indícios de respiração aeróbia por parte dos microrganismos mesmo em condições adversas, como temperaturas de resfriamento durante o acondicionamento.

4,3 Análise Sensorial

A Tabela 3 resume as médias de cada atributo para cada formulação da bebida láctea, dentro da escala hedônica de 9 pontos (1- desgostei muitíssimo e 9- gostei muitíssimo) e seus respectivos desvios padrões, Na análise de variância e teste de médias (Tukey $p < 0,05$), nenhuma média diferiu significativamente.

Tabela 3 - Resultados das médias da análise sensorial para seis atributos em escala hedônica de 1- desgostei muitíssimo a 9- gostei muitíssimo, Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$),

ATRIBUTOS	AMOSTRA A1 (1:1)	AMOSTRA A2 (3:1)	AMOSTRA A3 (1:3)
COR	$7,73 \pm 1,47^a$	$7,76 \pm 1,50^a$	$7,86 \pm 1,28^a$
APARÊNCIA	$7,58 \pm 1,33^a$	$7,58 \pm 1,41^a$	$7,73 \pm 1,37^a$
AROMA	$7,40 \pm 1,63^a$	$7,08 \pm 1,73^a$	$7,18 \pm 1,56^a$
SABOR	$6,90 \pm 1,86^a$	$6,41 \pm 2,43^a$	$7,03 \pm 1,70^a$
CONSISTÊNCIA	$7,05 \pm 1,82^a$	$6,65 \pm 1,99^a$	$7,11 \pm 1,69^a$
IMPRESSÃO GLOBAL	$6,91 \pm 1,88^a$	$6,48 \pm 2,07^a$	$7,13 \pm 1,53^a$

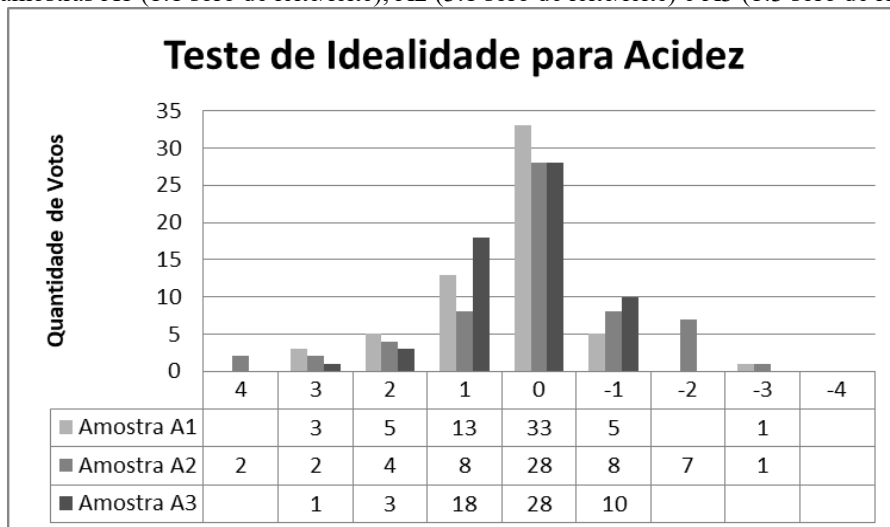
Fonte: Elaborado pela autora

De acordo com a Tabela 3, 72,22% dos atributos avaliados receberam médias superiores a 7, que, na escala hedônica utilizada, representa “gostei moderadamente”, Os atributos cor e aparência receberam as melhores avaliações entre os demais analisados, atingindo médias superiores a 7,5 e chegando muito próximo a 8 (referente na escala hedônica à “gostei muito”), Os 27,7% das médias restantes se enquadram no conceito 6 da escala, referente à “gostei ligeiramente”, O atributo pior avaliado foi o sabor, para todas as amostras, mas ainda reflete aceitação do produto dentro da escala hedônica,

Em números brutos, as médias da amostra A3 foram as mais elevadas (com exceção da média do aroma para a amostra A1) e ela não apresenta nenhuma média abaixo de 7, Sem a utilização de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$) pode-se dizer que a amostra A3 foi a mais bem aceita, mas nenhuma média difere significativamente entre si. Isso quer dizer que a amostra com maior teor de soro foi estatisticamente tão bem aceita quanto a com menor teor de soro, possibilitando a elaboração de um produto que incorpore mais desse resíduo da indústria queijeira e ainda tenha ampla aceitação sensorial. O soro de leite foi o único material do trabalho sem custo que aquisição, uma vez que foi doado e que é comumente considerado resíduo da produção de queijos. Dessa forma, a maior incorporação desse produto na bebida láctea ocasionaria redução nos custos de produção além da agregação de valor ao produto em questão.

O Gráfico 1 representa o histograma de frequência para os votos apurados no teste de idealidade para acidez. Do total de 180 avaliações (60 provadores avaliando 3 amostras), 49,44% representaram a idealidade, concentrando nessa categoria a maioria das avaliações. A amostra A1 teve 55% das suas avaliações na categoria “ideal” da escala, contra os 46,6% tanto para as amostras A2 e A3, sendo a melhor avaliada nesse aspecto. Esse resultado pode indicar que o maior equilíbrio entre as quantidades de leite e soro de leite influencia de forma benéfica a aceitação sensorial do produto, apesar da proximidade das avaliações.

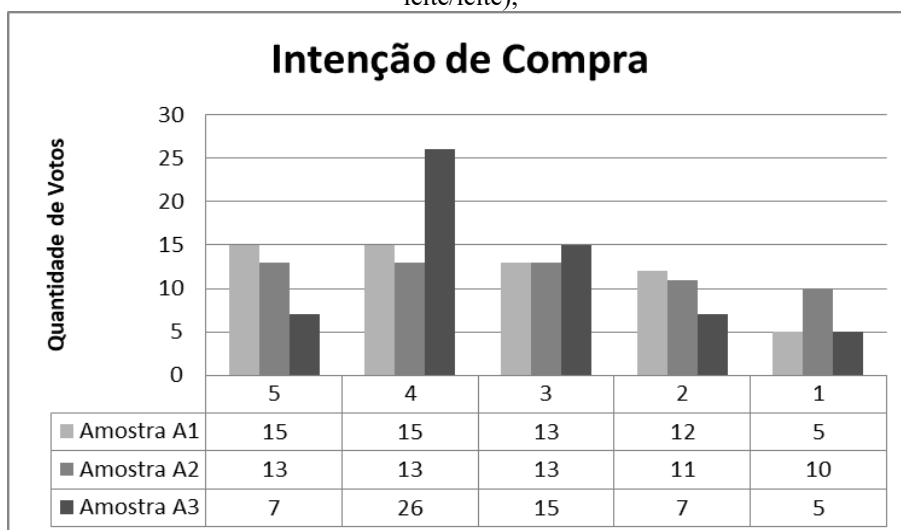
Gráfico 1 - Histograma dos resultados do teste de idealidade para a acidez da bebida láctea, onde 0 representa a idealidade, valores negativos sendo mais fracos que o ideal e valores positivos sendo mais fortes que o ideal, para as amostras A1 (1:1 soro de leite/leite), A2 (3:1 soro de leite/leite) e A3 (1:3 soro de leite/leite),



Fonte: Elaborado pela autora

O Gráfico 2 representa o histograma de frequência para as avaliações de intenção de compra que varia em escala de “1- certamente não compraria” a “5- certamente compraria”. A amostra A1 foi a que reuniu maior intenção de compra na categoria 5, e juntamente com a categoria 4 (“provavelmente compraria”) apresentou 50% das avaliações de intenção de compra positiva. A amostra A3 reuniu somente na categoria “4- provavelmente compraria” 43,3% das avaliações, mas não apresentou quantidade tão significativa na categoria 5, que enquadra intenção de compra positiva e certa.

Gráfico 2 - Resultados da intenção de compra para cada amostra, sendo 1- certamente não compraria e 5- certamente compraria para as amostras A1 (1:1 soro de leite/leite), A2 (3:1 soro de leite/leite) e A3 (1:3 soro de leite/leite),



Fonte: Elaborado pela autora

A amostra A2 reuniu o maior número de avaliações nas categorias “2- Provavelmente não compraria” e “1- Certamente não compraria”, totalizando 35%. Em comparação com as avaliações nas mesmas categorias para A1 (28,3%) e A3 (25%), a amostra A2 apresenta o maior índice de intenção de compra negativa. Em números brutos, essa amostra também foi a pior avaliada na análise sensorial, como mostra a Tabela 3 – possivelmente por conta do maior teor de soro de leite na base láctea, mas sem diferença estatística significativa.

Dentre as amostras elaboradas, a amostra A1 seria a escolhida para ser produzida e melhorada através de pesquisas, uma vez que incorpora mais soro que a amostra A3 (melhor avaliada em números brutos), sem diferenciar significativamente dela na maioria das análises, principalmente quando comparada com a amostra A2. Ela se distancia dos fatores que fizeram a amostra A2 ser pior avaliada e suas análises físico-químicas são menos significativamente semelhantes que as da amostra A3.

5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a bebida láctea fermentada teve boa aceitação sensorial pela avaliação em escala hedônica, foi majoritariamente avaliada com acidez ideal e apresentou razoável intenção positiva de compra. Não havendo diferença estatística significativa em qualquer média de qualquer atributo analisado na análise sensorial, afirma-se que a incorporação de maiores quantidades de soro de leite na bebida láctea ainda teria boa aceitação sensorial, diminuindo os custos de produção uma vez que essa matéria prima ainda não é devidamente valorizada. A viabilidade dos microrganismos probióticos durante os 21 dias de análise do produto atendem a regulamentação para alegação de atividade probiótica, assim também podendo alegar propriedade funcional. Pelas análises microbiológicas, a inulina auxiliou na viabilidade das bactérias ácido-láticas, uma vez que tratamentos com inulina apresentaram maior contagem no prazo final de análise do produto. As análises físico-químicas são condizentes com trabalhos prévios e se mostram dentro do encontrado para bebidas lácteas fermentadas, apresentando coerência em relação às formulações diferentes. A amostra A1 (1:1 soro de leite/leite) seria a escolhida para elaboração de um produto final.

6 PERSPECTIVAS

Como perspectivas futuras, deve-se fazer análise de proteína total nas amostras, análise de pH ao longo do tempo para avaliar o processo fermentativo, análise do teor de lactose antes e depois da fermentação bem como análise do teor de gordura do produto final, afim de caracterizá-lo de forma mais completa. Também deve-se avaliar a aceitação de bebidas fermentadas por outras culturas de microrganismos, bem como adicionadas de outros extratos vegetais. É importante também caracterizar a viabilidade de cada cepa probiótica separadamente através de métodos diferenciados de cultivo para cada gênero de bactéria ácido-láctica, afim de reconhecer o efeito da fibra prebiótica em cada uma delas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKALIN, A, S.; FENDERYA, S.; AKBULUT, N, Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage, **International Journal of Food Science and Technology**, v, 39, n, 6, p, 613–621, 2004.
- ALMEIDA, K, E, D.; BONASSI, I, A.; ROÇA, R, D, O, Características Físicas E Químicas De Bebidas Lácteas Fermentadas E Preparadas Com Soro De Queijo Minas Frescal, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v, 21, n, 2, p, 187–192, 2001.
- ALZAMORA, S, M, *et al*, Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds, **Journal of Food Engineering**, v, 67, n, 1-2, p, 205–214, 2005.
- ANDRADE, E, H, P, Qualidade físico-química, microbiológica e detecção de soro lácteo por cromatografia líquida de alta eficiência em bebidas lácteas fermentadas, 68p, 1984.
- ARAÚJO, E, A, *et al*, Development of a symbiotic cottage cheese added with *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 and inulin, **Journal of Functional Foods**, v, 2, n, 1, p, 85–89, 2010.
- ARYANA, K, J.; MCGREW, P, Quality attributes of yogurt with *Lactobacillus casei* and various prebiotics, **LWT - Food Science and Technology**, v, 40, n, 10, p, 1808–1814, 2007.
- BALDASSO, C.; BARROS, T.; TESSARO, I. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, n. 1-3, p. 381–386, 2011.
- BENJAMIN, S.; SPENER, F. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. **Nutrition & Metabolism**, v. 6, n. 1, p. 36, 2009.
- BOEKEL, M, V, *et al*, A review on the beneficial aspects of food processing, **Molecular Nutrition & Food Research**, v, 54, n, 9, p, 1215–1247, Apr, 2010.
- BOURDICHON, F, *et al*, Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use, **International Journal of Food Microbiology**, v, 154, n, 3, p, 87–97, 2012.
- BOYE, J.; WIJESINHA-BETTONI, R.; BURLINGAME, B, Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method, **British Journal of Nutrition**, v, 108, n, S2, 2012.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, Resolução RDC nº, 19, de 30 de abril de 1999, **Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem**, Diário Oficial da União, Brasília, DF, 3 de maio de 1999.
- BRASIL, ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução - RDC N12 , **Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos Para Alimentos**, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. MAPA. **Instrução Normativa MAPA nº 16 de 23/08/2005. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea.** 2005.

BRASIL, ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Lista de Alegações de Propriedade Funcional Aprovadas**, 2008, Disponível em http://www.ufrgs.br/alimentus/disciplinas/tecnologia-de-alimentos-especiais/alimentos-funcionais/Anvisa_Alegacoesdepropriedadefuncionalaprovadas.pdf

BRUNO, F.; LANKAPUTHRA, W.; SHAH, N, Growth, Viability and Activity of Bifidobacterium spp, in Skim Milk Containing Prebiotics, **Journal of Food Science**, v, 67, n, 7, p, 2740–2744, 2002,

BURDOCK, G, A.; CARABIN, I, G.; GRIFFITHS, J, C, The importance of GRAS to the functional food and nutraceutical industries, **Toxicology**, v, 221, n, 1, p, 17–27, 2006,

CENCIC, A.; CHINGWARU, W, The Role of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements in Intestinal Health, **Nutrients**, v, 2, n, 6, p, 611–625, Jan, 2010,

CHAPMAN, C, M, C.; GIBSON, G, R.; ROWLAND, I, Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? **European Journal of Nutrition**, v, 50, n, 1, p, 1–17, 2011,

CHATTERTON, D, E, *et al*, Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin—Technological implications for processing, **International Dairy Journal**, v, 16, n, 11, p, 1229–1240, 2006,

CHEN, M, *et al*, Dairy consumption and risk of type 2 diabetes: 3 cohorts of US adults and an updated meta-analysis, **BMC Medicine**, v, 12, n, 1, 2014,

CHOCKCHAI SAWASDEE, S, *et al*, Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*: Studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors, **Biotechnology and Bioengineering**, v, 89, n, 4, p, 434–443, 2005,

CLAUS, S, P, Development of personalized functional foods needs metabolic profiling, **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v, 17, n, 6, p, 567–573, 2014,

DAHL, W, J, *et al*, Effects of thickened beverages fortified with inulin on beverage acceptance, gastrointestinal function, and bone resorption in institutionalized adults, **Nutrition**, v, 21, n, 3, p, 308–311, 2005,

DAVIS, C, D.; MILNER, J, A, Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention, **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v, 20, n, 10, p, 743–752, 2009,

E., G, A, *et al*, Potential Environmental and Health Impacts of High Land Application of Cheese Whey, **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v, 2, n, 2, p, 106–117, Jan, 2007,

FAO, Food and Agriculture Organization, **Milk and dairy products in human nutrition**, Rome; 2013,

FRANCK, A, Technological functionality of inulin and oligofructose, **British Journal of Nutrition**, v, 87, n, S2, 2002,

FRANCK, A., COUSSEMENT, P., **Multi-functional inulin**, Food Ingredients Anal, Int., October, 8–10, 1997

FRANK, J, F.; YOUSEF, A, E, **Standard Methods for the Examination of Dairy Products** 17^a, ed, Washington: American Public Health Association, 2004, 227 - 248 p,

FROST-SULLIVAN, Strategic Analysis of the European Food and Beverage Probiotics Markets (#B956-88) , London: **Frost & Sullivan Ltd**, 2007,

GAGGIA, F, *et al*, The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety, **Trends in Food Science & Technology**, v, 22, 2011.

GHALY, A.; RUSHTON, D.; MAHMOUD, N. Potential Air and Groundwater Pollution from Continuous High Land Application of Cheese Whey. **American Journal of Applied Sciences**, v. 4, n. 9, p. 619–627, Jan. 2007.

GIBSON, G, R.; MCCARTNEY, A, L.; RASTALL, R, A, Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections, **British Journal of Nutrition**, v, 93, n, S1, 2005.

GIBSON, G, R, *et al*, Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics, **Nutrition Research Reviews**, v, 17, n, 02, p, 259, 2004.

HAENEL, H., BENDIG, J, Intestinal flora in health and disease, **Progressions in Food Nutrition Science**, Ed 1, 21 – 64, 1975.

HALL, P,A; LEDENBACH, L.; FLOWERS, R,S, **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods** , 4^a, ed, Washington: American Public Health Association, 201 - 207 p, 2001.

HARDY, G, Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning, **Nutrition**, v, 16, n, 7-8, p, 688–689, 2000.

HARISH, K., VARGHESE, T, Probiotics in humans—evidence based re-view, **Calicut Med Journal**, Ed 4(4):e3, 2006.

HERNANDEZ-HERNANDEZ, O, *et al*, Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of Lactobacillus, **Food Microbiology**, v, 30, n, 2, p, 355–361, 2012.

HILIMIRE, M, R.; DEVYLDER, J, E.; FORESTELL, C, A, Fermented foods, neuroticism, and social anxiety: An interaction model, **Psychiatry Research**, v, 228, n, 2, p, 203–208, 2015.

HUGENHOLTZ, J, Traditional biotechnology for new foods and beverages, **Current Opinion in Biotechnology**, v, 24, n, 2, p, 155–159, 2013.

HUNT, J, R.; JOHNSON, L, K.; ROUGHHEAD, Z, F, Dietary protein and calcium interact to influence calcium retention: a controlled feeding study, **The American Journal of Clinical Nutrition**, v, 89, n, 5, p, 1357–1365, Nov, 2009.

HUNT, M,E, & RICE, E,W, Microbiological examination, In: Eaton, A,D,, Clesceri, L,S,, Rice, E,W, & Greenberg, A,E, (eds), **Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, 21st edition, Washington, American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF), Part 9000**, pp, 9,1–9,169, 2005.

HUTH, P, J.; PARK, K, M, Influence of Dairy Product and Milk Fat Consumption on Cardiovascular Disease Risk: A Review of the Evidence, **Advances in Nutrition**, v, 3, n, 3, p, 266–285, Jan, 2012.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, **Pesquisa de orçamentos familiares 2008 - 2009**, Rio de Janeiro: IBGE; 2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, Métodos físico-químicos para análises de alimentos**, 4ª ed, (1ª Edição digital), 1020 p. , 2008.

IRAPORDA, C, *et al*, Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells, **Immunobiology**, v, 220, n, 10, p, 1161–1169, 2015.

IVEY, M.; MASSEL, M.; PHISTER, T, G, Microbial Interactions in Food Fermentations, **Annual Review of Food Science and Technology**, v, 4, n, 1, p, 141–162, 2013.

JUŚKIEWICZ, J, *et al*, Metabolic response of the gastrointestinal tract and serum parameters of rabbits to diets containing chicory flour rich in inulin, **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v, 92, n, 2, p, 113–120, 2008.

KAHLERT, S, *et al*, Physiological Concentration of Exogenous Lactate Reduces Antimycin A Triggered Oxidative Stress in Intestinal Epithelial Cell Line IPEC-1 and IPEC-J2 In Vitro, **Plos One**, v, 11, n, 4, Jul, 2016.

KAUR, N.; GUPTA, A, K, Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition, **Journal of Biosciences**, v, 27, n, 7, p, 703–714, 2002.

KOLETZKO, B, *et al*, Growth, development and differentiation: a functional food science approach, **British Journal of Nutrition**, v, 80, n, S1, 1998.

KOLIDA, S.; GIBSON, G, R, Prebiotic Capacity of Inulin-Type Fructans, **The Journal of Nutrition**, v, 137, n, 11, Jan, 2007.

KOSIKOWSKI, F, V, Whey Utilization and Whey Products, **Journal of Dairy Science**, v, 62, n, 7, p, 1149–1160, 1979.

KOTILAINEN, L.; RAJALAHTI, R.; RAGASA, C.; PEHU, E, *Health enhancing foods : opportunities for strengthening developing countries (English)*, **Agriculture and Rural Development discussion paper** ; no, 30, Washington, DC: World Bank, 2006.

KRÓLCZYK, J, B, *et al*, Use of Whey and Whey Preparations in the Food Industry – A Review, **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v, 66, n, 3, p, 157–165, Jan, 2016.

KWAK, N,-S,; JUKES, D, J, Functional foods, Part 1: the development of a regulatory concept, **Food Control**, v, 12, n, 2, p, 99–107, 2001.

LEENHEER, L, D, Production and use of inulin: Industrial reality with a promising future, **Carbohydrates as Organic Raw Materials III**, p, 67–92, [s,d,].

LEROY, F,; VUYST, L, D, Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry, **Trends in Food Science & Technology**, v, 15, n, 2, p, 67–78, 2004.

LIMA, U, D, E, A, *et al*, **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**, [s,l,] Blucher, 2001,

LOO, J, V, *et al*, On the presence of Inulin and Oligofructose as natural ingredients in the western diet, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v, 35, n, 6, p, 525–552, 1995,

LOSADA, M,; OLLEROS, T, Towards a healthier diet for the colon: the influence of fructooligosaccharides and lactobacilli on intestinal health, **Nutrition Research**, v, 22, n, 1-2, p, 71–84, 2002,

MAGALHÃES, K, T, *et al*, Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: Evaluation of morphological and microbial variations, **Bioresource Technology**, v, 101, n, 22, p, 8843–8850, 2010,

MARCO, M, L, *et al*, Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond, **Current Opinion in Biotechnology**, v, 44, p, 94–102, 2017,

MARILLEY, L, Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains, **International Journal of Food Microbiology**, v, 90, n, 2, p, 139–159, 2004,

MARK-HERBERT, C, Innovation of a new product category — functional foods, **Technovation**, v, 24, n, 9, p, 713–719, 2004,

MENEZES, Adriana Carla Santos de, **DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA À BASE DE SORO DE LEITE E POLPA DE CAJÁ (SPONDIAS MOMBIN L.) COM POTENCIAL ATIVIDADE PROBIÓTICA**, 2011, 106 p, Dissertação (Pós Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos)- Departamento de Ciências Domésticas, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011,

MENRAD, K, Market and marketing of functional food in Europe, **Journal of Food Engineering**, v, 56, n, 2-3, p, 181–188, 2003,

MILLS, S, *et al*, Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health, **International Dairy Journal**, v, 21, n, 6, p, 377–401, 2011,

MITSUOKA, T, Recent Trends in Research on Intestinal Flora, **Bifidobacteria and Microflora**, v, 1, n, 1, p, 3–24, 1982,

MOLLET, B.; ROWLAND, I, Functional foods: at the frontier between food and pharma, **Current Opinion in Biotechnology**, v, 13, n, 5, p, 483–485, 2002,

MOZAFFARIAN, D, *et al*, Changes in Diet and Lifestyle and Long-Term Weight Gain in Women and Men, **New England Journal of Medicine**, v, 364, n, 25, p, 2392–2404, 2011,

MUNIZ, L, C.; MADRUGA, S, W.; ARAÚJO, C, L, Consumo de leite e derivados entre adultos e idosos no Sul do Brasil: um estudo de base populacional, **Ciência & Saúde Coletiva**, v, 18, n, 12, p, 3515–3522, 2013,

NAIR, B.; PRAJAPATI, J, The History of Fermented Foods, **Handbook of Fermented Functional Foods Functional Foods and Nutraceuticals**, p, 1–25, 2003,

NIVA, M, ‘All foods affect health’: Understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented Finns, **Appetite**, v, 48, n, 3, p, 384–393, 2007,

O USO DA INULINA NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS, Disponível em: <<http://aditivosingredientes.com.br/artigos/ingredientes-funcionais/o-uso-da-inulina-na-industria-de-alimentos>>

OLIVEIRA, L, Probióticos, prebióticos e simbióticos: definição, benefícios e aplicabilidade industrial, , **Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais / CETEC**, 2014,

OLIVEIRA, V, M, D, *et al*, Avaliação sensorial de bebida láctea fermentada com diferentes concentrações de soro de queijo, enriquecida com ferro, **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v, 13, n, 2, p, 67–70, 2006,

ORDÓÑEZ, Juan A, *et al*, (Org.), **Tecnologia de Alimentos** , Porto Alegre: Artmed, 2005, 294 p, v, 1,

PANDEY, K, R.; NAIK, S, R.; VAKIL, B, V, Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review, **Journal of Food Science and Technology**, v, 52, n, 12, p, 7577–7587, 2015,

PEREIRA, P, C, Milk nutritional composition and its role in human health, **Nutrition**, v, 30, n, 6, p, 619–627, 2014,

PESCUMA, M, *et al*, Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria, **International Journal of Food Microbiology**, v, 141, n, 1-2, p, 73–81, 2010,

PESCUMA, M, *et al*, Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content, **Food Microbiology**, v, 25, n, 3, p, 442–451, 2008,

PIŠKUR JURE; COMPAGNO, C, **Molecular mechanisms in yeast carbon metabolism**, Tradução , [s,l,] Springer, 2014,

POOL-ZOBEL, B, and SAUER, J, “Overview of experimental data on reduction of colorectal cancer risk by inulin-type fructans”, **The Journal of Nutrition**, Vol, 137, pp, 2580-4, 2007

POUTANEN, K.; FLANDER, L.; KATINA, K, Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective, **Food Microbiology**, v, 26, n, 7, p, 693–699, 2009,

PROBIÓTICOS, prebióticos e simbióticos, **Funcionais Nutracêuticos**, São Paulo, n, 2, p, 55-62, [2010?], Disponível em: <http://www.insumos.com.br/funcionais_e_nutraceuticos/materias/87.pdf>, Acesso em: 13 nov, 2018,

RAIZEL, R, et al, Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano, **Revista Ciência & Saúde**, Porto Alegre, v, 4, n, 2, p, 66-74, 2011,

RAULT-NANIA, M,-H, *et al*, Inulin supplementation prevents high fructose diet-induced hypertension in rats, **Clinical Nutrition**, v, 27, n, 2, p, 276–282, 2008,

ROBERFROID, M, Functional food concept and its application to prebiotics, **Digestive and Liver Disease**, v, 34, 2002,

ROBERFROID, M, B.; LOO, J, A, E, V.; GIBSON, G, R, The Bifidogenic Nature of Chicory Inulin and Its Hydrolysis Products, **The Journal of Nutrition**, v, 128, n, 1, p, 11–19, Jan, 1998,

ROBERFROID, M, B, Concepts and strategy of functional food science: the European perspective, **The American Journal of Clinical Nutrition**, v, 71, n, 6, Jan, 2000,

ROBERFROID, M, B, Introducing inulin-type fructans, **British Journal of Nutrition**, v, 93, n, S1, 2005,

ROSS, R, P.; MORGAN, S.; HILL, C, Preservation and fermentation: past, present and future, **International Journal of Food Microbiology**, v, 79, n, 1-2, p, 3–16, 2002,

RYAN, M, P.; WALSH, G, The biotechnological potential of whey, **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v, 15, n, 3, p, 479–498, 2016,

SAARELA, M, *et al*, Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties, **Journal of Biotechnology**, v, 84, n, 3, p, 197–215, 2000,

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.; ISOLAURI, E, Clinical Applications of Probiotic Bacteria, **International Dairy Journal**, v, 8, n, 5-6, p, 563–572, 1998,

SANTOS, Calila Teixeira et al, **INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SORO NA ACEITAÇÃO SENSORIAL DE BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA COM POLPA DE MANGA**, Araraquara: Alim, Nutr., 2008, 55-60 p, v, 19,

SAUER, J.; RICHTER, K, K.; POOL-ZOBEL, B, L, Products formed during fermentation of the prebiotic inulin with humangut flora enhance expression of biotransformation genes in human primary colon cells, **British Journal of Nutrition**, v, 97, n, 05, p, 928, Jul, 2007,

SAVAIANO, D, A, Lactose digestion from yogurt: mechanism and relevance, **The American Journal of Clinical Nutrition**, v, 99, n, 5, Feb, 2014,

SILVA, Neusely da et al, **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**, 5, ed, São Paulo: Blucher, 560 p, 2017,

SIRÓ, I, *et al*, Functional food, Product development, marketing and consumer acceptance—A review, **Appetite**, v, 51, n, 3, p, 456–467, 2008,

SHIN, H,-S, *et al*, Growth and Viability of Commercial Bifidobacterium spp in Skim Milk Containing Oligosaccharides and Inulin, **Journal of Food Science**, v, 65, n, 5, p, 884–887, 2000,

SMIT, G,; SMIT, B, A,; ENGELS, W, J, Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products, **FEMS Microbiology Reviews**, v, 29, n, 3, p, 591–610, 2005,

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

SOUSA, G, T, *et al*, Dietary whey protein lessens several risk factors for metabolic diseases: a review, **Lipids in Health and Disease**, v, 11, n, 1, p, 67, 2012,

SOUZA, G, Fatores de qualidade do iogurte, **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Piracicaba, v, 21, n, 1, p, 20-27, 1991,

STANTON, C, *et al*, Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites, **Current Opinion in Biotechnology**, v, 16, n, 2, p, 198–203, 2005,

STEER, T, *et al*, Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro and prebiotics, **Nutrition Research Reviews**, v, 13, n, 02, p, 229, 2000,

TEITELBAUM, J, E,; WALKER, W, A, Nutritional Impact of Probiotics as Protective Gastrointestinal Organisms, **International Seminars In Pediatric Gastroenterology And Nutrition**, v, 11, n, 03, p, 001, 2002,

THAMER, K, G,; PENNA, A, L, B, Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas, **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v, 41, n, 3, 2005,

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,

TILLISCH, K, *et al*, Consumption of Fermented Milk Product With Probiotic Modulates Brain Activity, **Gastroenterology**, v, 144, n, 7, 2013,

TOBIN, A, J,; DUSHECK, J, **Asking about life**, Tradução , [s,l,] Brooks/Cole, 2005,

TRANJAN, B, C, *et al*, Development of goat cheese whey-flavoured beverages, **International Journal of Dairy Technology**, v, 62, n, 3, p, 438–443, 2009,

WANG, Y, Prebiotics: Present and future in food science and technology, **Food Research International**, v, 42, n, 1, p, 8–12, 2009,

WEAVER, C, M, Inulin, oligofructose and bone health: experimental approaches and mechanisms, **British Journal of Nutrition**, v, 93, n, S1, 2005,

YAP, W, K, *et al*, Changes in Infants Faecal Characteristics and Microbiota by Inulin Supplementation, **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v, 43, n, 3, p, 159–166, 2008,

YOUNG, Y, Functional foods and the European consumer, In J, Buttriss & M, Saltmarsh (Eds.), Functional foods, II, Claims and evidence , London, UK: **The Royal Society of Chemistry**, I, Siro' et al, / Appetite 5, 2000,

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está convidado a participar, sem qualquer tipo de pagamento, da pesquisa intitulada: **“DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA LÁCTEA SIMBIÓTICA E FUNCIONAL SABOR CÔCO COM DOCE DE LEITE”**. Você não deve participar contra sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

O material a ser sensorialmente avaliado é uma bebida láctea fermentada por bactérias ácido-lácticas probióticas do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, constituída de leite integral e soro de leite bovino em diferentes concentrações, leite de côco, doce de leite e inulina (fibra pré-biótica extraída da raiz da chicória). Não apresenta benefícios imediatos. Os riscos se apresentam somente às pessoas intolerantes ou alérgicas à algum dos componentes do produto. O objetivo do presente trabalho é utilizar um co-produto da fabricação de queijos, o soro de leite, que ainda é indevidamente descartado e é considerado extremamente poluente, de forma alternativa e voltada para o aproveitamento alimentar. No entanto, este mesmo co-produto contém de 55% à 60% dos nutrientes do leite, incluindo proteínas e açúcares, com baixíssimo teor de gordura. O trabalho também busca desenvolver um produto funcional, ou seja, que ofereça benefícios à saúde de quem o consome, se consumido periodicamente a longo prazo. Os dados recolhidos da análise sensorial serão utilizados no desenvolvimento somente nesta pesquisa para a elaboração do trabalho de conclusão de curso da referida responsável pela pesquisa e em possíveis artigos e trabalhos que impulsionem o uso desse co-produto de forma alternativa e agradável ao consumidor, com as identidades dos participantes mantidas em sigilo para este ou qualquer outro fim.

Endereço dos responsáveis pela pesquisa:

Nome: Raissa Feitosa Bezerra
Instituição: Universidade Federal do Ceará
Endereço: Avenida Mister Hull, 2977, Bloco 858, Campus do Pici - Fortaleza - CE
Telefones para contato: (85) 3264 0933/ (85) 99148 9009

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira). O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

O abaixo assinado _____, _____ anos, RG: _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante de uma pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Fortaleza, ____ / ____ / ____

Nome do participante da pesquisa

Data

Assinatura

Nome do pesquisador

Data

Assinatura

Nome do profissional
que aplicou o TCLE

Data

Assinatura

FORMULÁRIO PARA ANÁLISE SENSORIAL

Nome: _____ Data: _____
Sexo: () Feminino () Masculino Idade: () 18-25 () 26-35 () 36- 56 () acima de 57
Grau de escolaridade: _____

Por favor, antes de avaliar as amostras responda este questionário.

- 1) Com que frequência você consome produtos lácteos?

() Semanalmente () Ocasionalmente () Quinzenalmente

() Não consumo
- 2) Com que frequência você consome produtos com côco?

() Semanalmente() Ocasionalmente() Quinzenalmente

() Não consumo
- 3- O quanto você gosta de leite fermentado?
- () Gosto muitíssimo () Gosto moderadamente () Não gosto
- () Gosto muito () Gosto ligeiramente
- 4- O quanto você gosta de côco ou produtos derivados de côco (leite doce etc)?
- () Gosto muitíssimo () Gosto moderadamente () Não gosto
- () Gosto muito () Gosto ligeiramente

6- Por favor, avalie cada uma das amostras servidas utilizando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou com relação a cor, aparência, aroma, sabor, consistência e impressão global

Amostra	Cor	Aparência	Aroma	Sabor	Consistência	Intenção Global

- 9.Gostei muitíssimo

8. Gostei muito

7. Gostei moderadamente

6. Gostei ligeiramente

5. Nem gostei e nem desgostei
4. Desgostei ligeiramente

3. Desgostei moderadamente

2. Desgostei muito

1. Desgostei muitíssimo

7- Por favor, avalie a ACIDEZ, CONSISTÊNCIA, SABOR DE CÔCO E SABOR DOCE DE LEITE do produto e indique, utilizando a escala abaixo, o quão próximo do ideal está a consistência de cada amostra.

Amostra	Acidez	Consistência	Sabor de côco	Sabor de doce de leite

- +4 Extremamente mais forte que o ideal

+3 Muito mais forte que o ideal

+2 Moderadamente mais forte que o ideal

+1 Ligeiramente mais forte que o ideal

-0 Ideal
- 1 Ligeiramente menos forte que o ideal

-2 Moderadamente menos forte que o ideal

-3 Muito menos forte que o ideal

-4 Extremamente menos forte que o ideal

8- Avalie a sua intenção de compra

Amostra	Intenção de compra

- 5.Certamente compraria

4 .Provavelmente compraria

3.Tenho dúvida se compraria
- 2.Provavelmente não compraria

1.Certamente não compraria