

**AMANDA DE MORAIS OLIVEIRA**

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA LÁCTEA SABOR  
GRAVIOLA COM POTENCIAL ATIVIDADE  
FUNCIONAL**

RECIFE

2012

**AMANDA DE MORAIS OLIVEIRA**

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA LÁCTEA SABOR  
GRAVIOLA COM POTENCIAL ATIVIDADE  
FUNCIONAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Nutrição.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Tânia L. M. Stamford

**Co-Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Erilane C. L. Machado

RECIFE

2012

Catálogo na fonte  
Bibliotecária Gláucia Cândida da Silva, CRB4-1662

O48d Oliveira, Amanda de Moraes.  
Desenvolvimento de bebida láctea sabor graviola com potencial atividade funcional / Amanda de Moraes Oliveira. – Recife: O autor, 2012.  
97 folhas : il. ; 30 cm.

Orientador: Tânia L. M. Stanford.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2012.  
Inclui bibliografia, apêndices e anexos.

1. Annona Muricata. 2. Antibiose. 3. Probióticos. I. Stanford, Tânia L. M. (Orientador). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2012-189)

**AMANDA DE MORAIS OLIVEIRA**

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA LÁCTEA SABOR GRAVIOLA  
COM POTENCIAL ATIVIDADE FUNCIONAL**

Tese aprovada em 31 de agosto de 2012.

---

Prof. Dr. Eduardo José Nepomuceno Montenegro –UFPE

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Horacina Maria de Medeiros Cavalcante – UFPB

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Roberta Bento de Albuquerque – CAV/UFPE

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Thayza Christina Montenegro Stamford – UFPB

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Tânia Lúcia Montenegro Stamford – DN/UFPE

RECIFE

2012

Aos meus amados pais Júlio e Dadá que, com muitos esforços, abdicaram dos seus próprios sonhos para priorizar a realização dos meus.

A Leonardo Siqueira, cuja convivência me faz acreditar que inseguranças e inquietações são apenas lapsos, tornando tudo mais simples e possível com a tranquilidade da sua voz.

## AGRADECIMENTOS

À *Universidade Federal de Pernambuco* pela oportunidade de participação do Programa de Pós-Graduação em Nutrição.

Aos *Meus Pais*, pelo enorme apoio, incentivo e compreensão.

A meu esposo-amigo, *Leonardo Siqueira*, pelo apoio nas madrugadas de estudo, incentivo, conselhos, carinho, amor.

À minha orientadora, *Dr<sup>a</sup> Tânia Stamford*, pela orientação, paciência, compreensão e credibilidade em mim depositada.

À *Dr<sup>a</sup> Erilane Machado*, pela co-orientação.

A *Thamires Siqueira*, pelo apoio constante nos ensaios laboratoriais.

À amiga *Aldenise Curvelo* e à *Prof<sup>a</sup> Enayde Melo* pelo apoio nas análises de determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante

Ao *Professor Eduardo Montenegro (Duda)* pela realização das análises estatísticas e opiniões de grande relevância.

Aos *Técnicos do Laboratório de Análise e Experimentação de Alimentos – LEAAL* e do *Laboratório do Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão* pelo apoio na execução das análises realizadas neste trabalho.

Aos amigos de turma do doutorado, *Manu, Teresa, Geiza, Karina, Celso*, que durante este período de convivência, mesmo com dificuldades de tempo, souberam auxiliar uns aos outros por meio da troca de ideias e sugestões.

À *Neci e Cecília*, pelos bons préstimos e grande apoio.

Ao *Instituto Agrônomo de Pernambuco*, pelo apoio técnico na coleta das graviolas.

Ao *CNPq pelos recursos financeiros* e à *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE)* pela bolsa de doutorado.

A *Deus* e a *Nossa Senhora* pela presença constante na minha vida, especialmente nesta oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Enfim, a todos amigos, familiares e profissionais que direta ou indiretamente, muito colaboraram para a concretização deste objetivo.

Muito obrigada!

## Resumo

As bebidas lácteas simbióticas possuem micro-organismos probióticos e compostos prebióticos, e estão inseridas na classe dos alimentos funcionais. Estes produtos apresentam representatividade no mercado consumidor devido às características sensoriais agradáveis e também pelos benefícios à saúde. O objetivo desta pesquisa foi observar o potencial da atividade antagonista de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* contra micro-organismos patogênicos em soro lácteo fermentado, bem como avaliar a composição de fibras e componentes com atividade antioxidante em graviolas, visando justificar o desenvolvimento de uma bebida simbiótica utilizando estes alimentos. Os probióticos foram avaliados quanto a atividade antagonista contra micro-organismos patogênicos (*Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*) e quanto a resistência ao ácido clorídrico (pH 4 e pH 2) e a bile (0,3%). Graviolas das variedades Crioula, Lisa e Morada, em estágio de maturação fisiológica (MF) e madura (M), foram comparadas quanto a composição centesimal, fibra alimentar total, solúvel e insolúvel, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. As bebidas simbióticas produzidas com soro lácteo residual da produção de queijo de coalho e polpa de graviola (n=10) foram avaliadas quanto as características sensoriais e vida de prateleira realizada após 0, 7, 14, 21 e 28 dias de produção. Os resultados mostram que *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* apresentam atividade probiótica demonstrada pela resistência à bile e baixa sensibilidade ao ácido clorídrico, tanto em caldo *Man Rogosa Sharp* (MRS) quanto no soro lácteo. Além disso, apresentam alta e intermediária atividade antagônica comprovada frente micro-organismos patogênicos. Quando foi utilizado o soro lácteo como substrato para fermentação, observou-se maior atividade inibitória diante de *E. faecalis*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Ficou evidenciado que as graviolas da variedade Morada apresentam teores de cinzas, superiores às demais, porém a composição em proteína, lipídeo, carboidrato e teor de umidade não diferenciam. A variedade Lisa-MF apresentou menor teor de fibra alimentar total e fibras insolúveis. Todas as variedades mostraram-se semelhantes quanto à composição de fibras solúveis. Os valores de compostos fenólicos totais entre as variedades de graviola não diferem estatística ( $p < 0,05$ ) entre os estádios de maturação, contudo a graviola Lisa madura apresentou maior teor de fenólicos totais, diferindo-se apenas da Crioula-MF. A variedade Crioula apresentou maior capacidade de sequestro do radical DPPH•, diferindo estatisticamente das graviolas da variedade Morada, e por isso possuem maior atividade antioxidante. As análises das bebidas simbióticas mostram que a formulação com 71,5% de soro apresenta boa aceitabilidade sensorial, ressaltando que 25% da polpa de graviola favorece a aceitação quanto ao sabor e aroma. A bebida proposta manteve as características durante a vida de prateleira, principalmente as bactérias probióticas em níveis recomendados pela legislação vigente. Pode ser concluído que a bebida láctea de soro fermentado por micro-organismos probióticos e saborizada com graviola apresenta viabilidade de produção. No processo final há agregação de valor econômico, nutricional e funcional, além de minimização no impacto ambiental.

**Palavras chaves:** *Annona muricata* L, antagonismo microbiano, atividade antioxidante, bebida láctea, soro lácteo, probiótico.

## Abstract

The dairy beverages have symbiotic microorganisms probiotics and prebiotic compounds, and are included in the class of functional foods. These products have representation in the consumer market because of the pleasant sensory characteristics and also for the health benefits. The aim of this study was to observe the potential of antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* against pathogenic microorganisms in whey fermented, as well as for evaluation of the fibers composition and components with antioxidant activity in soursops in order to justify the development of a symbiotic beverage using these foods. The probiotic microorganisms were screened for antagonistic activity against pathogenic microorganisms (*Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*), the resistance to hydrochloric acid (pH 4 and pH 2) and bile (0.3%). Soursops varieties of Crioula, Lisa and Morada of physiological maturity (PM) and mature (M) were compared for proximate composition, total fiber, soluble and insoluble phenolic compounds and antioxidant activity. The symbiotic beverage produced with whey from “coalho” cheese production and soursop pulp (n = 10) were evaluated for sensory characteristics and shelf life performed after 0, 7, 14, 21 and 28 days of production. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* show probiotic activity and demonstrated resistance to bile and low sensitivity to hydrochloric acid, either in *Man Rogosa Sharp* broth (MRS) and the whey. Besides, the microorganisms show high and intermediate antagonistic activity, against pathogenic microorganisms. When we used the whey as substrate for fermentation, was observed a higher inhibitory activity against *E. faecalis*, *L. monocytogenes* and *S. aureus*. It was evidenced that the soursop, of the Morada variety show ash, content higher than the others ones but the protein, fat, carbohydrate and moisture content do not differentiate between soursops. The variety Lisa-PM showed lower levels of total dietary fiber and insoluble fiber. All varieties were similar in the composition of soluble fiber. The values of total phenolic compounds among the varieties of soursop did not differ statistically (p <0.05) between the maturity stages, however, ripe soursop Lisa present higher total phenolic content, differing only to the Crioula-PF. The variety Crioula soursops show greater sequestration capacity DPPH•, differing significantly from the variety soursops Morada, and therefore have higher antioxidant activity. The analysis of the symbiotic display that the formulation with 71.5% serum show good sensory acceptance, and evidenced that 25% of soursop pulp favored the acceptance for flavor and aroma. The proposal drinking kept the characteristics during shelf life, especially the probiotic bacteria at levels recommended by the current legislation. It may be concluded that the milk drinking from whey fermented by probiotic micro-organisms and flavored with soursop presents feasibility of production. In the find process there is aggregation of economic, nutritional and functional value with minimization of the environmental impact.

**Keywords:** *Annona muricata* L, microbial antagonism, antioxidant activity, dairy drink, whey, probiotics.

## Sumário

<b>1. APRESENTAÇÃO</b>	09
<b>2. OBJETIVOS</b>	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos	12
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b>	14
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	30
<b>4.1 MATERIAIS</b>	30
<b>4.2 MÉTODOS</b>	31
<b>4.2.1 FERMENTAÇÃO DO SORO</b>	31
<b>4.2.2 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS</b>	31
4.2.2.1 Atividade antagônica dos probióticos sobre micro-organismos patogênicos <i>in vitro</i>	31
4.2.2.2 Atividade antagônica no soro lácteo fermentado	32
4.2.2.3 Avaliação da capacidade de resistência ao ácido clorídrico e à bile	32
<b>4.2.3 CARACTERIZAÇÃO DAS GRAVIOLAS</b>	33
4.2.3.1 Caracterização físico-química	33
4.2.3.2 Quantificação dos compostos fenólicos	33
4.2.3.3 Determinação da atividade antioxidante	34
<b>4.2.4 PROCESSAMENTO DA BEBIDA FERMENTADA</b>	35
4.2.4.1 Formulação e delineamento experimental para misturas	35
4.2.4.2 Análise sensorial	36
<b>4.2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	40
<b>5. RESULTADOS</b>	42
<b>Artigo Original 1:</b> Fibras alimentares e componentes com atividade antioxidante em graviolas.	44
<b>Artigo Original 2:</b> Avaliação do potencial antimicrobiano de <i>L. acidophilus</i> e <i>B. lactis</i> em soro lácteo fermentado.	58
<b>Artigo Original 3:</b> Características sensoriais e estabilidade de bebida láctea fermentada com sabor graviola	72
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	87
<b>REFERÊNCIAS</b>	89
<b>APÊNDICE</b>	93
<b>ANEXOS</b>	95

# Apresentação

---

## 1. APRESENTAÇÃO

O interesse dos consumidores em maximizar a saúde através da alimentação, tem impulsionado a indústria de alimentos ao desenvolvimento de uma variedade de novos alimentos funcionais. Na América Latina, o Brasil e o México são os mercados com o maior potencial para os alimentos funcionais, pois têm apresentado aumento de consumidores com maior poder de compra. Vale ressaltar que cerca de 65% dos alimentos funcionais brasileiros são probióticos (GRANATO et al., 2010).

Os benefícios do consumo de alimentos probióticos e prebióticos têm sido demonstrados nos estudos envolvendo a ingestão de produtos com algumas cepas microbianas específicas. Dentre estes se podem citar a redução na intolerância à lactose (CRUZ et al., 2010), aumento na atividade do sistema imunológico (DANI et al., 2010), atividade antimicrobiana (HUTT et al. 2006), atividade anticarcinogênica e antimutagênica (GORDILLO et al., 2012), redução no nível de colesterol no sangue (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010), recuperação da infecção gástrica ulcerativa causada pelo *Helicobacter pylori* (YAŞAR et al., 2010), no tratamento da síndrome do intestino irritável (CRUZ et al., 2010).

Probióticos podem ser definidos como micro-organismos vivos (bactérias e/ou leveduras) que podem trazer benefícios à saúde humana ou de animais. Os benefícios geralmente ocorrem através da manutenção e/ou melhoria do equilíbrio microbiano no trato intestinal, estando condicionada a ingestão de micro-organismos em concentração celular suficiente para exercer o efeito esperado (MOHAMMADI et al., 2011). Estas bactérias devem estar presentes no alimento a um nível mínimo de  $10^6$  UFC/g ou a ingestão diária deve ser próxima de  $10^8$  UFC/g, com o objetivo de compensar a possível redução no número de micro-organismos probióticos durante a passagem através do intestino (GRANATO et al., 2010).

Aliada à contagem microbiana mínima necessária para obtenção de resultados positivos, a melhoria do desempenho funcional de probióticos no trato gastrointestinal se dá pela ingestão de carboidratos não digeríveis, oligo e polissacarídeos com ação prebiótica. Os compostos prebióticos estimulam seletivamente o crescimento e/ou atividade de micro-organismos probióticos no colón. A combinação dos probióticos e compostos prebióticos produzem as formulações simbióticas (DHEWA; PANT; MISHRA, 2011), as quais

beneficiam o hospedeiro por melhorar a sobrevivência e implantação dos suplementos microbianos selecionados (PRADO et al., 2008).

Por causa dos benefícios nutricionais associados a ingestão, os alimentos são o principal veículo de probióticos, prebióticos e simbióticos, e por isso devem fazer parte da rotina alimentar dos consumidores, pois assim consegue-se manter o nível terapêutico facilmente. Dentre os alimentos, os produtos lácteos funcionais são considerados via ideal de introdução de probióticos ao trato gastrointestinal humano, merecendo destaque os queijos, iogurtes, sorvetes, sobremesas e bebidas lácteas fermentadas (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

As bebidas lácteas são definidas pela legislação brasileira como o produto lácteo obtido da mistura do leite e soro lácteo adicionado ou não de produtos ou substâncias alimentícias (BRASIL, 2005). Assim, a adição de soro, bactérias probióticas e prebióticos a uma bebida láctea pode resultar em um alimento funcional, servindo como uma nova alternativa para a indústria de laticínios e para os consumidores interessados em uma dieta saudável e nutritiva, aliado a um produto com novas características sensoriais (CASTRO et al., 2009).

Partindo deste princípio, este trabalho teve como objetivo desenvolver uma bebida fermentada a partir do soro lácteo e polpa de graviola com característica simbiótica, avaliando as suas características sensoriais, o potencial probiótico dos micro-organismos utilizados na fermentação, bem como os componentes funcionais na graviola em diferentes estádios de maturação.

# Objetivos

---

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial do soro fermentado e os componentes funcionais na graviola (*Annona muricata* L.) para desenvolvimento de uma bebida láctea.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Estudar as características físico-químicas e componentes funcionais da graviola em diferentes estádios de maturação.
- Avaliar o potencial probiótico de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* em soro lácteo para a formulação da bebida.
- Avaliar as características sensoriais e a estabilidade da bebida láctea simbiótica com sabor graviola.

# Revisão de Literatura

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

Artigo submetido à publicação pela Revista Ciência Rural (0103-8478), que apresenta fator de impacto 0,434, classificada no WebQualis da Capes, no ano base 2012, como B3 na área de Medicina II (Anexo 1).

#### **Bebidas lácteas com soro de queijo e frutas: uma revisão** **Dairy beverage containing cheese whey and fruit: a review**

**Amanda de Moraes Oliveira<sup>I\*</sup>; Eriane de Castro Lima Machado<sup>II</sup>; Tânia Lúcia Montenegro Stamford<sup>III</sup>.**

<sup>(I)</sup> Departamento de Tecnologia Rural, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Rua Ana Camelo da Silva, n. 154, Boa Viagem. CEP: 51111-040. Recife-PE-Brasil. E-mail: [amanda.morais@gmail.com](mailto:amanda.morais@gmail.com).

\*Autor para correspondência.

<sup>(II)</sup> Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco. Rua do Alto do Reservatório s/n, Bela Vista. CEP: 55608-680. Vitória de Santo Antão-PE- Brasil. E-mail: [erilane@ig.com.br](mailto:erilane@ig.com.br)

<sup>(III)</sup> Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco. Rua Jader de Andrade, n. 335, Casa Forte. CEP: 52061-060. Recife-PE-Brasil. E-mail: [tlmstamford@yahoo.com.br](mailto:tlmstamford@yahoo.com.br)

#### **RESUMO**

O soro do leite é um subproduto de relevância da indústria de queijos por ser produzido em grande volume e conter aproximadamente 55% dos nutrientes do leite. O seu aproveitamento industrial em produtos da alimentação humana ainda é considerado baixo, visto que a alta concentração de minerais proporciona uma baixa aceitação sensorial dos alimentos que o contém. Desta forma, têm-se desenvolvido bebidas, principalmente as fermentadas que apresentam novos sabores e aromas, com vistas a recuperar esta importante fonte de nutrientes para a cadeia alimentar humana. Observa-se, portanto, que a utilização do soro de

leite enriquece os produtos que os contém e evita o descarte diretamente no solo, na rede pública de esgoto, rios e lagos, minimizando o impacto negativo sobre a poluição ambiental, conforme abordado nesta revisão.

**Palavras-chave:** aproveitamento de resíduos, bebidas, impacto ambiental, soro lácteo.

## **ABSTRACT**

The whey is a relevant by-product in the cheese industry for being produced in large volume and for containing approximately 55% of its nutrients from milk. Its industry performance upon human nutrition products is still considered low, because the high concentration of minerals provides a low sensorial acceptance of food. Thus, beverages have been developed, mainly the fermented ones that display new flavors and aromas, aiming at recovering such important source of nutrients for the human food chain. It is observed, therefore, that the use of whey enriches the products that contain them and avoid the culling directly in the soil, in the sewage system, rivers, and lakes, minimizing the negative impact on the environmental pollution, as discussed in this review.

**Key words:** sustainable use of residues, beverages, environmental damage, whey.

## **INTRODUÇÃO**

O soro lácteo é a porção aquosa do leite que se separa do coágulo por adição de ácido (soro ácido) ou de enzima (soro doce), durante a fabricação convencional de queijos (TEIXEIRA & FONSECA, 2008). Este subproduto retém cerca de 55 % dos nutrientes do leite, sendo considerado relevante, tendo em vista o volume produzido e sua composição nutricional (LEITE et al., 2012).

Dados do *United States Department of Agriculture* (USDA, 2012) reportam a produção 670.000 toneladas de queijos no Brasil em 2011, com estimativas do país produzir 700.000 toneladas de queijos em 2012. Em média, para fabricação de um quilo de queijo são necessários dez litros de leite, com recuperação de nove litros de soro (BARBOSA et al., 2010). Assim, calcula-se que a geração de soro decorrente dos queijos produzidos no Brasil é relevante, com estimativas de um valor aproximado de 6,03 milhões de toneladas. A produção mundial de soro de leite é cerca de 125 milhões de toneladas (NAIK et al., 2009).

Por este motivo, há uma preocupação recorrente em gerar aplicabilidade ao soro de queijo nas formulações de alimentos, visto que no território brasileiro cerca de 50 % desse soro não é aproveitado, gerando desperdícios nutricional e financeiro (COSTA et al., 2007),

bem como um resíduo industrial com elevado teor orgânico que desencadeia impactos ambientais relevantes (MAGALHÃES et al., 2011).

O conteúdo de lactose e a presença de outros nutrientes faz do soro uma matéria-prima potencial para o desenvolvimento de micro-organismos probióticos, viabilizando a produção de alimentos, como as bebidas lácteas fermentadas (MAGALHÃES et al., 2011), já que o soro *in natura* apresenta baixa aceitação sensorial pela presença de sais minerais (SOARES et al., 2011). Associado ao processo de fermentação, a adição de frutas tem melhorado as características de aromas e sabor das bebidas lácteas, visto que a incorporação de diferentes proporções de suas polpas resulta no aumento da aceitabilidade (OLIVEIRA, 2006; CALDEIRA et al., 2010; MOREIRA et al., 2010; SILVA et al., 2010). Entre os principais interesses no uso de frutas para melhorar a aceitação das bebidas lácteas estão os relacionados com as estratégias de marketing voltadas a estes produtos, cujo objetivo é o oferecimento de novas opções de alimentos saudáveis aos consumidores, visando proporcionar incorporação destes alimentos no hábito alimentar do público-alvo (ROUTRAY & MISHRA, 2011).

É importante ressaltar que o hábito no consumo de frutas do brasileiro vem aumentando influenciado por fatores econômicos e de produção, já que o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, com uma produção de 40 milhões de toneladas ao ano (FACHINELLO et al., 2011).

MURPHY et al., (2012) afirmam que, independente da espécie, de maneira geral o consumo de frutas está frequentemente associado aos relevantes efeitos de seus fitonutrientes à saúde humana, incluindo vitaminas, minerais e fibras. Dentre esses nutrientes, as fibras alimentares são importantes nas formulações das bebidas lácteas fermentadas. As fibras, de modo geral, são resistentes à digestão e absorção no intestino delgado, e são completa ou parcialmente fermentadas no intestino grosso, fornecendo energia para o desenvolvimento de bifidobactérias e lactobacilos, ressaltando que as oligofrutoses merecem ênfase neste grupo (CICHOSKI et al., 2008).

Assim, observa-se que o interesse mercadológico em alcançar o consumidor através da associação do soro lácteo às frutas está embasado nas recomendações nutricionais mais atuais quanto ao aumento no consumo de frutas e hortaliças. Diante do exposto, esta revisão objetiva sumarizar a conjuntura atual e perspectivas para aplicabilidade do excedente de soro de queijo e de frutas pela indústria, contextualizando a aplicação destes alimentos na produção de bebidas lácteas com potencialidades funcionais.

### ***Valor nutricional e impacto ambiental do soro lácteo***

A expressiva produção de leite, e a aceitação do consumidor por um grande número de produtos lácteos, possibilitam o desenvolvimento de diversos tipos de queijo, os quais geram um importante montante de resíduo líquido (85 % a 95 % do volume total de leite), denominado de soro lácteo. Este soro é obtido a partir da coagulação do leite, podendo também ser adquirido a partir da fabricação de caseína ou produtos lácteos similares (DRAGONE et al., 2009; BARBOSA et al., 2010).

De acordo com PESCUMA et al. (2010) o soro é composto de água (93 %), lactose (5 %), proteínas (0,85%), uma quantidade mínima de gordura (0,36 %), e minerais (0,53 %) incluindo NaCl e KCl (mais que 50 %), sais de cálcio (principalmente fosfato) e outros. O soro também contém ácido lático (0,5 g/L) e ácido cítrico, compostos nitrogenados não-protéicos (uréia e ácido úrico) e vitaminas do complexo B (DRAGONE et al., 2009).

HARAGUCHI et al. (2006) afirmam que as proteínas do soro do leite (alfa e beta-lactoglobulina, albumina de soro bovino, imunoglobulinas) apresentam um excelente perfil de aminoácidos essenciais, caracterizando-as como proteínas de alto valor biológico. Além disso, possuem peptídeos bioativos (exorfinas, imunopeptídeos e fosfopeptídeos), que conferem a essas proteínas diferentes propriedades funcionais.

Evidências apontam que os nutrientes presentes no soro lácteo são benéficos à saúde humana, mas também mostram que quando manejados de forma inadequada podem atuar como agentes de poluição ambiental (MAGALHÃES et al., 2011). O excedente desse subproduto é um dos maiores problemas enfrentados pelas indústrias de laticínios, principalmente as de pequeno e médio porte, frente ao custo elevado do tratamento. Por isso, algumas indústrias optam pelo seu descarte diretamente na rede pública, rios e lagos (FLORENTINO et al., 2005).

O poder poluente do soro de queijo é aproximadamente 100 vezes maior que o esgoto doméstico, de forma que quando lançado em cursos d'água, reduz a vida aquática devido a demanda bioquímica de oxigênio (30.000 mg a 50.000 mg de oxigênio/litro de soro), e quando descartado no solo compromete sua estrutura físico-química e diminui o rendimento da colheita (BARBOSA & ARAÚJO, 2007; MOREIRA et al., 2010; LEITE et al., 2012).

O alto percentual de água presente na sua composição torna dispendiosa sua desidratação, e por ser perecível agrava o problema, impossibilitando o armazenamento prolongado. Assim, pesquisas direcionam seu aproveitamento aos produtos onde se possa

utilizá-lo *in natura* (SERPA et al., 2009). Na sua forma líquida, o soro recebe aplicações representativas nas formulações de bebidas lácteas fermentadas.

PEREIRA et al. (2009) investigaram as preocupações ambientais de seis agroindústrias exportadoras de derivados lácteos em Minas Gerais. Em relação ao destino do soro lácteo, quatro das seis empresas vendiam este resíduo para fabricantes de bebidas lácteas. Uma das empresas gerava soro lácteo, mas o enviava à estação de tratamento de efluentes e a outra utilizava todo o leite para obtenção de seu produto, e, portanto não gerava este resíduo. Vale salientar, que de acordo com os autores, as preocupações ambientais das agroindústrias em estudo estavam relacionadas essencialmente aos aspectos legais e econômicos, sendo a variável ambiental apenas o meio para atingir os objetivos empresariais. Estas observações confirmam as considerações de SERPA et al. (2009), de que poucas empresas apresentam efetiva preocupação ambiental quanto ao destino correto do soro de queijo.

Em Mossoró-RN, JERÔNIMO et al. (2012) avaliaram a qualidade ambiental e sanitária de 12 indústrias de laticínios. Os autores observaram que, na maioria das indústrias, os efluentes gerados no processamento dos produtos lácteos eram dispostos na rede de esgoto da cidade sem tratamento, eram destinados aos produtores de suínos da região, ou ainda, depositados em lagoas de captação particular, sem assegurar as normas técnicas de construção com possibilidade de poluir o solo e o subsolo da área de descarte (JERÔNIMO et al., 2012).

SILVA (2011) estudando a modelagem, simulação e análise técnico-financeira de uma unidade de processamento de soro de leite em Viçosa-MG demonstrou que a disposição do soro como um resíduo causa sérios problemas de poluição ambiental, ressaltando que o soro de leite não é tóxico, mas quando lançado em um curso d'água ou no solo provoca um enorme efeito poluidor.

### ***Bebidas lácteas à base de soro e frutas***

A busca incessante por novos produtos levou a indústria de alimentos a perceber que os consumidores modernos estão cada vez mais preocupados com sua saúde e que desejam ingerir alimentos que sejam saudáveis e de preferência capazes de prevenir doenças. Ao longo dos anos, a indústria reconheceu também que o soro lácteo é bastante versátil e contribui na produção de alimentos lácteos fermentados contendo micro-organismos probióticos, e por isso estes produtos estão assumindo grande popularidade frente ao público que procura por alimentos funcionais (BALLUS et al., 2010; BALDISSERA et al., 2011).

Alimentos funcionais são aqueles que garantem efeito nutricional adequado e podem demonstrar benefícios adicionais em uma ou mais funções do organismo, proporcionando melhorias do estado de saúde e bem estar ou redução do risco de doenças (SOARES et al., 2011). Os probióticos representam provavelmente o alimento funcional típico, e são definidos como suplemento microbiano vivo que afetam benéficamente o hospedeiro, melhorando o equilíbrio microbiano intestinal (PEREIRA et al., 2010).

PESCUMA et al. (2008) esclarecem que os benefícios do uso de bactérias lácticas na fermentação do soro estão associados à intensa atividade metabólica sobre carboidratos, lipídeos, proteínas e peptídeos alergênicos que nele estão presentes. Assim, as bactérias promovem contribuição na digestibilidade, preservação, melhoria da textura e perfil sensorial do alimento, visto que há a redução do teor de lactose, produção de ácido lático que contribui para o *flavor* e textura do produto final.

Deste modo, uma das principais alternativas de utilização do soro compreende a formulação de bebidas lácteas, que de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2005), é o produto resultante da mistura do leite e soro de leite ou substância alimentícia, cuja base láctea represente no mínimo 51% do total de ingredientes. A aromatização dessas bebidas é normalmente melhorada com o acréscimo de polpas de frutas, tornando a aceitação sensorial do produto mais representativa. Além disso, o uso de polpa de fruta em bebidas lácteas fermentadas é uma opção interessante para solucionar o problema do excedente de produção e/ou pouco aproveitamento de frutos que não estão adequados ao consumo “de mesa” ou para exportação (SANTOS et al., 2008).

Visando melhorar a aplicabilidade de frutas que apresentam alta perecibilidade e deficiente conservação pós-colheita, diversos estudos têm promovido a inserção destes alimentos na cadeia produtiva de bebidas lácteas fermentadas e não fermentadas. Assim, MATOS (2009) elaborou seis formulações de bebida láctea com o percentual polpa de graviola fixo em 25%, variando o proporção de açúcar (12%; 14% e 16%) e espessante (0,4, 0,8 e 1,2%). O soro foi utilizado em proporções suficientes para totalizar 100% em cada formulação. Os resultados obtidos mostraram que concentrações de açúcar superiores a 12% nas bebidas lácteas diminuí a sua preferência pelos consumidores, e o uso de espessante aumenta a sua preferência. O autor concluiu que a formulação apresenta perspectiva para produção comercial, visto que além de apresentar boa aceitação sensorial, é considerada nutritiva, e apresenta durabilidade de pelo menos 21 dias.

Com o soro de queijo de manteiga e suco de acerola CRUZ et al. (2009) produziram uma bebida usando três formulações: B1 (50% soro + 50% suco), B2 (70% soro + 30% suco), e B3 (30% soro + 70% suco). Os resultados indicaram que a bebida B2 apresentou índices mais significativos em todos os atributos sensoriais, apesar da formulação B1 ter apresentado escores muito próximos, o que sugere a possibilidade de produção e comercialização das bebidas.

SANTOS et al. (2006), desenvolveram uma bebida láctea fermentada com soro do queijo tipo mussarela nas concentrações de 20%, 40%, 60% e 80% acrescida de polpa de umbu como agente saborizante e aromatizante. As características físico-químicas e aceitação sensorial não apresentaram diferença significativa ( $p>0,05$ ) para as formulações com 20%, 40% e 60% de soro, caracterizando a bebida com 60% de soro como a melhor formulação, devido à possibilidade de utilizar o maior volume deste subproduto.

Em estudo posterior, SANTOS et al. (2008) observaram que das bebidas lácteas fermentadas com polpa de manga e diferentes concentrações de soro de queijo mussarela em substituição ao leite (20%, 40%, 60% e 80%), a formulação com substituição de 40% do leite por soro foi a mais aceita (termo hedônico “gostei muito”), com indicação de melhor textura e consistência, homogeneidade e sabor agradável. Este resultado é explicado porque altos níveis de substituição de leite levam à instabilidade e precipitação protéica do soro devido ao elevado tratamento térmico pré-fermentação (90°C/10min), com apresentação de grumos indesejáveis no produto final.

Bebidas lácteas com leite de búfala e diferentes níveis de iogurte e soro do queijo Tipo Frescal foram desenvolvidas por CALDEIRA et al. (2010), adicionado 5% de polpa de morango em cada formulação. Os testes de aceitação e preferência sensorial mostraram que as bebidas T1 (10% leite, 10% soro e 80% iogurte) e T2 (10% leite, 20% soro e 70% iogurte) apresentaram as maiores médias para os atributos sensoriais estudados (impressão global, aparência, consistência e sabor), não diferindo entre si ( $p>0,05$ ), além das melhores condições relativas ao pH, acidez titulável, gordura, proteína, viscosidade e cor. Destaca-se que as formulações com 30% (T3), 40% (T4) e 50% (T5) de soro sofreram alterações de pH, acidez, viscosidade e luminosidade ( $L^*$ ), condições que podem ter influenciado negativamente o estudo de aceitabilidade e preferência destas bebidas.

OLIVEIRA et al. (2006) também utilizaram polpa de morango para desenvolvimento de três formulações de bebida láctea fermentada com soro de queijo (10%, 30% e 50%) e ferro quelado. Os testes físico-químicos mostraram que as bebidas com 10% e 30% de soro se

enquadraram nos parâmetros legais quanto ao conteúdo de gordura, mas na análise sensorial, as formulações com 30% e 50% de soro foram as mais aceitas. Os autores concluíram que a bebida láctea fermentada com 30% de soro foi considerada ideal para a produção por se enquadrar nas determinações legais de composição e por ter sido sensorialmente aceita.

BRANDÃO et al. (2006), utilizou soro de leite para obtenção de uma bebida fermentada e ao final do processo fermentativo foi adicionado de polpa de abacaxi. Os resultados mostraram que do ponto de vista sensorial, a bebida apresentou uma ótima aceitação, pois foi enquadrada no termo hedônico “gosto muito”, além de oferecer também os benefícios relacionados aos alimentos fermentados.

Baseado no conceito de alimento probiótico, SILVA et al. (2010) elaboraram e avaliaram as características sensoriais de bebidas lácteas fermentadas (*S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium*) sabor umbu-cajá com diferentes proporções de soro de leite (A=0%; B=15%; C=30%; D=45%; E=60%). O estudo da preferência entre as bebidas apresentou maiores médias para a formulação A, embora a mesma não tenha diferido significativamente ( $p < 0,05$ ) das amostras B, C e D. Desta forma, as bebidas desenvolvidas podem possibilitar o aproveitamento do soro em até 45% da mistura.

Em pesquisa com o objetivo avaliar o potencial comercial de uma bebida láctea probiótica de soro de leite e polpa de açaí, ZOELLNER et al. (2009) verificaram que a bebida láctea controle (sem polpa de açaí) mostrou redução de um ciclo de log ( $10^6$ - $10^5$  UFC/mL) na contagem de *Bifidobacterium longum* BI-05 e *Lactobacillus acidophilus* La-14, após 21 dias de armazenamento, enquanto que a bebida com polpa de açaí apresentou contagens significativamente mais elevadas ( $10^7$ - $10^8$  UFC/mL) para ambos os micro-organismos estudados ( $p < 0,05$ ). Os resultados da análise sensorial também demonstraram a existência de potencial comercial da bebida probiótica proposta.

Associado aos efeitos benéficos dos micro-organismos probióticos, o desenvolvimento de bebidas lácteas com soja e fruta se baseia na possibilidade de oferecer vantagens nutricionais adicionais ao consumidor. Assim, KRUGER et al. (2008) observaram que a formulação de uma bebida láctea probiótica com cultura mista de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* contendo 30% de extrato hidrossolúvel de soja; 36,6% de leite de vaca; 33,3% de soro de leite e polpa de morango foi considerada ideal sob o ponto de vista sensorial. A partir desta formulação, foi observado que a bebida láctea apresentou células viáveis da cultura mista dentro dos padrões

estabelecidos ( $10^6$ UFC/g) até o 22º dia, mas a qualidade sensorial definiu o término do armazenamento no 25º dia, pelo fato da bebida apresentar acidez bastante elevada.

Outra bebida láctea fermentada probiótica sabor pêssego foi formulada com igual composição (30% de extrato hidrossolúvel de soja; 36,6% de leite de vaca; 33,3% de soro de leite) por KEMPKA et al. (2008). A aceitação sensorial foi semelhante, contudo observou-se que o uso da polpa de pêssego promoveu uma diferenciação na qualidade físico-química, visto que a acidez ficou bastante evidenciada a partir do 14º dia de armazenamento, o que definiu o término da vida de prateleira da bebida.

As diferenciações nas formulações desenvolvidas são relevantes, principalmente do ponto de vista nutricional, pois variações do teor de proteínas podem ser explicadas pelas diferentes quantidades de soro e leite utilizados na elaboração de bebidas lácteas, já que à medida que se aumenta a concentração de soro, menores serão os valores protéicos das bebidas lácteas, visto que o soro apresenta um teor menor de proteína que o leite. O mesmo raciocínio pode ser utilizado para avaliar as oscilações nos teores de gordura, porém, este nutriente pode ser facilmente manipulado na formulação, seja por adição ou pelo desnatamento (GRANDI & ROSSI, 2010).

Diante dos diferentes estudos apresentados, observa-se que o desenvolvimento de produtos utilizando o soro de leite é bastante promissor, pois as bebidas contendo soro de queijo, em destaque as bebidas lácteas fermentadas, são uma realidade no mercado brasileiro porque já representam 25% do mercado total de iogurtes no Brasil (PFLANZER et al., 2010). Vale destacar ainda, que para a indústria a produção de derivados do leite é uma tendência, e esta deve se adequar à realidade de que a população consumidora detém conhecimentos sobre os fatores salutares, e que identificam o importante valor nutricional destes alimentos (OLIVEIRA et al., 2010). Por isso, a indústria deve buscar uma diferenciação de mercado, incluindo o aumento no uso de ingredientes exóticos e inovadores.

## **CONCLUSÃO**

Tecnologicamente, observa-se que o aproveitamento do soro lácteo para desenvolvimento de formulações alimentares voltadas para a alimentação humana pode ser bastante significativo devido à variedade de nutrientes, além de possibilitar um maior controle de poluição ambiental por este resíduo e incrementar a produtividade e lucratividade das indústrias de laticínios no Brasil.

Adicionalmente, é relevante ressaltar que o aproveitamento de frutas para consumo *in natura* e industrial pode ser bastante significativo devido a grande variedade de nutrientes, sendo o seu processamento destinado a obtenção de produtos elaborados, já que a qualidade alimentícia e comercial do fruto *in natura* é influenciada pelas condições de amadurecimento e armazenamento.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelos recursos financeiros e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelas bolsas de doutorado e iniciação científica concedidas.

## REFERÊNCIAS

- BALDISSERA, A.C.; et al. Alimentos funcionais: uma nova fronteira para o desenvolvimento de bebidas protéicas a base de soro de leite. **Semina: ciências agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1497-1512, 2011. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/5094/9041>>. Acesso em: 27 mar 2012.
- BALLUS, C.A.; et al. Aspectos científicos e tecnológicos do emprego de culturas probióticas na elaboração de produtos lácteos fermentados: revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 85-96, 2010. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/alimentos/article/view/17900/11714>>. Acesso em: 27 mar 2012.
- BARBOSA, M.R.; ARAÚJO, E.H. Estudo da Produção da Enzima Lactase utilizando soro de queijo e fungo filamentosos *Aspergillus niger*. **Horizonte Científico**, v. 1, n. 1, p. 1-22, 2007. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/horizontecientifico/article/download/3786/2791>>. Acesso em: 27 mar 2012.
- BARBOSA, A.S. et al. Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: estudo cinético da produção de etanol. **Revista Verde**, v.5, n.1, p. 7-25, 2010. Disponível em: <<http://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/download/240/240>>. Acesso em: 27 mar. 2012.
- BRANDÃO, W.A.P.L.N.T.M. et al. Bebida fermentada probiótica de soro de leite. **Higiene alimentar**, v. 20, n.143, p.56-59, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 de agosto de 2005.

CALDEIRA, L.A. et al. Desenvolvimento de bebida láctea sabor morango utilizando diferentes níveis de iogurte e soro lácteo obtidos com leite de búfala. **Ciência Rural**, v. 40, n. 10, 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782010001000023&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782010001000023&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 27 mar. 2012. doi: 10.1590/S0103-84782010005000176.

CICHOSKI, A.J.; et al Efeito da adição de probióticos sobre as características de queijo prato com reduzido teor de gordura fabricado com fibras e lactato de potássio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 214-219, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v28n1/29.pdf>>. Acesso em: 14 ago 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000100030>.

COSTA, N.M.B. et al. Fortificação do soro de queijo com ferro. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 17, n. 1/2 (Supl 1), p. S51-S54, 2007.

CRUZ, A.G.; SANT'ANA, A.S.; MACCHIONE, M.M.; TEIXEIRA, A.M.; SCHMIDT, F.L. 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. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/4822tp722q3j865j/fulltext.pdf>>. Acesso em 12 mai 2012. doi: 10.1007/s11947-008-0059-9

DRAGONE, G. et al. Characterization of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. **Food Chemistry**, v. 112, p. 929–935, 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608008108>>. Acesso em: 20 jun 2012. doi:10.1016/j.foodchem.2008.07.005

FACHINELLO, J.C.; et al. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n. S1, p. 109-120, 2011. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-29452011000500014&script=sci\\_arttext&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-29452011000500014&script=sci_arttext&tlng=es). Acesso em: 14 ago 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452011000500014>

FLORENTINO, E.R. et al. Caracterização do soro de queijo visando processo de aproveitamento. **Higiene Alimentar**, v. 19, n. 130, p. 30-32, 2005.

GRANDI, A.Z.; ROSSI, D.A. Avaliação dos itens obrigatórios na rotulagem nutricional de produtos lácteos fermentados. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n.1, p. 62-68, 2010.

Disponível em: <<http://ses.sp.homolog.bvs.br/lildbi/docsonline/get.php?id=1753>>. Acesso em: 27 mar 2012.

HARAGUCHI, F.K.. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v.19, n.4, p. 479-488, 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-52732006000400007&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-52732006000400007&script=sci_arttext)>. Acesso em: 14 ago 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732006000400007>.

JERONIMO, C.E.M.; et al. Qualidade ambiental e sanitária das indústrias de laticínios do Município de Mossoró-RN. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 7, n. 7, p. 1349-1356, 2012. Disponível em: <<http://cascavel.ufsm.br/revistas/ojs-2.2.2/index.php/reget/article/view/5751/3599>>. Acesso em: 14 ago 2012.

KEMPKA, A.P. et al. Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego utilizando substratos alternativos e cultura probiótica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Supl. 28, p. 170-177, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v28s0/27.pdf>>. Acesso em: 20 jun 2012. doi: 10.1590/S0101-20612008000500027

KRUGER, R. et al. Desenvolvimento de uma bebida láctea probiótica utilizando como substratos soro de leite e extrato hidrossolúvel de soja. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.1, p. 43-53, 2008. Disponível em: <<http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/view/200/205>>. Acesso em: 20 jun 2012.

LEITE, M.T.; BARROZO; M.A.S.; RIBEIRO, E.J. Canonical analysis technique as an approach to determine optimal conditions for lactic acid production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2012, ID 303874, 9 p., 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijce/2012/303874/>>. Acesso em: 14 ago 2012. doi:10.1155/2012/303874

MAGALHÃES, K.T. et al. Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. **Food Chemistry**, v. 126, p. 249–253, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610014196>>. Acesso em: 27 mar 2012. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.012

MATOS, R.A. **Desenvolvimento e mapa de preferência externo de bebida láctea à base de soro e polpa de graviola (*Annona muricata*)**. 2009. 79f. Dissertação (Mestrado em

Engenharia de processos de Alimentos) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

MOREIRA, R.W.M. et al. Avaliação sensorial e reológica de uma bebida achocolatada elaborada a partir de extrato hidrossolúvel de soja e soro de queijo. **Acta Scientiarum**, v. 32, n. 4, p. 435-438, 2010. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciTechnol/article/viewFile/5739/5739>>. Acesso em: 27 mar 2011. doi: 10.4025/actascitechnol.v32i4.5739

MURPHY, M.M.; et al. Phytonutrient intake by adults in the united states in relation to fruit and vegetable consumption. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 112, n. 2, p. 222–229, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22078816> >. Acesso em: 14 ago 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jada.2011.08.044>

NAIK, Y.K., et al. Studies on physico-chemical and sensory characteristics of whey based watermelon beverage. **Asian Journal of Research in Chemistry**, v. 2, n.1, p. 55-59, 2009. Disponível em: <[http://www.ajrconline.org/AJRC%20V012%20\(1\)%20PDF%20Final/15.pdf](http://www.ajrconline.org/AJRC%20V012%20(1)%20PDF%20Final/15.pdf)>. Acesso em: 14 ago 2012.

OLIVEIRA, G.I.C. et al. Alimentação e suplementação de ferro em uma população de lactentes carentes. **Revista de Pediatria**, v. 28, n. 1, p.18-25, 2006. Disponível em: <<http://www.pediatriasaopaulo.usp.br/upload/pdf/1153.pdf>>. Acesso em: 25 jun 2012.

OLIVEIRA, J.P.F. et al. Aspectos da comercialização de derivados lácteos em supermercados, padarias e lojas de conveniência do setor varejista de Natal/RN. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.3, n.3, p. 197-212, 2010. Disponível em: <<http://www.cesumar.br/pesquisa/periodicos/index.php/rama/article/download/1264/1130>>. Acesso em: 20 mar 2012.

PEREIRA, A.L.F. et al. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996910004680>>. Acesso em: 27 mar 2012. doi:10.1016/j.foodres.2010.11.035

PEREIRA, V.S. et al. A incorporação da variável ambiental nas agroindústrias exportadoras de derivados lácteos de Minas Gerais. **Revista Contemporânea de Economia e Gestão**, v.7, n. 1, p. 103-112, 2009. Disponível em: <<http://www.contextus.ufc.br/index.php/contextus/article/download/156/60>>. Acesso em: 27 jun 2012.

PESCUMA, M. et al. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. 73–81, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160510002217>>. Acesso em: 27 mar 2012. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.011

PESCUMA, M. et al. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. **Food Microbiology**, v. 25, p. 442-451, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002008000233>>. Acesso em: 27 jun 2012. doi: 10.1016/j.fm.2008.01.007.

PFLANZER, S.B. et al. Perfil sensorial e aceitação de bebida láctea achocolatada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 391-398, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v30n2/16.pdf>>. Acesso em: 20 mar 2012. doi: 10.1590/S0101-20612010000200016.

ROUTRAY, W.; MISHRA, H.N. Scientific and Technical Aspects of Yogurt Aroma and Taste: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p 208–220, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2011.00151.x/full>>. Acesso em: 14 ago 2012. doi: 10.1111/j.1541-4337.2011.00151.x

SANTOS, C.T. et al. Elaboração e caracterização de uma bebida láctea fermentada com polpa de umbu (*Spondias tuberosa* sp.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 8, n. 2, p. 111-116, 2006. Disponível em: <<http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa//rev82/Art823.pdf>>. Acesso em: 08 jun 2010.

SANTOS, C.T. et al. Influência da concentração de soro na aceitação sensorial de bebida láctea fermentada com polpa de manga. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n. 1, p.55-60, 2008. Disponível em: <<http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/199/204>>. Acesso em: 09 jun 2012.

SERPA, L. et al. Destino ambientalmente correto a rejeitos de queijaria e análise de viabilidade econômica. In: Internacional workshop - Advances in Cleaner Production, 2., 2009, São Paulo, SP. **Resumos...** São Paulo: IW-ACP, 2009. p. 1-10.

SILVA, E.G. et al. Análise sensorial de bebida láctea fermentada sabor umbu-cajá com diferentes proporções de soro de leite. In: Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE, 10, 2010, Recife, PE. **Resumos...** Recife: UFRPE, 2010. p. 1-3.

SILVA, A.N. **Modelagem, simulação e análise técnico-financeira de uma unidade de processamento de soro de leite para a produção integrada de concentrado protéico,**

**lactose e etanol.** 2011. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa.

SOARES, D.S. et al. Aproveitamento de soro de queijo para produção de iogurte probiótico.

**Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.4, p. 996-1002, 2011.

Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_pdf&pid=S0102-09352011000400027&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0102-09352011000400027&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 16 abr 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352011000400027>

TEIXEIRA, L.V.; FONSECA, L.M. Perfil físico-químico de soro de queijo mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do Estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n.1, p. 243-250, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v60n1/a33v60n1.pdf>>. Acesso em: 16 abr 2012. doi: 10.1590/S0102-09352008000100033.

USDA - United States Department of Agriculture. **Dairy: world markets and trade - July 2012.** Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/dairy.pdf>>. Acesso em: 12 ago 2012.

ZOELLNER, S. S. et al. Whey beverage containing açai pulp as food carrier for probiotic bacteria. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 2, p. 165-169, 2009. Disponível em: <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=22157872>>. Acesso em: 12 ago 2012.

# Materiais e Métodos

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

Foi utilizado soro de queijo de coalho tipo A coletado em recipientes estéreis diretamente do tanque de produção e acondicionados em caixas isotérmicas com gelo.

FOS-Raftilose 95® da Orafti, leite em pó desnatado e sacarose (açúcar refinado granulado comercial). As linhagens utilizadas foram obtidas a partir de cultura mista liofilizada e embaladas em envelopes lacrados composta pela *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* LA-5® e *Bifidobacterium lactis* Bb-12® (Bio RICH® - Hansen).

Graviolas (*Annona muricata* L.) *in natura* das variedades *Morada*, *Lisa* e *Crioula* provenientes do Instituto Agrônomo de Pernambuco foram obtidas em diferentes estádios de maturação (Fruto em Maturação fisiológica; Fruto Maduro). A coleta se deu com auxílio do disco de coleta proposto por Livera (1992) apresentado na figura 1 e observando-se as seguintes características físicas:

- *Fruto em Maturação fisiológica ou Maduro*: apresentando textura firme, casca verde claro, pouco brilhante e espinhos distanciados.
- *Fruto Maduro*: apresentando textura branda, casca verde claro brilhante, ligeiramente amarelado e espinhos mais distantes, quebradiços e pouco proeminentes.



**Figura 1:** Disco de coleta para identificação do estágio de desenvolvimento fisiológico da graviola (LIVERA, 1992).

As graviolas foram lavadas em água corrente, sanitizadas em solução clorada a 100ppm por 10 minutos e em seguida despolidos, porcionados em embalagens de 200g e congelados em freezer (-20°C).

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 FERMENTAÇÃO DO SORO

A preparação do pré-inóculo se deu a partir da cultura mista (*S. thermophilus*, *L. acidophilus* LA-5<sup>®</sup> e *B. lactis* Bb-12) liofilizada. As bactérias foram reativadas mediante três repiques sucessivos em leite em pó desnatado reconstituído a 10%, incubadas a 42°C/6 horas. Ao fim do período, o pré-inóculo foi mantido em temperatura de refrigeração (4±1°C).

Para a fermentação utilizaram-se sistemas a base de soro de queijo de coalho tipo A pasteurizado a 65°C por 30 minutos, inoculados com 10% do pré-inóculo, com e sem frutooligossacarídeo (FOS-Raftilose 95<sup>®</sup>) cujo teor foi fixado em 5%, conforme Silva et al. (2011). A fermentação do soro foi conduzida a 42°C±1°C até atingir aproximadamente 0,6g de ácido láctico/100g (BRASIL, 2000).

### 4.2.2 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS

#### 4.2.2.1 Atividade antagônica dos probióticos sobre micro-organismos patogênicos *in vitro*

Foi verificada utilizando cepas dos micro-organismos probióticos repicadas em tubos contendo Caldo *Man Rogosa Sharp* (MRS) a 37°C, por 24 horas. Os micro-organismos patogênicos utilizados foram *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Enterococcus faecalis* (ATCC 6057), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Salmonella typhimurium* (ATCC 1428), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), os quais foram mantidos separadamente em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), à temperatura de 37°C por 24 horas.

Para avaliar a ação antagônica de *L. acidophilus* LA-5 e *B. lactis* Bb-12, foi realizado o teste de inibição com o método de dupla camada utilizando-se um inóculo contendo 9LogUFC/mL de cada amostra destas bactérias. Estes foram inoculados em seis pontos equidistantes na superfície de uma placa de ágar MRS e incubados por 72 horas, a 37°C. Após a incubação, às placas foram acrescentadas 10mL de clorofórmio, por 20 minutos, sendo, em

seguida, abertas para permitir a evaporação total do clorofórmio, quando então foi adicionada uma outra camada de 3,5mL de Ágar BHI (0,75% de ágar), previamente inoculado com 0,1mL da cultura patogênica (7LogUFC/mL). As placas foram incubadas a 37°C, por 24-48 horas e avaliadas quanto à presença de halos de inibição de crescimento (MAIA et al., 2001). O efeito inibitório de *L. acidophilus* e *B. lactis* foi avaliado de acordo HÜTT et al. (2006) como alto (>25mm), intermediário (13-25 mm) e baixo (0-12 mm).

#### 4.2.2.2 Atividade antagônica no soro lácteo fermentado

Para cada micro-organismo patogênico avaliado foi produzido soro de queijo de coalho fermentado, contendo 9LogUFC/mL de bactérias probióticas, determinado a partir da turbidez pela escala de MacFarland.

A inoculação das bactérias patogênicas nos soros fermentados partiu de uma suspensão com aproximadamente 7LogUFC/mL de cada agente patogênico (utilizando a escala de Mac Farland). Foram utilizados 2,5mL desta suspensão para inocular 100mL de soro fermentado. Os sistemas foram avaliados mantendo-se armazenados sob refrigeração (4°C) nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias. As bactérias patogênicas foram inoculadas em triplicata, utilizando os meios de cultura seletivos (AOAC, 2002). As contagens foram expressas em LogUFC/mL (CALDERÓN et al., 2007).

#### 4.2.2.3 Avaliação da capacidade de resistência ao ácido clorídrico e à bile

Para verificação da capacidade de resistência ao ácido clorídrico, utilizou-se três repiques sucessivos em caldo MRS em pH 6,1±0,1 sendo que a cada repique as cepas de *L. acidophilus* e *B. lactis* permaneceram em estufa bacteriológica (37°C/24horas). Em seguida, os micro-organismos ativos foram transferido para tubos contendo caldo MRS acidificado com HCl 1N variando o pH em 4,0 e 2,0. Os tubos, em triplicata, permaneceram em estufa (37°C) avaliando-se a viabilidade celular nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 horas (RÖNKÄ et al., 2003).

A observação da resistência à bile foi realizada a partir de alíquotas do meio contendo micro-organismos ativos para tubos com um meio contendo 0,3% de bile bovina e sem a presença de bile bovina (controle). Os tubos permaneceram em estufa (37°C) por 4 horas, avaliando-se, em triplicata, a viabilidade celular no tempo zero e a cada hora após a inoculação (RÖNKÄ et al., 2003).

Em paralelo foi realizado o estudo na matriz alimentar utilizando o soro de queijo de coalho fermentado, o qual foi conduzido nas mesmas condições aplicadas ao caldo MRS.

A viabilidade celular foi determinada após a exposição dos micro-organismos aos testes de resistência ao ácido e à ação da bile, utilizando-se a técnica de semeadura em profundidade, em meio ágar MRS. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, as colônias contadas e os resultados expressos em logUFC/mL (FUCHS et al., 2006).

### **4.2.3 CARACTERIZAÇÃO DAS GRAVIOLAS**

#### **4.2.3.1 Caracterização físico-química**

Análises para determinação da composição centesimal também foram realizadas quanto a umidade (estufa a 105°C), cinzas (mufla a 550°C), lipídeos (Bligh Dayer), proteínas (Kjeldhal), fibra alimentar total, solúvel e insolúvel pelo método gravimétrico enzimático e carboidratos totais por diferença (IAL, 2005).

#### **4.2.3.2 Quantificação dos compostos fenólicos**

Extratos hidroacetônico e hidrometanólico foram obtidos por processo de extração sequencial, utilizando acetona a 80% e metanol a 80%. Neste sistema, 20g de polpa dos frutos foram mantidas, sob agitação permanente, à temperatura ambiente (24°C ± 2°C), por 20 minutos, com o primeiro solvente extrator (acetona a 80%), e em seguida, centrifugada a 4000rpm. O sobrenadante foi coletado, o precipitado ressuspense no mesmo solvente, e submetido ao mesmo processo acima descrito, por mais dois períodos de 20 minutos, totalizando 60 minutos de extração. Ao término deste período de extração, sobrenadantes foram combinados, concentrados sob pressão reduzida a 40° C, e o volume final aferido para 50 mL. O precipitado foi reutilizado para a extração com o segundo solvente extrator (metanol a 80%), nas condições acima descritas. Os extratos obtidos foram acondicionados em recipientes tampados e mantidos sob congelamento (-18°C) até o momento das análises.

A determinação do teor de fenólicos dos extratos foi efetuada por método espectrofotométrico, utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (Merk), segundo metodologia descrita por Wettasinghe e Shahidi (1999). O teor de fenólicos totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com ácido gálico (20 a 240 µg/mL), e os resultados expressos em mg em equivalente de ácido gálico por 100g de polpa de graviola.

#### 4.2.3.3 Determinação da atividade antioxidante

Os extratos hidroacetônico e hidrometanólico combinados foram submetidos à determinação da capacidade de sequestrar o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•), utilizando o método descrito por Brand-Williams et al. (1995), modificado por Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998). Extratos combinados, com diferentes concentrações de fenólicos totais, foram adicionados à solução de DPPH• em metanol (0,1M), atingindo a concentração final de 7, 13 e 21g de polpa/L. A absorbância a 515 nm foi monitorada, em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650PC) até a reação atingir o platô. A concentração do DPPH• remanescente no meio da reação foi calculada a partir da curva padrão do radical DPPH•, e o percentual de DPPH• remanescente (DPPH<sub>rem</sub>%) de cada concentração do extrato foi calculado utilizando a seguinte expressão:

$$\% \text{ DPPH}_{\text{REM}} = \frac{\text{DPPH}_t}{\text{DPPH}_{T=0} \times 100}$$

Onde: DPPH<sub>t</sub> é concentração do radical DPPH no tempo em que a reação atingiu o platô;

DPPH<sub>T=0</sub> é concentração inicial do DPPH (tempo zero da reação)

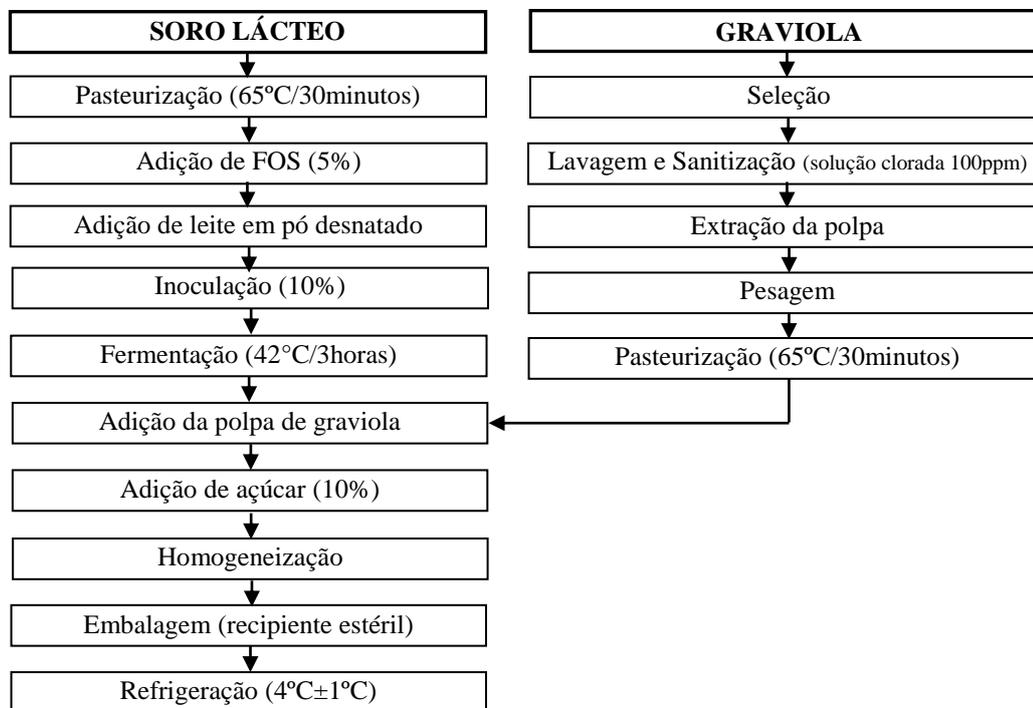
Em seguida, a concentração do extrato eficiente para diminuir em 50% a concentração inicial do DPPH• (EC<sub>50</sub>) foi calculada a partir do gráfico da concentração da amostra (g de fruto. g DPPH<sup>-1</sup>) versus DPPH<sub>REM</sub>%, cujo resultado foi expresso em g de fruto por g de DPPH•. O comportamento cinético dos extratos foi classificado em decorrência do tempo necessário para atingir o estado estacionário do valor de EC<sub>50</sub> (TEC<sub>50</sub>), definindo-se como rápido (T<sub>EC50</sub> < 5 minutos), intermediário (T<sub>EC50</sub> = 5 a 30 minutos) ou lento (T<sub>EC50</sub> > 30 minutos), segundo Sánchez-Moreno, Larrauri; Saura-Calixto (1998).

A eficiência anti-radical (EA) foi calculada considerando o valor de EC<sub>50</sub> e o tempo em que foi atingido o EC<sub>50</sub> (T<sub>EC50</sub>), sendo classificada como baixa (EA < 1), média (EA >1 e ≤ 5 ), alta (EA >5 e ≤ 10) ou super alta (EA >10) de acordo com o valor obtido na expressão abaixo (SÁNCHEZ-MORENO, LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998):

$$EA = \frac{1}{EC_{50} \times T_{EC50}}$$

#### 4.2.4 PROCESSAMENTO DA BEBIDA FERMENTADA

A bebida foi produzida segundo as etapas descritas no o fluxograma de processamento (Figura 2).



**Figura 2:** Fluxograma de processamento de bebida láctea fermentada com polpa de graviola e frutooligossacarídeo.

O teor de frutooligossacarídeo foi fixado em 5%, conforme Silva et al. (2011). A fermentação do soro foi conduzida até atingir teor de acidez entre 0,6g e 1,5g de ácido láctico/100g (BRASIL, 2000).

##### 4.2.4.1 Formulação e delineamento experimental para misturas

As proporções das misturas foram definidas empregando-se um delineamento simplex aumentado de misturas, definidas em 10 tratamentos (Tabela 1). Considerando que a soma das variáveis de uma mistura deve ser igual a 100%, as restrições foram quanto ao mínimo de 66,5% de soro de queijo de coalho; 3,5% de leite em pó desnatado e 20% de polpa de graviola.

**Tabela 1:** Condições experimentais do planejamento de misturas na formulação das bebidas lácteas fermentadas com polpa de graviola e frutooligossacarídeo (g/100g).

<b>Ensaio</b>	<b>Leite em pó desnatado (g/100g)</b>	<b>Soro de queijo de coalho (g/100g)</b>	<b>Polpa de graviola (g/100g)</b>
01	13,5	66,5	20,0
02	3,5	76,5	20,0
03	3,5	66,5	30,0
04	8,5	71,5	20,0
05	8,5	66,5	25,0
06	3,5	71,5	25,0
07	6,8	69,8	23,3
08	10,2	68,2	21,7
09	5,2	73,2	21,7
10	5,2	68,2	26,7

Ao final da formulação das misturas, as bebidas foram homogeneizadas e adicionadas de açúcar (15%). As bebidas foram envazadas em recipientes previamente esterilizados e estocada em temperatura de refrigeração ( $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) para avaliação das características de qualidade por análises sensoriais, microbiológicas e físico-químicas.

#### 4.2.4.2 Análise sensorial

Os testes foram realizados 24 horas após a elaboração das bebidas. As amostras foram codificadas utilizando sequência de 3 número aleatórios. As bebidas foram servidas em temperatura de refrigeração ( $4^{\circ}\text{C}$  a  $8^{\circ}\text{C}$ ) em copos descartáveis de 50mL sendo oferecida água e bolacha de água no intervalo das amostras. Todos os testes sensoriais foram realizados em cabines individuais com controle de iluminação e de temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), respeitando-se o intervalo de duas horas antes ou depois das refeições. Antes de cada teste, os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A) conforme o previsto no projeto de pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE nº 405/2010), seguindo a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (Anexo 2).

Primeiramente, realizou-se um teste de aceitação, com 75 provadores não-treinados de ambos os sexos e idade entre 16 e 35 anos. As dez formulações foram avaliadas monadicamente em dois blocos através do uso da escala hedônica de 09 pontos cujos limites

seguiram a classificação: 01 para “desgostei extremamente” e 09 para “gostei extremamente” (Figura 3).

BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA COM POLPA DE GRAVIOLA E FRUTOOLIGOSSACARÍDEO		
Nome: _____		Data: _____
<b>Instruções:</b> Você receberá uma amostra codificada de bebida láctea fermentada sabor graviola. Por favor, avalie as amostras e indique o quanto gostou ou desgostou do AROMA, SABOR, CONSISTÊNCIA e APARÊNCIA. Antes de cada avaliação, você deverá fazer uso da água e da bolacha.		
	<b>VALOR DA ESCALA</b>	<b>ESCALA HEDÔNICA</b>
AROMA	_____	<b>9</b> Gostei extremamente
SABOR	_____	<b>8</b> Gostei muito
TEXTURA	_____	<b>7</b> Gostei moderadamente
APARÊNCIA	_____	<b>6</b> Gostei ligeiramente
		<b>5</b> Nem Gostei, nem desgostei
		<b>4</b> Desgostei ligeiramente
		<b>3</b> Desgostei moderadamente
		<b>2</b> Desgostei muito
		<b>1</b> Desgostei extremamente
Comentários:		
_____		
_____		

**Figura 3:** Ficha de avaliação das bebidas lácteas fermentadas com polpa de graviola e frutooligossacarídeo.

A avaliação do perfil sensorial das formulações baseou-se na Análise Descritiva Quantitativa (STONE; SIDEL, 2004), utilizando cinco formulações com as melhores médias obtidas no teste anterior. Para seleção de provadores foram recrutados 15 voluntários. Após avaliação do poder discriminativo de cada voluntário, através da aplicação do teste de sensibilidade aos gostos básicos (*Threshold*) foram selecionados 9 provadores que acertaram no mínimo 50% da avaliação (MORALES, 1994).

A partir da seleção de provadores, foi realizada a definição da terminologia descritiva a partir da apresentação das amostras aos provadores, os quais descreveram as similaridades e diferenças observadas quanto ao aroma, sabor, consistência e aparência. Partindo da lista de termos, os provadores discutiram o significado de cada termo, elaborando-se a ficha de avaliação sensorial contendo a definição de cada termo descritivo (Tabela 2).

**Tabela 2:** Definições dos termos descritivos para as amostras das bebidas lácteas fermentadas com polpa de graviola e frutooligossacarídeo

DESCRITORES	SIGLAS	DESCRIÇÃO
<b>AROMA</b>		
Frutal de Graviola	AFG	Característico de graviola madura in natura
Lácteo	AL	Sensação olfativa relacionada ao leite in natura
Bebida láctea fermentada	ABLF	Associado ao aroma da coalhada
<b>SABOR</b>		
Frutal de Graviola	SFG	Sensação gustativa característico de graviola madura in natura
Lácteo	SL	Sensação percebida ao degustar leite e/ou derivados lácteos.
Soro Lácteo	SSL	Sabor levemente salgado associado ao leite
Ácido	S A	Associado ao ácido láctico obtido da fermentação e do ácido presente na polpa da fruta
Bebida láctea fermentada	SBLF	Característico de bebida láctea fermentada sem adição de aromatizantes e/ou polpas de frutas
<b>CONSISTÊNCIA</b>		
Homogeneidade	CH	Ausência de partículas sólidas detectáveis
Viscosidade	CV	Resistência ao escoamento do produto entre a língua e o palato
<b>APARÊNCIA</b>		
Cor	AC	Cor semelhante ao iogurte integral
Geral	AGE	Conjunto dos atributos que conferem a aceitação de uma bebida láctea fermentada com polpa de graviola

A avaliação foi realizada apresentando as amostras monadicamente (STONE; SIDEL, 2004), para avaliar os descritores relacionados à aparência, textura, aroma e sabor utilizando a escala hedônica de 09 pontos, conforme figura 4.

A análise de intenção de compra foi realizada utilizando-se uma escala de cinco pontos, onde a representação 01 correspondia a “certamente não compraria” e a 5 “certamente compraria” (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999).

Para o cálculo do Índice de Aceitabilidade do produto foi adotada a expressão (STONE; SIDEL, 2004):

$$IA (\%) = \frac{A \times 100}{B}$$

onde A = nota média obtida para o produto, e B = nota máxima dada ao produto.

<b>ANÁLISE DESCRITIVA QUANTITATIVA</b>																																																							
<b>BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA COM POLPA DE GRAVIOLA E FRUTOOLIGOSSACARÍDEO</b>																																																							
Nome: _____ Data: _____																																																							
<b>Instruções:</b> Você receberá uma amostra codificada de bebida láctea fermentada sabor graviola. Por favor, avalie as amostras e indique o quanto gostou dos atributos baseando-se nos valores da escala hedônica. Antes de cada avaliação, você deverá fazer uso da água e da bolacha.																																																							
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th colspan="2" style="text-align: center;"><b>ESCALA HEDÔNICA</b></th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td style="text-align: center;"><b>9</b></td><td>Gostei extremamente</td></tr> <tr><td style="text-align: center;"><b>8</b></td><td>Gostei muito</td></tr> <tr><td style="text-align: center;"><b>7</b></td><td>Gostei moderadamente</td></tr> <tr><td style="text-align: center;"><b>6</b></td><td>Gostei ligeiramente</td></tr> <tr><td style="text-align: center;"><b>5</b></td><td>Nem Gostei, nem desgostei</td></tr> <tr><td style="text-align: center;"><b>4</b></td><td>Desgostei ligeiramente</td></tr> <tr><td style="text-align: center;"><b>3</b></td><td>Desgostei moderadamente</td></tr> <tr><td style="text-align: center;"><b>2</b></td><td>Desgostei muito</td></tr> <tr><td style="text-align: center;"><b>1</b></td><td>Desgostei extremamente</td></tr> </tbody> </table>	<b>ESCALA HEDÔNICA</b>		<b>9</b>	Gostei extremamente	<b>8</b>	Gostei muito	<b>7</b>	Gostei moderadamente	<b>6</b>	Gostei ligeiramente	<b>5</b>	Nem Gostei, nem desgostei	<b>4</b>	Desgostei ligeiramente	<b>3</b>	Desgostei moderadamente	<b>2</b>	Desgostei muito	<b>1</b>	Desgostei extremamente	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">ATRIBUTOS</th> <th style="text-align: center;">VALOR DA ESCALA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;"><b>AROMA</b></td> </tr> <tr><td>Frutal de Graviola</td><td></td></tr> <tr><td>Lácteo</td><td></td></tr> <tr><td>Bebida láctea fermentada</td><td></td></tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;"><b>SABOR</b></td> </tr> <tr><td>Frutal de Graviola</td><td></td></tr> <tr><td>Lácteo</td><td></td></tr> <tr><td>Soro Lácteo</td><td></td></tr> <tr><td>Ácido</td><td></td></tr> <tr><td>Bebida láctea fermentada</td><td></td></tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;"><b>CONSISTÊNCIA</b></td> </tr> <tr><td>Homogeneidade</td><td></td></tr> <tr><td>Viscosidade</td><td></td></tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;"><b>APARÊNCIA</b></td> </tr> <tr><td>Cor</td><td></td></tr> <tr><td>Geral</td><td></td></tr> </tbody> </table>	ATRIBUTOS	VALOR DA ESCALA	<b>AROMA</b>		Frutal de Graviola		Lácteo		Bebida láctea fermentada		<b>SABOR</b>		Frutal de Graviola		Lácteo		Soro Lácteo		Ácido		Bebida láctea fermentada		<b>CONSISTÊNCIA</b>		Homogeneidade		Viscosidade		<b>APARÊNCIA</b>		Cor		Geral	
<b>ESCALA HEDÔNICA</b>																																																							
<b>9</b>	Gostei extremamente																																																						
<b>8</b>	Gostei muito																																																						
<b>7</b>	Gostei moderadamente																																																						
<b>6</b>	Gostei ligeiramente																																																						
<b>5</b>	Nem Gostei, nem desgostei																																																						
<b>4</b>	Desgostei ligeiramente																																																						
<b>3</b>	Desgostei moderadamente																																																						
<b>2</b>	Desgostei muito																																																						
<b>1</b>	Desgostei extremamente																																																						
ATRIBUTOS	VALOR DA ESCALA																																																						
<b>AROMA</b>																																																							
Frutal de Graviola																																																							
Lácteo																																																							
Bebida láctea fermentada																																																							
<b>SABOR</b>																																																							
Frutal de Graviola																																																							
Lácteo																																																							
Soro Lácteo																																																							
Ácido																																																							
Bebida láctea fermentada																																																							
<b>CONSISTÊNCIA</b>																																																							
Homogeneidade																																																							
Viscosidade																																																							
<b>APARÊNCIA</b>																																																							
Cor																																																							
Geral																																																							
Comentários: _____ _____																																																							

**Figura 4:** Ficha de avaliação de aceitação sensorial das bebidas lácteas fermentadas com polpa de graviola e frutooligossacarídeo

A avaliação da vida de prateleira no produto elaborado foi realizada após 0, 7, 14, 21 e 28 dias de produzido, quanto ao pH, acidez total titulável, análises de qualidade microbiológica (coliformes totais, coliformes termotolerantes, bolores e leveduras, estafilococos coagulase positiva) e de viabilidade celular dos micro-organismos probióticos (contagem de bactérias lácticas totais), seguindo as preconizações metodológicas da *Association Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002).

#### 4.2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados desta pesquisa foram tratados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA) de um critério, utilizando o software Bioestat® 1.0.

Para os dados do potencial antimicrobiano e resistência ao ácido clorídrico e à bile dos probióticos apresentados em média aritmética  $\pm$  desvio padrão foi utilizado o teste *post hoc* de Student-Newman-Keuls, adotando-se nível de significância de 5% de probabilidade.

Os dados de composição das graviolas em decorrência dos estádios de maturação, bem como para avaliação dos atributos sensoriais e estabilidade das bebidas foram tratados estatisticamente com o teste de Kruskal-Wallis, adotando-se nível de significância de 5% de probabilidade.

# Resultados

---

## 5. RESULTADOS

A partir do presente estudo, três artigos originais foram elaborados. Destes, um foi submetido a revista nacional e dois serão submetidos a revistas internacionais.

### Artigo Original 1

**Fibras alimentares e componentes com atividade antioxidante em graviolas** está sendo traduzido e editorado para submissão ao periódico Journal of Dairy Science (INSS 0022-0302), que apresenta fator de impacto 2,564, classificada no WebQualis da Capes, no ano base 2012, como B1 na área de Medicina II.

### Artigo Original 2

**Avaliação do potencial antimicrobiano de *L. acidophilus* e *B. lactis* em soro lácteo fermentado** está sendo traduzido e editorado para submissão ao periódico International Journal of Food Microbiology (INSS 0168-1605), que apresenta fator de impacto 3,327, classificada no WebQualis da Capes, no ano base 2012, como A2 na área de Medicina II.

### Artigo Original 3

**Características sensoriais e estabilidade de bebida láctea simbiótica com sabor graviola** submetido à publicação pelo Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (INSS 0102-0935), que apresenta fator de impacto 0,291, classificada no WebQualis da Capes, no ano base 2012, como B3 na área de Medicina II (Anexo 3).

---

**Artigo Original 1**

**Fibras alimentares e componentes com atividade antioxidante em graviolas.**

---

## **Fibras alimentares e componentes com atividade antioxidante em graviolas.**

### **Dietary fiber and components with antioxidant activity in soursop.**

Amanda de Moraes OLIVEIRA<sup>1</sup>; Thamires de Siqueira CAMPOS<sup>2</sup>; Erilane de Castro Lima MACHADO<sup>2</sup>; Aldenise Chagas Curvêlo Gonçalves MOREIRA<sup>3</sup>, Enayde de Almeida MELO<sup>4</sup>, Tânia Lúcia Montenegro STAMFORD<sup>5</sup>

\*Endereço para correspondência: Rua Ana Camelo da Silva, n. 154, Boa Viagem. CEP: 51111-040. Recife-PE-Brasil. E-mail: [amanda.morais@gmail.com](mailto:amanda.morais@gmail.com).

1-Universidade Federal Rural de Pernambuco/DTR. Recife-PE. Brasil.

2-Universidade Federal de Pernambuco/CAV. Vitória de Santo Antão-PE. Brasil.

3-Universidade Federal Rural de Pernambuco/PGCTA. Recife-PE. Brasil.

4-Universidade Federal Rural de Pernambuco/DCD. Recife-PE. Brasil.

5-Universidade Federal de Pernambuco/CCS-DN. Recife-PE. Brasil.

### **RESUMO**

Alimentação saudável e equilibrada está associada ao consumo de frutas, visto que frequentemente apresentam elementos com efeitos benéficos à saúde humana. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a composição de fibras e componentes com atividade antioxidante em graviolas das variedades Crioula, Lisa e Morada em estágio de maturação fisiológica (MF) e madura (M). Foram realizadas análises para determinação da composição centesimal, fibra alimentar total, solúvel e insolúvel pelo método gravimétrico enzimático. A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu. A atividade antioxidante foi determinada pelo método do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•). Os resultados da composição centesimal mostram que as graviolas da variedade Morada apresentam teores de cinzas, superiores às demais, porém a composição em proteína, lipídeo, carboidrato e teor de umidade não diferenciam as graviolas. A variedade Lisa-MF apresentou menor teor de fibra alimentar total e fibras insolúveis. Todas as variedades mostraram-se semelhantes quanto à composição de fibras solúveis. Os valores de compostos fenólicos totais mostram que entre as variedades de graviola não há diferenciação estatística ( $p < 0,05$ ) entre os estádios de maturação, contudo a graviola Lisa madura apresentou maior teor de fenólicos

totais, diferindo-se apenas da Crioula em MF. As graviolas da variedade Crioula apresentaram menores valores de EC<sub>50</sub>, diferindo estatisticamente das graviolas da variedade Morada, e por isso possuem maior a atividade antioxidante. Os resultados desta pesquisa apontam que o consumo de graviola é útil para aumentar as concentrações de substâncias biologicamente ativas no organismo humano, bem como melhorar o aporte diário de fibra alimentar.

**Palavras chaves:** *Annona muricata* L., fibras alimentares, compostos fenólicos, fruta tropical.

## **ABSTRACT**

Healthy and balanced diet is associated with the consumption of fruits, since they often have elements with beneficial effects to human health. The aim of this study was to evaluate the composition of fibers and components with antioxidant activity in soursops varieties Crioula, Lisa and Morada of physiological maturity (PM) and mature (M). Analyses were conducted to determine the proximate composition, total fiber, soluble and insoluble enzymatic gravimetric method. The quantification of total phenolic compounds was performed by Folin-Ciocalteu. The antioxidant activity was determined by the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•). The results show that the composition of the variety soursops Morada feature of ash, higher than the others, but the composition of protein, fat, carbohydrate and moisture content do not differentiate between soursops. The variety Lisa-PM showed lower levels of total dietary fiber and insoluble fiber. All varieties were similar in the composition of soluble fiber. The values of total phenolic compounds show that among the varieties of soursop no statistical difference ( $p < 0.05$ ) between the maturity stages, yet ripe soursop Lisa had higher total phenolic content, differing only in the Crioula PM. The variety of Crioula soursops had lower EC<sub>50</sub> values, differing significantly from the variety soursops Morada, and therefore have higher antioxidant activity. The results of this study indicate that consumption of soursop is useful in increasing concentrations of biologically active substances in the human body as well as improve the daily intake of dietary fiber.

**Key words:** *Annona muricata* L., dietary fiber, phenolics, tropical fruit.

## **INTRODUÇÃO**

A graviola (*Annona muricata* L.) é considerada uma boa fonte natural de antioxidantes, sendo todas as suas partes utilizadas na medicina popular tradicional (BASKAR et al., 2007). Também tem sido observada a ação antioxidante dos extratos foliares (NUNES et al., 2012) e investigados os efeitos mutagênicos e antimutagênicos inclusive em

frutos congelados, sugerindo os dados que o congelamento das frutas contribui para a prevenção contra danos biológicos (SPADA et al., 2008). O fruto contém carboidratos, proteínas, ácido fólico, cálcio, fósforo, ferro, vitamina C, grandes quantidades de vitaminas B1 e B2 e fibras (DEMBITSKY et al., 2011).

Nos últimos anos tem-se atribuído aos alimentos, além das funções de nutrição e a sua aceitação sensorial, a atribuição de alguns componentes que exercem respostas fisiológicas específicas, sendo chamados de alimentos funcionais (ZERAİK et al., 2010). A inclusão de frutas e seus produtos na dieta é uma recomendação nutricional relacionada à saúde tendo em vista que estes alimentos fornecem quantidades apreciáveis de vitaminas, minerais e fibras. De acordo com Nicklas et al. (2011), a fibra dietética oferece importantes benefícios à saúde para adultos, incluindo a redução do risco de doença cardíaca coronária, diabetes tipo 2, síndrome metabólica e manutenção de um peso corporal saudável. Pode-se afirmar, portanto, que uma dieta rica em vegetais encontra-se associada a uma maior expectativa de vida (MELO et al., 2008).

Evidências apontam que o efeito protetor de alguns alimentos está associado à sua composição em substâncias antioxidantes, como a vitamina C, vitamina E, carotenóides e os compostos fenólicos, os quais constituem os antioxidantes mais abundantes na maioria dos vegetais (ZERAİK et al., 2010; ROCHA et al., 2011). Os antioxidantes alimentares mostram capacidade de modular mecanismos complexos envolvidos na manutenção de uma fisiologia saudável, com redução do início precoce de doenças relacionadas com degradação pelo estresse oxidativo. Estes alimentos incluem cogumelos, manga, tomate, limão, laranja, laranja kinkan (kumquat), chá, alho, goiaba, mamão, açaí e graviola (ARUOMA et al., 2012).

A polpa da graviola (*Annona muricata* L.) é consumida *in natura* ou usada no preparo de refrescos, tortas e conservas, assim como na fabricação de sucos concentrados, polpas congeladas, néctar, geléias, cremes e bebidas, desempenhando um importante papel na nutrição e economia da região produtora (NUNES et al. 2012). Diante deste contexto, esta pesquisa visou caracterizar graviolas das variedades Crioula, Lisa e Morada quanto a composição de fibras alimentares e componentes com atividade antioxidante.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Graviolas (*Annona muricata* L.) *in natura* das variedades *Morada*, *Lisa* e *Crioula* provenientes do Instituto Agrônomo de Pernambuco foram obtidas em diferentes estádios de maturação (Fruto em Maturação fisiológica; Fruto Maduro). A coleta se deu com auxílio do

disco de coleta proposto por Livera (1992) e observando-se as seguintes características físicas:

- *Fruto em Maturação fisiológica*: Apresentando textura firme, casca verde claro, pouco brilhante e espinhos distanciados.
- *Fruto Maduro*: Apresentando textura branda, casca verde claro brilhante, ligeiramente amarelado e espinhos mais distantes, quebradiços e pouco proeminentes.

### **Caracterização físico-química das graviolas**

A composição centesimal das graviolas foi realizada pela determinação de umidade (estufa a 105°C), cinzas (mufla a 550°C), lipídeos (Bligh Dayer), proteínas (Kjeldhal) e carboidratos totais por diferença. O teor de fibra alimentar total, fibra alimentar solúvel e fibra alimentar insolúvel das graviolas foram determinados de acordo com o método enzimático-gravimétrico (AOAC, 2002).

### **Quantificação dos compostos fenólicos**

Extratos hidroacetônico e hidrometanólico foram obtidos por processo de extração sequencial, utilizando acetona a 80% e metanol a 80%. Neste sistema, 20g de polpa dos frutos foram mantidas, sob agitação permanente, à temperatura ambiente (24°C ± 2°C), por 20 minutos, com acetona (80%), e em seguida, centrifugada a 4000rpm. O sobrenadante foi coletado, o precipitado ressuspensão no mesmo solvente, e submetido ao mesmo processo acima descrito, por mais dois períodos de 20 minutos, totalizando 60 minutos de extração. Ao término deste período de extração, sobrenadantes foram combinados, concentrados sob pressão reduzida a 40° C, e o volume final aferido para 50 mL. O precipitado foi reutilizado para a extração com metanol (80%), nas condições acima descritas. Os extratos obtidos foram acondicionados em recipientes tampados e mantidos sob congelamento (-18°C) até o momento das análises.

A determinação do teor de fenólicos dos extratos foi efetuada por método espectrofotométrico, utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (Merk), segundo metodologia descrita por Wettasinghe e Shahidi (1999). O teor de fenólicos totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com ácido gálico (20 a 240 µg/mL), e os resultados expressos em mg em equivalente de ácido gálico por 100g de polpa de graviola.

### Determinação da Atividade antioxidante

Os extratos hidroacetônico e hidrometanólico combinados foram submetidos à determinação da capacidade de sequestrar o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•), utilizando o método descrito por Brand-Williams et al. (1995), modificado por Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998). Extratos combinados, com diferentes concentrações de fenólicos totais, foram adicionados à solução de DPPH• em metanol (0,1M), atingindo a concentração final de 7, 13 e 21g de polpa/L. A absorbância a 515nm foi monitorada, em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650PC) até a reação atingir o platô. A concentração do DPPH• remanescente no meio da reação foi calculada a partir da curva padrão do radical DPPH•, e o percentual de DPPH• remanescente (DPPH<sub>rem</sub>%) de cada concentração do extrato foi calculado utilizando a seguinte expressão:

$$\% \text{ DPPH}_{\text{REM}} = \frac{\text{DPPH}_t}{\text{DPPH}_{T=0}} \times 100$$

Onde: DPPH<sub>t</sub> é concentração do radical DPPH no tempo em que a reação atingiu o platô;

DPPH<sub>T=0</sub> é concentração inicial do DPPH (tempo zero da reação)

Em seguida, a concentração do extrato eficiente para diminuir em 50% a concentração inicial do DPPH• (EC<sub>50</sub>) foi calculada a partir do gráfico da concentração da amostra (g de fruto. g DPPH<sup>-1</sup>) versus DPPH<sub>REM</sub>%, cujo resultado foi expresso em g de fruto por g de DPPH•. O comportamento cinético dos extratos foi classificado em decorrência do tempo necessário para atingir o estado estacionário do valor de EC<sub>50</sub> (TEC<sub>50</sub>), definindo-se como rápido (TEC<sub>50</sub> < 5 minutos), intermediário (TEC<sub>50</sub> = 5 a 30 minutos) ou lento (TEC<sub>50</sub> > 30 minutos), segundo Sánchez-Moreno, Larrauri; Saura-Calixto (1998).

A eficiência anti-radical (EA) foi calculada considerando o valor de EC<sub>50</sub> e o tempo em que foi atingido o EC<sub>50</sub> (TEC<sub>50</sub>), sendo classificada como baixa (EA < 1), média (EA >1 e ≤ 5 ), alta (EA >5 e ≤ 10) ou super alta (EA >10) de acordo com o valor obtido na expressão abaixo (SÁNCHEZ-MORENO, LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998):

$$EA = \frac{1}{EC_{50} \times T_{EC50}}$$

Os dados obtidos foram tratados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Kruskal-Wallis, adotando-se nível de significância de 5% de probabilidade. Foi utilizado Bioestat® 1.0.

## RESULTADOS

Frutas da espécie *A. muricata* contêm 85,5% de polpa, 3,3% de sementes, 8,9% de casca e 2,9% de um receptáculo carnosos. Os frutos da gravioleira apresentam-se no formato oval com espinhos que se quebram facilmente quando a fruta está madura (NWOKOCHA; WILLIAMS, 2009). O momento da colheita é geralmente determinado pela cor da casca da fruta que muda de verde escuro para verde ligeiramente amarelado com a proximidade da maturidade fisiológica. Os frutos maduros de gravioleira apresentam brilho pronunciado na casca com mudança da cor de verde escuro para verde-claro, mas em ambos os casos, a sua polpa deve estar firme (PAREEK et al., 2011), visto que são consumidos *in natura* ou como ingrediente na produção de alimentos e bebidas exóticas.

Os macronutrientes de maior relevância neste fruto são os carboidratos, incluindo-se as fibras alimentares, que colaboram com as propriedades reológicas quando incorporadas em alimentos (NWOKOCHA; WILLIAMS, 2009). Desta forma, os resultados da composição centesimal das graviolas Crioula, Lisa e Morada mostram que para os macronutrientes (proteínas, lipídeos e carboidratos) e teor de umidade as graviolas não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, tanto entre as variedades quanto no estágio de maturação (Tabela 1). Quanto ao teor de cinzas, observou-se que a variedade Morada em ambos os estágios de maturação apresentou valores superiores às demais variedades ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 1:** Valores médios da composição físico-química das graviolas (*Annona muricata* L., variedades Crioula, Lisa e Morada) em estágio de Maturação fisiológica (MF) e Madura (M).

Variedade/ Maturação	Umidade	Cinzas	Proteínas	Lipídeos	Carboidratos
Crioula-MF	79,70±1,10 <sup>a</sup>	0,07±0,01 <sup>a</sup>	1,02±0,02 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	15,19±0,74 <sup>a</sup>
Crioula-M	80,48±0,44 <sup>a</sup>	0,13±0,01 <sup>a</sup>	1,05±0,03 <sup>a</sup>	0,01±0,01 <sup>a</sup>	13,34±0,12 <sup>a</sup>
Lisa-MF	80,66±0,55 <sup>a</sup>	0,07±0,01 <sup>a</sup>	1,09±0,06 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	18,08±0,15 <sup>a</sup>
Lisa-M	81,14±0,33 <sup>a</sup>	0,16±0,01 <sup>a</sup>	1,10±0,02 <sup>a</sup>	0,01±0,01 <sup>a</sup>	17,65±0,43 <sup>a</sup>
Morada-MF	79,34±0,34 <sup>a</sup>	0,56±0,03 <sup>b</sup>	1,04±0,03 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	17,80±0,16 <sup>a</sup>
Morada-M	80,57±0,66 <sup>a</sup>	0,82±0,10 <sup>b</sup>	1,03±0,02 <sup>a</sup>	0,01±0,00 <sup>a</sup>	11,28±0,51 <sup>a</sup>

Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ).

Os resultados da composição centesimal das graviolas estudadas é semelhante aos descritos por Sousa et al. (2011) para polpa da graviola, cuja composição é de 83,16% de umidade; 0,48% de cinzas; 1,09% de proteínas; 2,28% de lipídeos e 12,99% de carboidratos. Pareek et al. (2011) também descrevem valores semelhantes, nos quais a composição da

graviola é representada por 81% de umidade, 1% de proteína, 0,6% de lipídeos, 17,25% de carboidratos e 0,6% de cinzas. Essas variações, apesar de muito próximas, podem ser explicadas pelas diferenças nos estádios de maturação e variedades das graviolas analisadas em cada estudo, bem como condições edafoclimáticas relacionadas à produção dos frutos.

Quando avaliado o teor de fibra alimentar total nas graviolas não se observou diferença significativa entre as variedades e estádios de maturação, exceto para a variedade Lisa em estágio de maturação fisiológica que apresentou menor teor de fibra alimentar total ( $p < 0,05$ ) quando comparada à Crioula madura, graviola com maior concentração de fibras totais. Quanto ao perfil de fibras insolúveis, apenas as graviolas da variedade Lisa apresentaram diferenças entre si quanto aos estádios de maturação, observando-se o percentual de fibra insolúvel superior no fruto maduro. Todas as variedades mostraram-se semelhantes ( $p < 0,05$ ) quanto à composição de fibras solúveis (Tabela 2).

**Tabela 2:** Quantificação de fibra alimentar total (FAT), fibra solúvel (FS) e fibra insolúvel (FI) das graviolas (*Annona muricata* L., variedades Crioula, Lisa e Morada) em estágio de Maturação fisiológica (MF) e Madura (M).

<b>Variedade/ Maturação</b>	<b>FAT (%)</b>	<b>FS (%)</b>	<b>FI (%)</b>
Crioula-MF	4,51±0,64 <sup>ab</sup>	0,96±0,08 <sup>a</sup>	3,55±0,61 <sup>ab</sup>
Crioula-M	5,76±0,12 <sup>a</sup>	1,84±0,11 <sup>a</sup>	3,92±0,03 <sup>ab</sup>
Lisa-MF	3,72±0,22 <sup>b</sup>	0,94±0,22 <sup>a</sup>	2,78±0,00 <sup>a</sup>
Lisa-M	5,69±0,08 <sup>ab</sup>	1,58±0,24 <sup>a</sup>	4,46±0,00 <sup>b</sup>
Morada-MF	4,40±0,18 <sup>ab</sup>	0,94±0,18 <sup>a</sup>	3,46±0,00 <sup>ab</sup>
Morada-M	5,43±0,11 <sup>ab</sup>	1,77±0,06 <sup>a</sup>	3,65±0,06 <sup>ab</sup>

Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ).

O perfil de fibra alimentar total encontrado nas graviolas desta pesquisa se equivalem aos encontrados por Guerra et al. (1999) para a fruta madura, que apresentou 4,31% de fibra total, e por Enweani et al. (2004) que encontraram 4,33% de fibras neste fruto. Já os dados encontrados na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2006) mostram que a graviola possui 1,9% de fibras. Salgado et al. (1999) afirmam que as variações do conteúdo de fibra dos frutos podem ser inerentes a diversos fatores, como cultivar analisado, representatividade da amostra, condições de cultivo, método analítico, entre outros.

Tradicionalmente, a fibra dietética é definida como as porções de alimentos de origem vegetal que são resistentes à digestão por enzimas digestivas humanas; estando incluídos polissacarídeos, lignina, oligossacarídeos e amidos resistentes. As fibras têm sido

classificadas como solúveis ou fibras fermentáveis no cólon, e fibras insolúveis que têm ação espessante, mas que só podem ser fermentadas numa extensão limitada no cólon. Vale destacar que a maioria dos prebióticos são carboidratos não digeríveis que são fermentados no cólon (ANDERSON et al., 2009). A inulina e outras oligofrutoses têm sido fibras alimentares extensivamente estudadas atualmente, visto que agem estimulando seletivamente o crescimento de bifidobactérias, que são consideradas benéficas para saúde humana (WAITZBERG et al., 2012).

Estas informações são relevantes face a outros efeitos de cada uma das frações das fibras. Fibras insolúveis não são viscosas, são fraca e lentamente fermentáveis no cólon. Agem principalmente no intestino grosso e contribuem para o aumento do volume fecal por retenção de água, reduzindo o tempo de trânsito intestinal, a absorção de glicose e retardo da hidrólise do amido. As fibras solúveis têm alta capacidade de retenção de água e possuem a propriedade de formar géis em solução aquosa. Uma vez no estômago e no intestino delgado, as fibras solúveis aumentam a viscosidade do bolo alimentar, diminuindo a atividade de algumas enzimas digestivas, influenciando diretamente na taxa de digestão e absorção de nutrientes. Esta influência está diretamente ligada à moderação da glicemia pós-prandial e resposta insulínica, redução do colesterol e regulação do apetite (MIRA; GRAF; CÂNDIDO, 2009).

Além da composição em fibras, as graviolas são consideradas importante fonte de compostos funcionais, tais como os compostos fenólicos. Ao comparar os valores de compostos fenólicos totais, as variedades de graviola não apresentaram diferenciação estatística ( $p < 0,05$ ) entre os estádios de maturação, contudo a graviola Lisa madura apresentou maior teor de compostos fenólicos totais, diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) apenas da graviola Crioula em maturação fisiológica (tabela 3). Outros estudos revelam diferentes teores de polifenóis dos encontrados nesta pesquisa, como os descritos por Kuskoski et al. (2006) que observaram 84,3mg de ácido gálico/100g de polpa de graviola. Porém, no estudo de Melo et al. (2008) a polpa de graviola apresentou um teor de fenólicos totais de 203,94mg em equivalente catequina/100g, enquanto Souza et al. (2011) encontraram 281mg de ácido gálico/100g de polpa de graviola.

**Tabela 3:** Valores médios da quantificação dos fenólicos e atividade antioxidante das graviolas (*Annona muricata* L., variedades Crioula, Lisa e Morada) em estágio de Maturação fisiológica (MF) e Madura (M).

Variedade/ Maturação	Fenólicos totais (mg ácido gálico/ 100g)	EC <sub>50</sub> (g fruto. g DPPH <sup>-1</sup> )	TEC <sub>50</sub> (min)	Classificação cinética	EA	Classificação Anti-radical
Crioula-MF	154,40 <sup>a</sup>	162,41 <sup>a</sup>	4,40 <sup>ab</sup>	Rápido	0,003 <sup>a</sup>	Baixa
Crioula-M	188,55 <sup>ab</sup>	156,40 <sup>a</sup>	3,70 <sup>ab</sup>	Rápido	0,002 <sup>a</sup>	Baixa
Lisa-MF	284,25 <sup>ab</sup>	184,44 <sup>ab</sup>	3,25 <sup>ab</sup>	Rápido	0,002 <sup>a</sup>	Baixa
Lisa-M	358,92 <sup>b</sup>	179,25 <sup>ab</sup>	2,83 <sup>a</sup>	Rápido	0,002 <sup>a</sup>	Baixa
Morada-MF	217,10 <sup>ab</sup>	219,06 <sup>b</sup>	6,71 <sup>b</sup>	Intermediário	0,001 <sup>a</sup>	Baixa
Morada-M	264,65 <sup>ab</sup>	212,08 <sup>b</sup>	4,70 <sup>ab</sup>	Rápido	0,001 <sup>a</sup>	Baixa

Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ).

EC<sub>50</sub>= concentração do extrato eficiente para diminuir em 50% a concentração inicial do DPPH•. TEC<sub>50</sub>= tempo necessário para atingir o valor de EC<sub>50</sub>. EA= eficiência anti-radical ( $1/EC_{50} \cdot TEC_{50}$ ).

Tiburski et al. (2011) afirmam que ácidos fenólicos e flavonóides, embora não sejam essenciais à sobrevivência humana, podem proporcionar proteção contra doenças crônicas com o consumo de longo prazo, visto que estão associados aos efeitos antioxidantes. Mas, Melo et al. (2008) esclarecem que a capacidade antioxidante de um extrato não pode ser explicada apenas com base em seu teor de fenólicos totais. Por isso, a capacidade antioxidante das graviolas foi avaliada e expressa pelo valor de EC<sub>50</sub> que representa a concentração do extrato eficiente para diminuir em 50% a concentração inicial do DPPH•, e adicionalmente foram observados os parâmetros do tempo necessário para atingir o estado estacionário do valor de EC<sub>50</sub> (TEC<sub>50</sub>) e a eficiência anti-radical (EA) que é um parâmetro que combina ambos os fatores.

Os valores de EC<sub>50</sub>, de TEC<sub>50</sub> e de EA das graviolas crioula, lisa e morada estão demonstrados na Tabela 3. As amostras de graviola Crioula nos dois estádios de maturação estudados apresentaram os menores valores de EC<sub>50</sub>, diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) das graviolas da variedade Morada. Villaño et al. (2007) explicam que os dados de EC<sub>50</sub> são inversamente relacionados com a capacidade antioxidante de um composto, visto que expressam a quantidade de antioxidantes necessária para diminuir a concentração de radicais em 50%, e por isso, quanto menor for o EC<sub>50</sub> maior a atividade antioxidante do composto.

Considerando a classificação de Sánchez-Moreno; Larrauri; Saura-Calixto (1998) para o tempo necessário para atingir o valor de EC<sub>50</sub> (TEC50) e quanto à eficiência anti-radical

(EA), pode-se observar que apenas a graviola Morada Madura apresentou comportamento cinético superior a 5 minutos, exibindo velocidade de reação intermediária com o radical DPPH•, enquanto as demais amostras apresentaram rápida velocidade. No estudo de Souza et al. (2012), a graviola apresentou atividade antioxidante intermediária. Melo et al. (2008) também verificaram que a polpa de graviola possui atividade antioxidante moderada. Em relação a EA, todas as variedades de graviola estudadas, independente do grau de maturação, apresentaram baixa eficiência (EA<1) sem diferenciação estatística (p<0,05) entre as amostras (tabela 3).

Os resultados desta pesquisa apontam que o consumo de graviola é útil para aumentar as concentrações de substâncias biologicamente ativas e melhora no aporte diário de fibra alimentar. Deve-se levar em consideração também a crescente demanda de comercialização nacional e internacional desta fruta, bem como as recomendações da organização mundial de saúde quanto ao consumo de alimentos com alegação funcional.

## **CONCLUSÕES**

As graviolas analisadas nesta pesquisa apresentavam alto teor de umidade, e entre os nutrientes com maior concentração se destacaram os carboidratos. Quanto ao teor de fibras alimentares, as graviolas não apresentaram diferença significativa entre as variedades comparando-se seus estádios de maturação.

Os frutos da variedade Lisa apresentaram maior concentração de compostos fenólicos totais, porém as Crioulas mostraram o maior potencial para a atividade antioxidante, uma vez que tiveram menores valores de EC50.

Compostos bioativos e fibras dietéticas presentes nas graviolas, isolados ou associados, podem oferecer proteção e melhoria da qualidade de vida através da redução do desenvolvimento de morbidades decorrentes de processos oxidativos.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq pelos recursos financeiros e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelas bolsas de doutorado e iniciação científica concedidas.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSON, J.W.; BAIRD, P.; DAVIS JR, R.H.; FERRERI, S.; KNUDTSON, M.; KORAYM, A.; et al. Health benefits of dietary fiber. **Nutrition Reviews**, v. 67, n. 4, p.188–205, 2009.
- AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 17.ed. Washington: AOAC, 2002. 1115p.
- ARUOMA, O.I.; COLES, L.S.; LANDES; B.; REPINE, J.E. Functional benefits of ergothioneine and fruit- and vegetable-derived nutraceuticals: Overview of the supplemental issue contents. **Preventive Medicine**, v. 54, Suppl. 1, p. S4–S8, 2012.
- BASKAR, R.; RAJESWARI, V.; KUMAR, T.S. In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.45, n. 5, p. 480-485, 2007.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.28, n.1, 25-30. 1995.
- DEMBITSKY, V.M.; POOVARODOM, S.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; VEARASILP, S.; TRAKHTENBERG, S. et al. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. **Food Research International**, v. 44, p. 1671–1701, 2011.
- ENWEANI, I.B.; OBROKU, J.; ENAHORO, T.; OMOIFO, C. The biochemical analysis of soursop (*Annona muricata* L.) and sweetsop (*A.squamosa* L.) and their potential use as oral rehydration therapy. **Food, Agriculture & Environment**, v. 2, n. 1, p. 39-43, 2004 .
- GUERRA, N. B.; DAVID, P.R.B.S.; MELO, D.D.; VASCONCELOS, A.B.B.; GUERRA, M.R.M. Modificações do método gravimétrico não enzimático para determinar fibra alimentar solúvel e insolúvel em frutos. **Revista de Nutrição**, v.17, n.1, p.45-52, 2004.
- KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, n.4, p. 1283-12-87, 2006.
- LIVERA, A.V.S. **Desenvolvimento e Maturidade Fisiológica da graviola (*Annona muricata* L.)**. 1992. 80f. Dissertação (Mestrado em Nutrição). Universidade Federal de Pernambuco, Recife,1992.
- MELO, E.A.; MACIEL, M.A.S.; LIMA, V.L.A.G.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p.193-201, 2008.

- MIRA, G.S.; GRAF, H.; CANDIDO, L.M.B. Visão retrospectiva em fibras alimentares com ênfase em beta-glucanas no tratamento do diabetes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.45, n.1, p. 11-20, 2009.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, p.1523-42, 2006.
- NICKLAS, T.A.; O'NEIL, C.E.; LISKA, D.J.; ALMEIDA, N.G.; FULGONI, V.L. Modeling Dietary Fiber Intakes in US Adults: Implications for Public Policy. **Food and Nutrition Sciences**, v. 2, p.925-931, 2011.
- NUNES, C.R.; BERNARDES, N.R.; GLÓRIA, L.L.; OLIVEIRA, D.B. Flavonoides em Annonaceae: ocorrência e propriedades biológicas. **Revista Vertices**, v.14, n.1, p.39-57, 2012.
- NWOKOCHA, L.M.; WILLIAMS, P.A. New starches: Physicochemical properties of sweetsop (*Annona squamosa*) and soursop (*Annona muricata*) starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 462–468, 2009.
- PAREEK, S.; YAHIA, E.M.; PAREEK, O.P.; KAUSHIK, R.A. Postharvest physiology and technology of *Annona* fruits. *Food Research International*, v. 44, p. 1741–1751, 2011.
- REIS, C. N. *Annona muricata: análise química e biológica dos frutos de gravioleira*. Rio de Janeiro, 2011. 150p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2011.
- ROCHA, W.S.; LOPES, R.M.; SILVA, D.B.; VIEIRA, R.F.; SILVA, J.P.; AGOSTINI-COSTA, T.S. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n.4, p.1215-1221, 2011.
- SALGADO, S. M.; GUERRA, N. B.; FILHO, A. B. M. Polpa de fruta congelada: efeito do processamento sobre o conteúdo de fibra alimentar. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 3, p.303-308, 1999.
- SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, p. 270-276, 1998.
- SOUSA, M.S.B. ; VIEIRA, L.M.; SILVA, M.J.M.; LIMA, A. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 3, p. 554-559, 2011.

- SOUZA, V.R.; PEREIRA, P.A.P.; QUEIROZ, F.; BORGES, S.V.; CARNEIRO, J.D.S. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, v. 134, p. 381–386, 2012.
- SPADA, P. D. S.; DE SOUZA, G. G. N.; BORTOLINI, G. V.; HENRIQUES, J. A.P. SALVADOR, M. Antioxidant, mutagenic, and antimutagenic activity of frozen fruits. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 1, p. 144-151, 2008.
- TACO - **Tabela brasileira de composição de alimentos**. 2. ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2006.
- TIBURSKI, J.H.; ROSENTHAL, A.; DELIZA, R.; GODOY,R.L.O.; PACHECO, S. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. **Food Research International**, v. 44, p. 2326–2331, 2011.
- VILLAÑO D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; MOYÁ, M.L.; TRONCOSO, A.M.; GARCÍA-PARRILLA, M.C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta**, v.71, n.1, p.230-235, 2007.
- WAITZBERG, D.L.; PEREIRA, C.C.A.; LOGULLO, L.; JACINTHO, T.M.; ALMEIDA, D.; SILVA, M.L.T.; et al. Microbiota benefits after inulin and partially hydrolyzed guar gum supplementation – a randomized clinical trial in constipated women. **Nutrición Hospitalaria**, v. 27, n.1, p.123-129, 2012.
- WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.1801-1812, 1999.
- ZERAIK, M.L.; PEREIRA,C.A.M.; ZUIN,V.G.; YARIWAKE, J.H. Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n. 3, p. 459-471, 2010.

---

**Artigo Original 2**

**Avaliação do potencial antimicrobiano de *L. acidophilus* e *B. lactis*  
em soro lácteo fermentado.**

---

**Avaliação do potencial antimicrobiano de *L. acidophilus* e *B. lactis* em soro lácteo fermentado.**

**Evaluation of the antimicrobial potential of *L. acidophilus* and *B. lactis* in fermented whey.**

Amanda de Moraes OLIVEIRA<sup>1\*</sup>; Eriane de Castro Lima MACHADO<sup>2</sup>; Eduardo José Nepomuceno Montenegro<sup>3</sup>; Tânia Lúcia Montenegro STAMFORD<sup>4</sup>.

\* e-mail: amanda.morais@gmail.com

1-Universidade Federal Rural de Pernambuco/Departamento de Tecnologia Rural. Recife-PE. Brasil.

2-Universidade Federal de Pernambuco/Centro Acadêmico de Vitória. Vitória de Santo Antão-PE. Brasil.

3-Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Nutrição. Recife-PE. Brasil

4-Universidade Federal de Pernambuco/Departamento de Fisioterapia. Recife-PE. Brasil.

**RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi observar o potencial da atividade antagonista de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* contra micro-organismos patogênicos em soro lácteo fermentado. Para a fermentação (42°C±1°C), *L. acidophilus* LA-5® e *B. lactis* Bb-12® foram inoculados em soro lácteo pasteurizado. Foi avaliada a atividade antagônica em caldo *Man Rogosa Sharp* (MRS) e soro das bactérias lácticas frente aos micro-organismos *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*. A resistência ao ácido clorídrico (pH 4 e pH 2) e a bile (0,3%) foi verificada em caldo MRS e soro lácteo por 4 horas. *L. acidophilus* e *B. lactis* apresentaram atividade probiótica demonstrada pela resistência à bile e baixa sensibilidade ao ácido clorídrico, tanto em caldo MRS quanto no soro lácteo. Além disso, apresentaram alta e intermediária atividade antagônica comprovada frente a micro-organismos patogênicos. Quando foi utilizado o soro lácteo como substratos para fermentação, observou-se maior atividade inibitória diante de *E. faecalis*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Os micro-organismos probióticos estudados mostraram potencial para atuar na bioproteção de alimentos.

**Palavras chaves:** antagonismo microbiano, bactérias ácido lácticas, probióticos.

## ABSTRACT

The objective of this study was to observe the potential of antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* against pathogenic microorganisms in whey fermented. For the fermentation ( $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), *L. acidophilus* LA-5® and *B. lactis* Bb-12® were inoculated in pasteurized whey. Antagonistic activity was evaluated in *Man Rogosa Sharp* broth (MRS) and serum lactic acid bacteria compared to the microorganisms *B. cereus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. typhimurium*, *S. aureus*. The resistance for hydrochloric acid (pH 4 and pH 2) and bile (0.3%) was observed in MRS broth and whey by 4 hours. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* probiotic activity were demonstrated by resistance to bile and low sensitivity to hydrochloric acid, either in MRS broth and in whey. Besides, presented high and intermediate antagonistic activity demonstrated against pathogenic microorganisms. When we used the whey as substrates for fermentation, were observed a higher inhibitory activity on *E. faecalis*, *L. monocytogenes* and *S. aureus*. The probiotic microorganisms studied showed potential to act in food bioprotection.

**Keywords:** microbial antagonismo, lactic acid bacteria, probiotics.

## INTRODUÇÃO

O mercado global de alimentos funcionais está prosperando com estimativas recentes que indicam uma quota anual de 50 bilhões de dólares. Neste segmento, a movimentação representada pelos produtos probióticos é estimada em 15 bilhões de dólares (BHADORIA; MAHAPATRA, 2011). Diante desta representatividade, estes micro-organismos têm sido amplamente estudados e explorados comercialmente em diferentes produtos em todo o mundo (BALDISSERA et al., 2011).

Probióticos são micro-organismos não patogênicos que quando consumidos em quantidade suficiente, alteram a microbiota intestinal conferindo benefícios à saúde do hospedeiro (BALDISSERA et al., 2011; VANDENPLAS et al., 2011). Para que seja considerado probiótico, este deve fazer parte da microbiota gastrointestinal humana, manter a estabilidade frente ao ácido estomacal e aos sais biliares, ter a capacidade de adesão à mucosa intestinal e de colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrintestinal humano, além de produzir compostos antimicrobianos e manter a atividade metabólica no intestino (BERGMANN et al., 2010).

Além de sintetizarem substâncias inibitórias para bactérias patogênicas, os micro-organismos probióticos atuam na competição por nutrientes, exclusão competitiva, a modificação de toxinas ou de receptores de toxina, e estimulação de respostas imunológicas frente a patógenos. Devido a essas ações, os probióticos têm sido recomendados na prevenção e tratamento de infecções do trato gastrointestinal, sendo a matriz alimentar um dos melhores veículos destes micro-organismos, uma vez que pode tamponar estirpes probióticas para enfrentar o pH adverso do estômago e conseguir colonizar o intestino (RODRÍGUEZ et al., 2012).

Por isso, no setor lácteo, os alimentos fermentados probióticos apresentam elevado valor comercial, e muitas indústrias desenvolvem produtos tendo a promoção da saúde como relevante estratégia de marketing (ALVES et al., 2011). Um dos substratos mais utilizado nesses produtos tem sido o soro de queijo, que representa cerca de 90% do resíduo da produção de queijo, retendo quase 55% dos nutrientes do leite (FIORENTINI et al., 2011). A fermentação por bactérias ácido lácticas tem a capacidade de prolongar a vida de prateleira, torná-los mais digeríveis, além de melhorar a aceitabilidade visto que altera a textura, o sabor e o aroma (EL-GHAISH et al., 2011).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial probiótico de *L. acidophilus* e *B. lactis* em soro de queijo de coalho fermentado e o potencial da atividade antagonista contra micro-organismos patogênicos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Soro lácteo residual da fabricação de queijo de coalho tipo A foi coletado em recipientes estéreis diretamente do tanque e acondicionados em caixas térmicas com gelo. As linhagens de *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>®</sup> e *Bifidobacterium lactis* Bb-12<sup>®</sup> (Hansen) foram obtidas liofilizadas e embaladas em envelopes lacrados.

A cultura mista liofilizada foi reativada mediante três repiques sucessivos em leite em pó desnatado reconstituído a 10%, incubadas a 42°C por 6 horas. Ao fim do período, o pré-inóculo foi mantido em temperatura de refrigeração (4±1°C).

Para a fermentação utilizaram-se sistemas a base de soro lácteo pasteurizado (65°C por 30 minutos), inoculado com 10% do pré-inóculo. A fermentação do soro foi conduzida a 42°C±1°C até atingir aproximadamente 0,6g de ácido láctico/100g.

A atividade antagônica dos probióticos sobre micro-organismos patogênicos *in vitro* foi verificada utilizando cepas dos micro-organismos probióticos repicadas em tubos

contendo Caldo *Man Rogosa Sharp* (MRS) a 37°C, por 24 horas. Os micro-organismos patogênicos utilizados foram *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Enterococcus faecalis* (ATCC 6057), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Salmonella typhimurium* (ATCC 1428), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), os quais foram mantidos separadamente em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), à temperatura de 37°C por 24 horas.

Para avaliar a ação antagonica de *L. acidophilus* LA-5 e *B. lactis* Bb-12, foi realizado o teste de inibição com o método de dupla camada utilizando-se um inóculo contendo 9LogUFC/mL de cada amostra destas bactérias. Estes foram inoculados em seis pontos equidistantes na superfície de uma placa de ágar MRS e incubados por 72 horas, a 37°C. Após a incubação, às placas foram acrescentadas 10mL de clorofórmio, por 20 minutos, sendo, em seguida, abertas para permitir a evaporação total do clorofórmio, quando então foi adicionada uma outra camada de 3,5mL de Ágar BHI (0,75% de ágar), previamente inoculado com 0,1mL da cultura patogênica (7LogUFC/mL). As placas foram incubadas a 37°C, por 24-48 horas e avaliadas quanto à presença de halos de inibição de crescimento (MAIA et al., 2001). O efeito inibitório de *L. acidophilus* e *B. lactis* foi avaliado de acordo HÜTT et al. (2006) como alto (>25mm), intermediário (13-25 mm) e baixo (0-12 mm).

Na avaliação da atividade antagonica no soro lácteo fermentado, para cada micro-organismo patogênico avaliado foi produzido um sistema de soro fermentado contendo 9LogUFC/mL de bactérias probióticas, determinado a partir da turbidez pela escala de MacFarland.

A inoculação das bactérias patogênicas nos soros fermentados partiu de uma suspensão com aproximadamente 7LogUFC/mL de cada agente patogênico (utilizando a escala de Mac Farland). Foram utilizados 2,5mL desta suspensão para inocular 100mL de soro fermentado. Os sistemas foram avaliados mantendo-se armazenados sob refrigeração (4°C) nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias. As bactérias patogênicas foram inoculadas em triplicata, utilizando os meios de cultura seletivos (OFFICIAL..., 2005). As contagens foram expressas em LogUFC/mL (CALDERÓN et al., 2007).

Posteriormente foi realizada a avaliação da capacidade de resistência ao ácido clorídrico e à bile. Para verificação da capacidade de resistência ao ácido clorídrico, utilizou-se três repiques sucessivos em caldo MRS em pH 6,1±0,1 sendo que a cada repique as cepas permaneceram em estufa bacteriológica (37°C/24horas). Em seguida, os micro-organismos ativos foram transferido para tubos contendo caldo MRS acidificado com HCl 1N variando o

pH em 4,0 e 2,0. Os tubos, em triplicata, permaneceram em estufa (37°C) avaliando-se a viabilidade celular nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 horas (RÖNKÄ et al., 2003).

A observação da resistência à bile foi realizada a partir de alíquotas do meio contendo micro-organismos ativos para tubos com um meio contendo 0,3% de bile bovina e sem a presença de bile bovina (controle). Os tubos permaneceram em estufa (37°C) por 4 horas, avaliando-se, em triplicata, a viabilidade celular no tempo zero e a cada hora após a inoculação (RÖNKÄ et al., 2003).

Em paralelo foi realizado o estudo na matriz alimentar utilizando o soro lácteo fermentado, o qual foi conduzido nas mesmas condições aplicadas ao caldo MRS.

A viabilidade celular foi determinada após a exposição dos micro-organismos aos testes de resistência ao ácido e à ação da bile, utilizando-se a técnica de semeadura em profundidade, em meio ágar MRS. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, as colônias contadas e os resultados expressos em logUFC/mL (FUCHS et al., 2006).

Todos os testes foram realizados em triplicata. As diferenças entre as médias foram analisadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) com o teste *post hoc* Student-Newman-Keuls, adotando-se nível de significância de 5% de probabilidade. Foi utilizado Bioestat® 1.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A literatura científica mostra que inúmeras cepas probióticas exercem ação antagonista contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes nos alimentos (CALDERÓN et al., 2007; PAN et al., 2009; ZHANG et al., 2011). Nesse contexto, a maioria dos estudos busca nos agentes probióticos a atividade inibitória contra um patógeno alvo, inibindo seu desenvolvimento e a colonização no intestino (TALPUR et al., 2012).

Os probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* exerceram ação inibitória em relação aos micro-organismos patogênicos testados *in vitro*. Esta ação pode ser evidenciada através de halos de inibição contra o micro-organismo indicador, cuja variação demonstra alta atividade antagonista do *L. acidophilus* e do *B. lactis* frente ao *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* e, antagonismo intermediário diante das bactérias *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* (Tab. 1).

**Tabela 1:** Valores médios dos halos de inibição (mm) referentes à atividade antagônica *in vitro* de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* sobre micro-organismos patogênicos (24-48horas).

Micro-organismo Patogênico	<i>L. acidophilus</i>		<i>B. lactis</i>	
	Halo (mm)	Efeito Inibitório*	Halo (mm)	Efeito Inibitório*
<i>B. cereus</i> (ATCC 11778)	14,33±1,51 <sup>a</sup>	Intermediário	14,50±0,55 <sup>a</sup>	Intermediário
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	16,67±1,03 <sup>ad</sup>	Intermediário	17,67±1,03 <sup>ad</sup>	Intermediário
<i>E. faecalis</i> (ATCC 6057)	46,17±1,94 <sup>be</sup>	Alto	47,83±0,75 <sup>bc</sup>	Alto
<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 7644)	31,83±2,32 <sup>bc</sup>	Alto	25,00±0,63 <sup>cd</sup>	Alto
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	28,17±2,14 <sup>dce</sup>	Alto	25,50±1,05 <sup>bd</sup>	Alto
<i>S. typhimurium</i> (ATCC 1428)	9,87±0,20 <sup>a</sup>	Baixo	10,83±0,75 <sup>a</sup>	Baixo

\*Alto: > 25mm. Intermediário: 13-25mm. Baixo: 0-12mm. (HÜTT et al., 2006).

Médias na vertical seguida de letras iguais, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Keuls.

Guedes Neto et al. (2005) estudando a atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a micro-organismos indicadores obtiveram resultados semelhantes aos deste estudo. Os autores relatam que a bactéria *L. acidophilus* apresentou efeito inibitório alto frente a *E. faecalis* e *L. monocytogenes*, apresentando halos de inibição de 27,87mm e 39,14mm respectivamente.

A inibição de bactérias patogênicas por micro-organismos probióticos pode ser explicada com base na ação de bacteriocinas por eles produzidas. A quantidade de cargas negativas de lipídios presentes na membrana celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é determinante para a sensibilidade das células a estes compostos com atividade inibitória. Assim, é provável que as membranas de bactérias Gram-negativas, além de funcionar como barreira física, sua carga mais negativa dificulta a ligação das bacteriocinas na membrana plasmática, resultando em menor atividade bactericida. Já as bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis à atividade das bacteriocinas por não apresentarem tais características (BARRANTES et al., 2004).

Todorov et al. (2011) afirmam que além das bacteriocinas, há uma competição por sítios de ligação e a produção de peróxido de hidrogênio que desempenham um papel chave na exclusão competitiva e as propriedades probióticas. A produção de metabólitos aumentam

as chances da cepa probiótica sobreviver no ambiente do trato gastrointestinal, ressaltando as evidências dos estudos *in vitro* que as bactérias probióticas são capazes de fazer uso de efeitos antimicrobianos *in vivo*.

A elevada atividade antagonista pode estar associada à produção de ácidos orgânicos (bútrico, acético, láctico e propiônico), resultando em diminuição do pH. A inibição do desenvolvimento bacteriano por redução do pH pode ser explicada pela eficiente liberação de íons de hidrogênio através da membrana celular, causando a acidificação do citoplasma (HÜTT et al., 2006; DOMÍNGUEZ-VERGARA et al., 2009). Desta forma, demonstra-se que há um potencial de utilização destes micro-organismos probióticos nos alimentos para um maior controle destas bactérias no colón.

No estudo na matriz alimentar, quando foi utilizado o soro lácteo como substratos para fermentação, observou-se maior atividade inibitória diante de bactérias patogênicas *E. faecalis*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*, tanto para o sistema com *L. acidophilus* (Fig. 1A), tanto como *Bifidobacterium lactis* (Fig. 1B). No 14º dia, apenas o *E. faecalis* apresentou níveis indetectáveis para o soro fermentado com *Bifidobacterium lactis* (Fig. 1B). Em ambos os soros fermentados, independente do micro-organismo probiótico, foi observado efeito inibitório frente aos micro-organismos patogênicos avaliados, chegando a níveis indetectáveis no 21º dia de avaliação.

Assim, considerando que o antagonismo microbiano se dá pela concorrência por nutrientes ou de produção de metabolitos microbianos inibitórios, observa-se que o efeito inibitório dos probióticos pode ser aplicado com o intuito de estender a vida de prateleira de alimentos, visto que cepas de bactérias lácticas são geralmente reconhecidas como seguras em uso na produção de alimentos. Além disso, considerando que uma das alegações de saúde mais frequentes destes micro-organismos é a prevenção de doenças infecciosas do trato gastrointestinal, pode-se sugerir o consumo destes agentes no tratamento de doenças de origem alimentar como alternativa a administração de antibióticos (SHOBHARANI; AGRAWAL, 2011).

Estes resultados são considerados importantes, visto que atualmente a proibição e/ou recomendação de uso controlado de antibióticos como aditivos para os alimentos tem recebido atenção especial em muitos países. Yin et al. (2011) afirmam que em algumas condições os probióticos são os melhores substitutos para os antibióticos, auxiliando na melhoria da resistência aos agentes infecciosos permitindo o equilíbrio da microflora intestinal e estimulando o sistema imunológico.

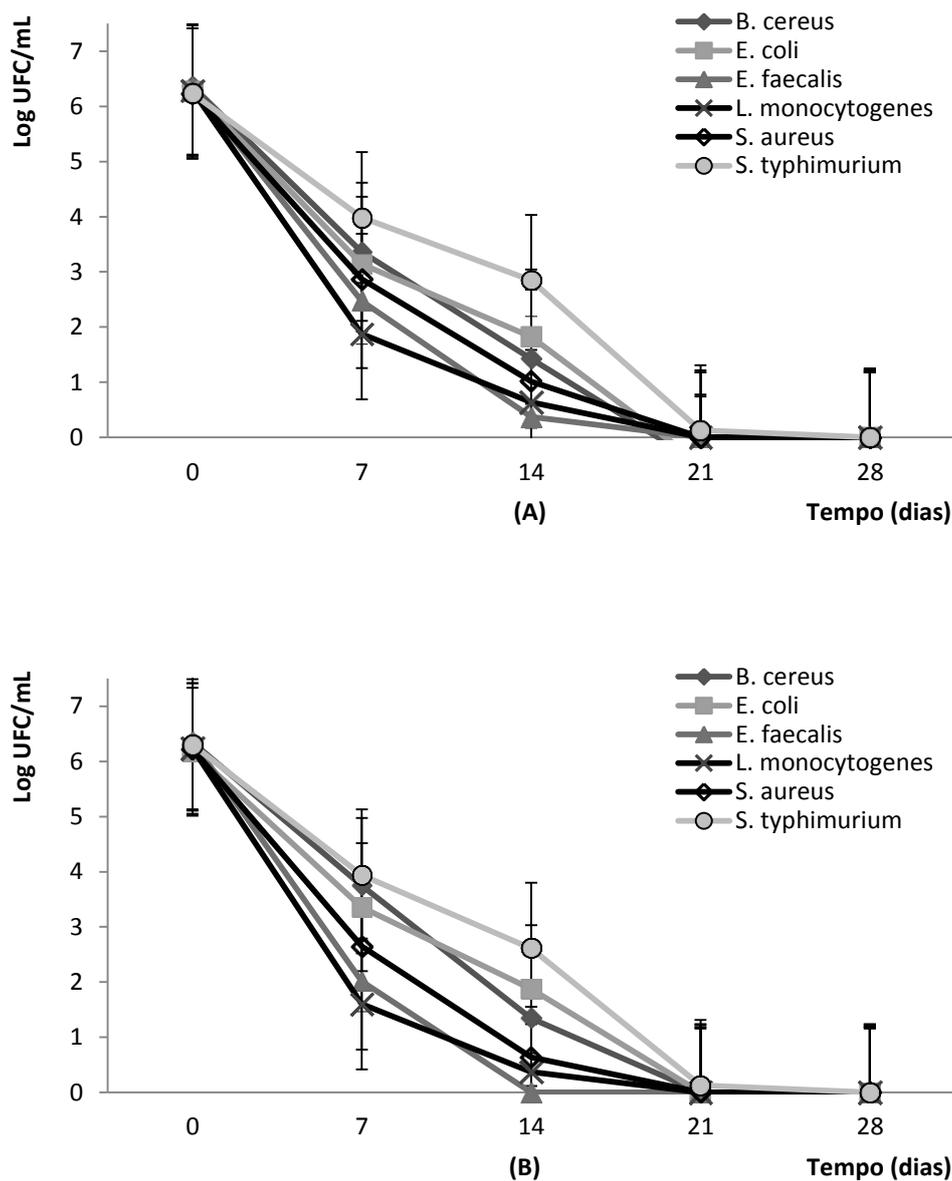


Figura 1: Atividade antagônica de *Lactobacillus acidophilus* (A) e *Bifidobacterium lactis* (B) sobre micro-organismos patogênicos, em soro lácteo fermentado em repouso, mantido a 4°C durante 28 dias.

Para que as cepas probióticas consigam exercer esses benefícios, estas devem ser resistentes às condições do trato gastrointestinal. De acordo com Araújo et al. (2009), o pH do estômago, em geral, encontra-se entre 2,5 e 3,5, não existindo regras estabelecidas para análise de tolerância ao ácido aplicada a estirpes probióticas, mas sabe-se que é uma barreira contra a colonização de bactérias no trato gastrointestinal.

O efeito da exposição das bactérias probióticas *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* a diferentes concentrações hidrogeniônicas em Caldo MRS sob condições controladas (pH 2,0; pH 4,0 e pH 6,1) e no soro lácteo foi avaliado e estão

apresentados nas Tab. 2 e 3. Os resultados mostram que durante a simulação do período de digestão estomacal (4 horas), a ação do ácido clorídrico promoveu a redução nas contagens de ambas as bactérias, tanto no caldo MRS (Tab. 2) como no soro (Tab. 3).

**Tabela 2:** Avaliação da viabilidade celular de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* durante o teste de resistência ao ácido clorídrico e à bile em caldo *Man Rogosa Sharp* (MRS).

Micro-organismo Probiótico	Tempo (hora)	Viabilidade Celular (LogUFC/mL)			
		Caldo MRS Controle	Caldo MRS com HCl (pH 4,0)	Caldo MRS com HCl (pH 2,0)	Caldo MRS com Bile
<i>L. acidophilus</i>	0	9,56±0,01 <sup>a</sup>	9,53±0,06 <sup>a</sup>	9,55±0,05 <sup>a</sup>	9,56±0,02 <sup>a</sup>
	1	9,88±0,01 <sup>a</sup>	9,28±0,08 <sup>b</sup>	9,46±0,06 <sup>c</sup>	9,51±0,02 <sup>c</sup>
	2	10,09±0,01 <sup>a</sup>	8,67±0,02 <sup>b</sup>	8,30±0,02 <sup>b</sup>	9,45±0,05 <sup>c</sup>
	3	10,39±0,03 <sup>a</sup>	8,38±0,06 <sup>b</sup>	8,07±0,03 <sup>b</sup>	9,42±0,04 <sup>c</sup>
	4	10,56±0,04 <sup>a</sup>	7,92±0,05 <sup>b</sup>	7,49±0,13 <sup>b</sup>	9,35±0,05 <sup>b</sup>
<i>B. lactis</i>	0	9,52±0,05 <sup>a</sup>	9,45±0,04 <sup>a</sup>	9,47±0,04 <sup>a</sup>	9,53±0,03 <sup>a</sup>
	1	9,82±0,02 <sup>a</sup>	9,14±0,02 <sup>b</sup>	9,04±0,01 <sup>b</sup>	9,49±0,04 <sup>c</sup>
	2	10,06±0,06 <sup>a</sup>	8,84±0,04 <sup>b</sup>	8,76±0,04 <sup>b</sup>	9,45±0,03 <sup>c</sup>
	3	10,34±0,03 <sup>a</sup>	8,64±0,03 <sup>bc</sup>	8,44±0,02 <sup>b</sup>	9,38±0,02 <sup>c</sup>
	4	10,54±0,04 <sup>a</sup>	8,31±0,02 <sup>b</sup>	8,05±0,05 <sup>b</sup>	9,25±0,04 <sup>b</sup>

Médias na vertical seguida de letras iguais, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Keuls.

A viabilidade celular de *L. acidophilus* e *B. lactis* durante o período avaliado manteve-se dentro das concentrações recomendadas que são  $\geq 10^6$  UFC/mL no intestino delgado e  $\geq 10^8$  UFC/mL no cólon (AURELI et al., 2011), apesar do ácido clorídrico ter causado efeito na redução da contagem bacteriana, independente do substrato.

Outro fator que pode prejudicar a viabilidade das bactérias probióticas é a ação da bile, visto que pode promover a morte de micro-organismos, impedindo sua implantação no trato intestinal e a colonização das porções distais do intestino. Esta ação ocorre porque os sais biliares são capazes de emulsionar os lipídeos causando efeitos deletérios nas propriedades estruturais e funcionais de membranas celulares microbianas (KLAYRAUNG; OKONOJI, 2009). Nesta pesquisa a ação deletéria da bile sobre os micro-organismos foi verificada pela alteração ( $p < 0,05$ ) nas contagens das bactérias probióticas expostas ao caldo MRS adicionado de 0,3% de bile (Tab. 2), bem como no soro lácteo fermentado (Tab 3). Apesar de ter havido redução nas contagens, os micro-organismos mantiveram-se viáveis em níveis recomendados

(> 10<sup>8</sup> UFC/mL).

**Tabela 3:** Avaliação da viabilidade celular de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* durante o teste de resistência ao ácido clorídrico e à bile em soro lácteo fermentado.

Micro-organismo Probiótico	Tempo (hora)	Viabilidade Celular (LogUFC/mL)			
		Soro	HCl (pH 4,0)	HCl (pH 2,0)	Bile 0,3%
<i>L. acidophilus</i>	0	9,74±0,02 <sup>a</sup>	9,74±0,03 <sup>a</sup>	9,64±0,05 <sup>b</sup>	9,70±0,02 <sup>a</sup>
	1	9,99±0,01 <sup>a</sup>	9,35±0,05 <sup>b</sup>	9,06±0,02 <sup>c</sup>	9,67±0,02 <sup>d</sup>
	2	10,17±0,02 <sup>a</sup>	8,97±0,02 <sup>b</sup>	8,92±0,02 <sup>b</sup>	9,56±0,03 <sup>c</sup>
	3	10,66±0,04 <sup>a</sup>	8,87±0,02 <sup>b</sup>	8,83±0,03 <sup>b</sup>	9,45±0,03 <sup>b</sup>
	4	10,92±0,02 <sup>a</sup>	8,48±0,04 <sup>b</sup>	8,43±0,03 <sup>b</sup>	9,34±0,05 <sup>b</sup>
<i>B. lactis</i>	0	9,67±0,02 <sup>a</sup>	9,59±0,01 <sup>b</sup>	9,53±0,02 <sup>c</sup>	9,67±0,02 <sup>a</sup>
	1	9,95±0,01 <sup>a</sup>	9,24±0,02 <sup>b</sup>	9,20±0,01 <sup>b</sup>	9,54±0,03 <sup>c</sup>
	2	10,39±0,01 <sup>a</sup>	8,27±0,01 <sup>b</sup>	8,25±0,02 <sup>b</sup>	9,43±0,03 <sup>c</sup>
	3	10,68±0,01 <sup>a</sup>	8,15±0,03 <sup>b</sup>	8,15±0,02 <sup>b</sup>	9,32±0,02 <sup>c</sup>
	4	10,90±0,01 <sup>a</sup>	7,65±0,10 <sup>b</sup>	7,50±0,04 <sup>b</sup>	9,23±0,03 <sup>b</sup>

Médias na vertical seguida de letras iguais, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Keuls.

Ng, Yeung e Tong (2011) explicam a alta dosagem de micro-organismos probióticos é necessária para compensar a perda de células microbianas durante a passagem através das partes superior e inferior do trato gastrointestinal e quando estes probióticos são administrados através de um veículo alimentar, quantidades adicionais de células são provavelmente necessárias, para compensar a perda de micro-organismos durante as fases de processamento e/ou armazenamento.

Os resultados desta pesquisa sugerem o emprego do soro lácteo fermentado por probióticos como potencial alimento funcional, podendo-se destacar pelas propriedades de diversas proteínas e peptídeos bioativos constituintes do soro de leite. Além disso, cabe ressaltar que a utilização do soro encontra atualmente inúmeras aplicações na indústria alimentícia pelas propriedades físicas e químicas inerentes deste produto, apresentando flexibilidade e adaptabilidade a diversas aplicações, justificando sua utilização como ingrediente em um número abrangente de alimento processados.

## CONCLUSÕES

Os micro-organismos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* apresentaram atividade probiótica demonstrada pela resistência à bile e baixa sensibilidade ao ácido

clorídrico, além da alta e intermediária atividade antagonista comprovada *in vitro* frente micro-organismos patogênicos.

Considerando as características de resistência das bactérias *L. acidophilus* e *B. lactis*, além das propriedades antimicrobianas, pode-se sugerir que os micro-organismos probióticos estudados são agentes potenciais na bioproteção de alimentos.

A fermentação de soro lácteo residual da produção de queijo de coalho pode resultar em uma base para produto lácteo funcional, com mais vantagens para a saúde dos consumidores.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq pelos recursos financeiros e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelas bolsas de doutorado e iniciação científica concedidas.

## **REFERÊNCIAS**

- ALVES, C.C.C.; GEMAL, N.D.H.; CORTEZ, M.A.S.; et al. Utilização de *Lactobacillus acidophilus* e de acidificação direta na fabricação de queijo de minas frescal. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 63, n. 6, p.1559-1566, 2011.
- ARAÚJO, E.A.; CARVALHO, A.F.; LEANDRO, E.S.; et al. Produção de queijo tipo cottage simbiótico e estudo de sobrevivência das células probióticas quando expostas a diferentes estresses. *Pesq. Agropec. Trop.*, v. 39, n. 2, p.111-118, 2009.
- AURELI, P. ; CAPURSO, L. ; CASTELLAZZI, A.M. ; et al. Probiotics and health: An evidence-based review. *Pharmacol. Res.*, v. 63, p. 366-376, 2011.
- BALDISSERA, A.C.; DELLA BETTA, F.; PENNA, A.L.B.; et al. Alimentos funcionais: uma nova fronteira para o desenvolvimento de bebidas protéicas a base de soro de leite. *Semina Ciênc. Agra.*, v. 32, n. 4, p. 1497-1512, 2011.
- BARRANTES, X.; RAILEY, D.; ARIAS, M.L.; et al. Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial, sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7. *Arch. Latinoam. Nutr.*, v. 54, n. 3, p. 293-297, 2004.
- BERGMANN, R.S.O.; PEREIRA, M.A.; VEIGA, S.M.O.M.; et al. Microbial profile of a kefir sample preparations: grains in natura and lyophilized and fermented suspension. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 30, n. 4, p.1022-1026, 2010.

BHADORIA, P.B.S.; MAHAPATRA, S.C. Prospects, Technological Aspects and Limitations of Probiotics – A Worldwide Review. *Eur. J. Food Res. Rev.*, v. 1, n. 2, p. 23-42, 2011.

CALDERÓN, O.; PADILLA, C.; CHAVES, C. et al. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. *Arch. Latinoam. Nutr.*, v. 57, n. 1, p.51-57, 2007.

DOMÍNGUEZ-VERGARA, A.M.; VÁZQUEZ-MORENO, L.; MONTFORT, G.R.C. Revisión del papel de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones gastrointestinales. *Arch. Latinoam. Nutr.*, v. 59, n. 4, p. 358-368, 2009.

EL-GHAISH, S.; AHMADOVA, A.; HADJI-SFAXI, I.; et al. Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends Food Sci. Tech.*, v. 22, 509-516, 2011.

FIORENTINI, A.M.; BALLUS, C.A.; OLIVEIRA, M.L.; et al. The influence of different combinations of probiotic bacteria and fermentation temperatures on the microbiological and physicochemical characteristics of fermented lactic beverages containing soybean hydrosoluble extract during refrigerated storage. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 31, n. 3, p. 597-607, 2011.

FUCHS, R.H.B.; TANAMATI, A.A.C.; ANTONIOLI, C.M.; et al. Utilização de *Lactobacillus casei* e cultura iniciadora na obtenção de iogurte suplementado com inulina e oligofrutose. *Bol. Centro Pesqui. Process. Aliment.*, v. 24, n. 1, p. 83-98, 2006.

GUEDES NETO, L.G.; SOUZA, M.R.; NUNES, A.C.; et al. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 57, n. S2, p. 245-250, 2005.

HÜTT, P.; SHCHEPETOVA, J.; LÕIVUKENE, K.; et al. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero and uropathogens. *J. Appl. Microbiol.*, v. 100, n 6, p. 1324-1332, 2006.

KLAYRAUNG, S.; OKONOGI, S. Antibacterial and Antioxidant Activities of Acid and Bile Resistant Strains of *Lactobacillus fermentum* Isolated from Miang. *Braz. J. Microbiol.*, v.40, n.4, p. 757-766, 2009.

MAIA, O.B.; DUARTE, R.; SILVA, A.M.; et al. Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *typhimurium*. *Vet. Microbiol.*, v. 70, p. 183-189, 2001.

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

OFFICIAL methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry. 17.ed. Washington: AOAC, 2002. 1115p.

PAN, X.; CHEN, F.; WU, T.; et al. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control*, v. 20, p. 598-602, 2009.

RODRÍGUEZ, E.; ARQUÉS, J.L.; RODRÍGUEZ, R.; et al. Antimicrobial properties of probiotic strains isolated from breast-fed infants. *J. Funct. Foods*, v. 4, p.542–551, 2012.

RÖNKÄ, E.; MALINEN, E.; SAARELA, M.; et al. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 83, p. 63-74, 2003.

SHOBHARANI, P.; AGRAWAL, R. A Potent Probiotic Strain from Cheddar Cheese. *Indian J. Microbiol.*, v. 51, n. 3, p. 251-258, 2011.

TALPUR, A.D.; MEMON, A.J.; KHAN, M.I.; et al. Isolation and screening of lactic acid bacteria from the gut of blue swimming crab, *P. pelagicus*, an in vitro inhibition assay and small scale in vivo model for validation of isolates as probiotics. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v. 7, n. 1, p. 1-28, 2012.

TODOROV, S.D.; FURTADO, D.N.; SAAD, S.M.I.; et al. Bacteriocin production and resistance to drugs are advantageous features for *Lactobacillus acidophilus* La-14, a potential probiotic strain. *New Microbiol.*, n.34, p. 357-370, 2011.

VANDENPLAS, Y. ; VEEREMAN-WAUTERS, G.; DE GREEF, E. ; et al. Probiotics and prebiotics in prevention and treatment of diseases in infants and children. *J. Pediatr.*, v. 87, n. 4, p. 292-300, 2011.

YIN, Q.Q.; FAN, G.G. ; CHANG ; J. ; et al. Effect of the Combined Probiotics on Inhibiting Pathogenic *Escherichia coli* Proliferation. *Advanced Mat. Res.*, v. 343-344, p. 802-808, 2011.

ZHANG, Y.; ZHANG, L.; DU, M. ; et al. Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food. *Microbiol. Res.*, v. 167, n. 1, p. 27-31, 2011.

---

**Artigo Original 3**

**Características sensoriais e estabilidade de bebida láctea  
simbiótica com sabor graviola**

---

## **Características sensoriais e estabilidade de bebida láctea simbiótica com sabor graviola.**

Sensory characteristics and stability of soursoop-flavored symbiotic dairy drink.

Amanda de Moraes Oliveira<sup>1\*</sup>; Erilane de Castro Lima Machado<sup>2</sup>; Eduardo José Nepomuceno Montenegro<sup>3</sup>; Tânia Lúcia Montenegro Stamford<sup>4</sup>.

\*E-mail: amanda.morais@gmail.com

1-Universidade Federal Rural de Pernambuco/Departamento de Tecnologia Rural. Recife-PE. Brasil.

2-Universidade Federal de Pernambuco/Centro Acadêmico de Vitória. Vitória de Santo Antão-PE. Brasil.

3-Universidade Federal de Pernambuco/Departamento de Fisioterapia. Recife-PE. Brasil.

4-Universidade Federal de Pernambuco/Departamento de Nutrição. Recife-PE. Brasil.

### **RESUMO**

Produtos lácteos simbióticos são representantes em destaque entre os alimentos funcionais, e por isso o mercado busca a aceitação de novas composições pelo consumidor. Assim, os objetivos desta pesquisa foram avaliar as características sensoriais e vida de prateleira da bebida simbiótica produzida com soro lácteo fermentado e polpa de graviola. As misturas (n=10) foram definidas através de delineamento simplex aumentado. Análise sensorial foi dividida em teste de preferência e por análise descritiva quantitativa. A avaliação da vida de prateleira (pH, acidez total titulável, coliformes, bolores e leveduras, estafilococos coagulase positiva e bactérias lácticas totais) foi realizada após 0, 7, 14, 21 e 28 dias de produção da bebida. Os resultados mostraram que a bebida com 71,5% de soro apresentou boa aceitabilidade sensorial, e que 25% da polpa de graviola favoreceu a aceitação quanto ao sabor e aroma. A bebida manteve as características durante a vida de prateleira, principalmente as bactérias probióticas em níveis recomendados pela legislação vigente. Conclui-se que a aceitação sensorial e estabilidade no armazenamento viabiliza a produção da bebida simbiótica proposta, além de gerar alternativa para utilização do soro lácteo residual da produção de queijo de coalho, bem como possibilita redução das perdas pós-colheita da graviola.

**Palavras chaves:** *Annona muricata* L., bebida láctea, frutooligossacarídeo, probiótico, soro lácteo.

## ABSTRACT

Dairy products are symbiotic representatives among functional foods, and the market find the acceptance for new compositions by the consumer. The objectives of this study were to evaluate the sensory characteristics and shelf life of symbiotic beverage produced with fermented whey and soursop pulp. The mixtures (n = 10) were defined by design simplex increased. Sensory analysis were divided into preference test and quantitative descriptive analysis. The evaluation of shelf life (pH, titratable acidity, coliforms, yeasts and molds, Staphylococcus coagulase positive and total lactic acid bacteria) was performed after 0, 7, 14, 21 and 28 days of the drinking production. The results showed that the drink with 71.5% of whey showed good sensory acceptance, and that 25% of soursop pulp favored the acceptance for flavor and aroma. The drink maintained the characteristics during shelf life, especially probiotic bacteria at levels recommended by current legislation. It follows that the sensory acceptance and storage stability sensory enables the production of the proposed symbiotic beverage, and generate an alternative to the use of whey from “coalho” cheese production, as well as turn possible the reduction the losses post-harvest soursop.

**Keywords:** *Annona muricata* L., milk drink, fructooligosaccharides, probiotic, whey.

## INTRODUÇÃO

A sofisticação crescente no mercado de alimentos busca atender demandas dos consumidores, não somente por alimentos convenientes e saudáveis, mas também por alimentos que aportam uma diferenciação da composição clássica, por exemplo, nas bebidas funcionais a base de soro de leite (Baldissera et al., 2011). As aplicações do soro são inúmeras, e a conversão do soro líquido em bebidas lácteas é uma das mais atrativas opções, devido à simplicidade do processo e a possibilidade de uso dos equipamentos já existentes na usina de beneficiamento de leite (Caldeira et al., 2010).

No Brasil, a produção de bebida láctea é uma das principais opções de aproveitamento do soro de leite, sendo que as mais comercializadas são as bebidas fermentadas, visto que apresentam características sensoriais semelhantes ao iogurte (Caldeira et al., 2010). Além do Brasil, outros países têm consumido alimentos fermentados, principalmente os que apresentam micro-organismos probióticos, predominantemente dos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Bifidobacterium*, representados por algumas espécies (Zare et al., 2012).

Associado aos micro-organismos probióticos, substâncias prebióticas como a inulina e os fructooligosacarídeos têm sido amplamente empregadas nas formulações de bebidas lácteas

fermentadas, caracterizando o alimento como simbiótico. A adição dessas substâncias aos alimentos é justificada pelo fato de alguns micro-organismos probióticos, como as bifidobactérias, fermentarem preferencialmente esses oligossacarídeos a outras fontes de carboidratos (Komatsu et al., 2008).

Associados às características nutricionais e/ou funcionais, o perfil sensorial exerce grande influência sobre a possibilidade de um produto desenvolvido obter sucesso no mercado. De acordo com Miguel et al. (2010), os testes sensoriais utilizam os órgãos dos sentidos humanos como instrumentos de medida e devem ser incluídos como garantia de qualidade dos alimentos, por serem uma medida multidimensional integrada e possuírem importantes vantagens como a determinação da aceitação de um produto por parte dos consumidores. Dentre estes testes, a análise descritiva quantitativa (ADQ) proporciona uma completa descrição e quantificação de todas as propriedades sensoriais de um produto, representando um dos métodos mais completos e sofisticados para a caracterização de importantes atributos sensoriais.

Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi desenvolver uma bebida fermentada a partir de soro lácteo e polpa de graviola com característica simbiótica, utilizando cultura probiótica e frutooligossacarídeo como ingrediente prebiótico, e, avaliar as características sensoriais e vida de prateleira da bebida.

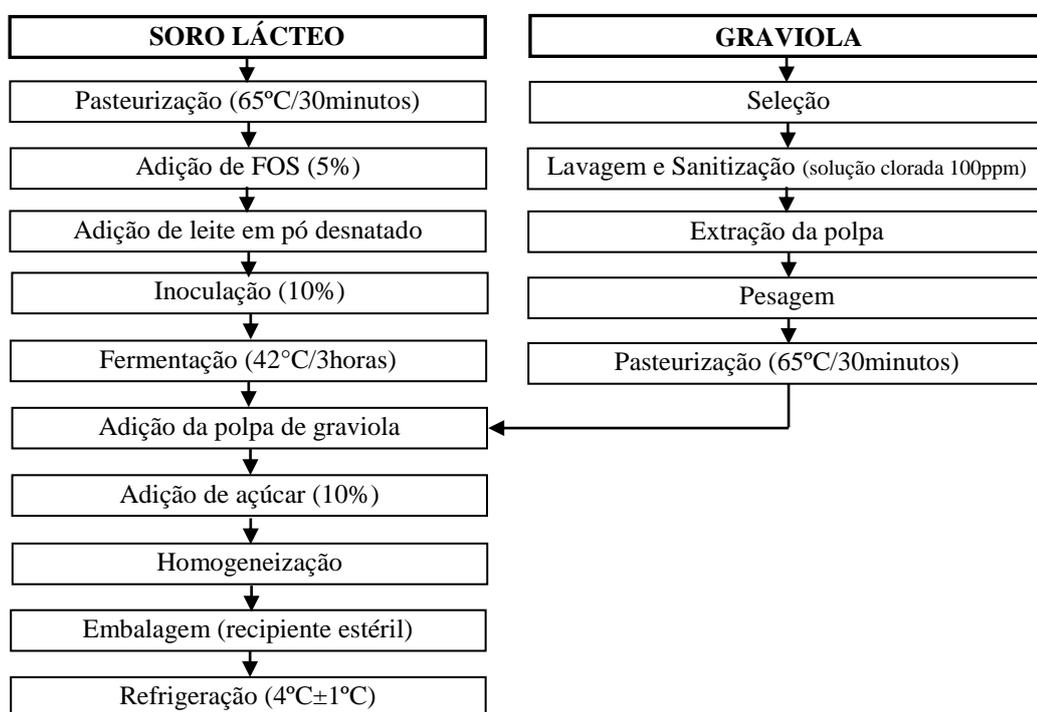
## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Soro lácteo residual da fabricação de queijo de coalho tipo A foi coletado em recipientes estéreis diretamente do tanque e acondicionados em caixas isotérmicas com gelo.

As graviolas (*Annona muricata* L.) in natura da variedade *Crioula*, obtidas em estádios de maturação “Maduro”, foram provenientes do Instituto Agrônomo de Pernambuco. Os frutos foram lavados em água corrente, sanitizados em solução clorada a 100 ppm por 10 minutos e em seguida despulpados, porcionados em embalagens de 200g e congelados em freezer (-20°C) até o momento de sua utilização.

As demais matérias-primas utilizadas foram o frutooligossacarídeo (FOS, Raftilose P95<sup>®</sup>, Orafti, Tienen, Bélgica, com grau de polimerização 2-7; contendo 5% de glicose, frutose e sacarose), leite em pó desnatado, e sacarose (açúcar refinado granulado comercial). As linhagens utilizadas foram obtidas a partir de cultura mista liofilizada e embaladas em envelopes lacrados composta pela *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>®</sup> e *Bifidobacterium lactis* Bb-12<sup>®</sup> (Bio RICH<sup>®</sup> - Hansen).

Para fermentação do soro e produção da bebida fermentada, procedeu-se o preparo do pré-inóculo, a cultura mista (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>®</sup> e *Bifidobacterium lactis* Bb-12) liofilizada foi reativada mediante três repiques sucessivos em leite em pó desnatado reconstituído a 10%, incubadas a 42°C/6 horas. Ao fim do período, o pré-inóculo foi mantido em temperatura de refrigeração (4±1°C). O soro adicionado de leite em pó desnatado em diferentes concentrações (Tab. 1) foi adicionado de 10% de inoculo e submetido à fermentação, seguindo as etapas do fluxograma de processamento da bebida fermentada (Fig. 1).



**Figura 1:** Fluxograma de processamento de bebida láctea fermentada com polpa de graviola e frutooligossacarídeo.

O teor de frutooligossacarídeo foi fixado em 5%, conforme Silva et al. (2011). A fermentação do soro foi conduzida até atingir aproximadamente 0,6g de ácido láctico/100g (Brasil, 2000).

As proporções das misturas foram definidas empregando-se um delineamento simplex aumentado de misturas, definidas em 10 tratamentos. Considerando que a soma das variáveis de uma mistura deve ser igual a 100%, as restrições foram quanto ao mínimo de 66,5% de soro de queijo de coalho; 3,5% de leite em pó desnatado e 20% de polpa de graviola (Tab. 1).

**Tabela 1:** Condições experimentais do planejamento de misturas na formulação das bebidas lácteas fermentadas com polpa de graviola e frutooligossacarídeo (g/100g).

<b>Formulações da bebida</b>	<b>Leite em pó desnatado (g/100g)</b>	<b>Soro de queijo de coalho (g/100g)</b>	<b>Polpa de graviola (g/100g)</b>
01	13,5	66,5	20,0
02	3,5	76,5	20,0
03	3,5	66,5	30,0
04	8,5	71,5	20,0
05	8,5	66,5	25,0
06	3,5	71,5	25,0
07	6,8	69,8	23,3
08	10,2	68,2	21,7
09	5,2	73,2	21,7
10	5,2	68,2	26,7

Ao final da formulação das misturas, as bebidas foram homogeneizadas e adicionadas de açúcar (10%). As bebidas foram envazadas em recipientes esterilizados e mantidas em temperatura de refrigeração ( $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) para avaliação das características sensoriais.

Os testes sensoriais foram realizados 24 horas após a elaboração das bebidas. As amostras foram codificadas utilizando sequencia de 3 número aleatórios. As bebidas foram servidas em temperatura de refrigeração ( $4^{\circ}\text{C}$  a  $8^{\circ}\text{C}$ ) em copos descartáveis de 50mL sendo oferecida água e bolacha de água no intervalo das amostras. Todos os testes sensoriais foram realizados em cabines individuais com controle de iluminação e de temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), respeitando-se o intervalo de duas horas antes ou depois das refeições. Antes de cada teste, os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido conforme o previsto no projeto de pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE nº 405/2010), seguindo a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Primeiramente, realizou-se um teste de aceitação, com 75 provadores não-treinados de ambos os sexos e idade entre 16 e 35 anos. As dez formulações foram avaliadas monadicamente em dois blocos através do uso da escala hedônica de 09 pontos cujos limites seguiram a classificação: 01 para “desgostei extremamente” e 09 para “gostei extremamente”.

A avaliação do perfil sensorial das formulações baseou-se na Análise Descritiva Quantitativa (Stone e Sidel, 2004), utilizando cinco formulações com as melhores médias

obtidas no teste anterior. Para seleção de provadores foram recrutados 15 voluntários. Após avaliação do poder discriminativo de cada voluntário, através da aplicação do teste de sensibilidade aos gostos básicos (*Threshold*) foram selecionados 9 provadores que acertaram no mínimo 50% da avaliação (Morales, 1994).

A partir da seleção de provadores, foi realizada a definição da terminologia descritiva a partir da apresentação das amostras aos provadores, os quais descreveram as similaridades e diferenças observadas quanto ao aroma, sabor, consistência e aparência. Partindo da lista de termos, os provadores discutiram o significado de cada termo, elaborando-se a ficha de avaliação sensorial contendo a definição de cada termo descritivo (Tab. 2).

**Tabela 2:** Definições dos termos descritivos para as amostras de bebidas lácteas fermentadas com polpa de graviola e frutooligossacarídeo.

DESCRITORES	SIGLAS	DESCRIÇÃO
<b>AROMA</b>		
Frutal de Graviola	AFG	Característico de graviola madura <i>in natura</i>
Lácteo	AL	Sensação olfativa relacionada ao leite <i>in natura</i>
Bebida láctea fermentada	ABLF	Associado ao aroma da coalhada
<b>SABOR</b>		
Frutal de Graviola	SFG	Sensação gustativa característico de graviola madura <i>in natura</i>
Lácteo	SL	Sensação percebida ao degustar leite e/ou derivados lácteos.
Soro Lácteo	SSL	Sabor levemente salgado associado ao leite
Ácido	SA	Associado ao ácido láctico obtido da fermentação e do ácido presente na polpa da fruta
Bebida láctea fermentada	SBLF	Característico de bebida láctea fermentada sem adição de aromatizantes e/ou polpas de frutas
<b>CONSISTÊNCIA</b>		
Homogeneidade	CH	Ausência de partículas sólidas detectáveis
Viscosidade	CV	Resistência ao escoamento do produto entre a língua e o palato
<b>APARÊNCIA</b>		
Cor	AC	Cor semelhante ao iogurte integral
Geral	AGE	Conjunto dos atributos que conferem a aceitação de uma bebida láctea fermentada com polpa de graviola

A avaliação foi realizada apresentando as amostras monadicamente (Stone e Sidel, 2004) para avaliar os descritores relacionados à aparência, consistência, aroma e sabor utilizando a escala hedônica de 09 pontos.

A análise de intenção de compra foi realizada utilizando-se uma escala de cinco pontos, onde a representação 01 correspondia a “certamente não compraria” e a 5 “certamente compraria” (Meilgaard et al., 1999).

Para o cálculo do Índice de Aceitabilidade do produto foi adotada a expressão (Stone e Sidel, 2004):  $IA (\%) = A \times 100/B$ , onde A = nota média obtida para o produto, e B = nota máxima dada ao produto.

Para a avaliação da vida de prateleira, o produto elaborado foi avaliado após 0, 7, 14, 21 e 28 dias de produzido, quanto ao pH, acidez total titulável, análises de qualidade microbiológica (coliformes totais, coliformes termotolerantes, bolores e leveduras, estafilococos coagulase positiva) e de viabilidade celular dos micro-organismos probióticos (contagem de bactérias lácticas totais), seguindo as preconizações metodológicas da *Association Official Analytical Chemists* (Official..., 2002).

Os dados obtidos foram tratados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Kruskal-Wallis, adotando-se nível de significância de 5% de probabilidade. Foi utilizado Bioestat® 1.0.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A aceitação do consumidor é um pré-requisito para que bebidas protéicas a base de soro tenham representação no pré-existente mercado de bebidas lácteas (Baldissera et al., 2011). O desenvolvimento de bebidas com soro de leite pode ter as propriedades sensoriais otimizadas quando são submetidas ao processo de fermentação. De acordo com Jeličić et al. (2008), a fermentação do soro de leite utilizando cultura de iogurte produz um sabor de iogurte mais intenso em comparação com a obtida quando é utilizado o leite desnatado fermentado.

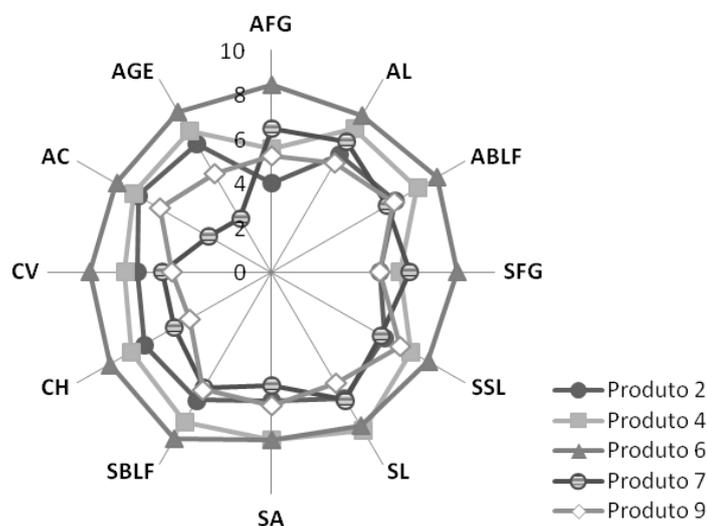
As amostras 2, 4, 6, 7 e 9 (formuladas com 76,5%; 71,5%; 71,5%; 69,8%, 73,2% de soro, respectivamente) obtiveram as melhores médias no teste de aceitação (Tab. 3). Na análise sensorial, as maiores médias foram obtidas pelas bebidas 4 e 6, permitindo-se verificar que as amostras não diferiram significativamente entre si quanto os atributos aroma, sabor, consistência e aparência, seguidas das amostras 2, 7 e 9 que também não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3:** Resultados do teste de ordenação das amostras de bebidas lácteas fermentadas com polpa de graviola e frutooligossacarídeo.

Bebida	Aroma	Sabor	Consistência	Aparência
1	5,23±1,47 <sup>f</sup>	5,05±1,34 <sup>g</sup>	5,13±1,41 <sup>g</sup>	5,19±1,34 <sup>f</sup>
2	7,07±1,47 <sup>c</sup>	7,07±1,58 <sup>c</sup>	7,11±1,52 <sup>c</sup>	7,33±1,31 <sup>bc</sup>
3	5,88±1,62 <sup>e</sup>	5,72±1,50 <sup>ef</sup>	6,00±1,63 <sup>ef</sup>	5,88±1,61 <sup>e</sup>
4	7,83±0,72 <sup>a</sup>	7,81±0,82 <sup>a</sup>	7,80±0,77 <sup>a</sup>	7,84±1,01 <sup>a</sup>
5	6,44±1,51 <sup>d</sup>	6,57±1,53 <sup>d</sup>	6,45±1,79 <sup>de</sup>	6,53±1,91 <sup>d</sup>
6	7,61±0,91 <sup>ab</sup>	7,56±1,00 <sup>ab</sup>	7,60±0,98 <sup>ab</sup>	7,57±1,14 <sup>ab</sup>
7	6,93±1,39 <sup>c</sup>	6,92±1,71 <sup>cd</sup>	6,91±1,44 <sup>cd</sup>	6,89±1,21 <sup>cd</sup>
8	5,43±1,46 <sup>f</sup>	5,49±1,26 <sup>fg</sup>	5,56±1,48 <sup>fg</sup>	5,41±1,33 <sup>f</sup>
9	7,25±1,01 <sup>bc</sup>	7,13±1,11 <sup>bc</sup>	7,15±0,91 <sup>bc</sup>	7,19±0,94 <sup>bc</sup>
10	6,20±1,50 <sup>de</sup>	6,09±1,68 <sup>e</sup>	6,15±1,80 <sup>e</sup>	5,93±1,47 <sup>e</sup>

Médias na vertical seguidas de letras iguais não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Kruskal-Wallis.

As amostras mais aceitas foram submetidas à análise descritiva quantitativa. Estes resultados estão apresentados na Fig. 2, a qual é representada ao centro com o ponto zero, e cada eixo correspondente aos atributos avaliados é a apresentada uma média, que conectadas entre si traçam o perfil sensorial das bebidas.



**Figura 2:** Perfil sensorial das amostras das bebidas lácteas fermentadas com polpa de graviola e frutooligossacarídeo.

**AFG:** aroma frutal de graviola; **AL:** aroma lácteo; **ABLF:** aroma bebida láctea fermentada; **SFG:** sabor frutal de graviola; **SL:** sabor lácteo; **SSL:** sabor soro lácteo; **SA:** sabor ácido; **SBLF:** sabor bebida láctea fermentada; **CH:** consistência homogeneidade; **CV:** consistência viscosidade; **AC:** aparência cor; **AGE:** aparência geral.

Observou-se que a formulação 6 da bebida fermentada à base de soro lácteo e de polpa de graviola distinguiu-se das demais ( $p < 0,05$ ) quanto aos atributos AFG, SFG uma vez que dentre as formulações avaliadas apresentava o maior percentual de polpa de graviola. A bebida 6 também apresentou diferença significativa ao nível de 5% das outras amostras quanto ao atributo viscosidade (CV). Apesar da bebida 6 ter apresentado as maiores média na avaliação dos provadores na maioria dos atributos, pode-se observar que não diferiu estatisticamente ( $p < 0,05$ ) da bebida 4 quanto aos atributos de aroma AL e ABLF, atributos de sabor SL, SSL, SA e SBLF, bem como quanto à homogeneidade, viscosidade, cor e aparência geral (Fig. 2).

Esses resultados são considerados satisfatórios, visto que as bebidas 4 e 6 apresentam a segunda maior concentração de soro lácteo (71,5%) das formulações previstas no planejamento de misturas. No entanto, considerando que a bebida 6 apresentou as maiores médias quanto ao aroma e sabor de graviola e que diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) das demais bebidas, esta pode ser considerada uma boa opção para produção uma vez que apresenta a menor concentração de leite em pó desnatado, o que viabiliza economicamente o processamento.

Os resultados desta pesquisa dão embasamento para o favorecimento do consumo mais abrangente do soro lácteo, bem como gera mais uma aplicabilidade à graviola, fruto de alta perecibilidade e de curto período de conservação após a colheita, mas que possui características relevantes quanto a composição em açúcares, ácidos orgânicos e compostos fenólicos da polpa (Lima et al., 2010).

Lutchmedial et al. (2004) avaliaram atributos sensoriais de aparência e cor, corpo e sabor, textura e aroma, e qualidade geral em iogurtes incorporados de néctar graviola (0%, 5%, 10% e 15%). Os resultados revelaram que os iogurtes com 10% e 15% de néctar de graviola tiveram o maior índice de qualidade global ( $p < 0,05$ ), mas diferiram em sabor e aroma de iogurte natural em relação ao iogurte com 5% de néctar de graviola ( $p < 0,05$ ). De acordo com os autores, a maioria dos provadores considerou a intenção de compra para os iogurtes com 10% e 15% de néctar de graviola. Podendo-se inferir, portanto, que a maior concentração do fruto leva a uma maior aceitabilidade do produto, e conseqüente a um iogurte com melhores atribuições nutricionais.

O desenvolvimento de um produto novo requer a avaliação de sua aceitabilidade visando prever o seu comportamento frente ao mercado consumidor. Assim, ao analisar o índice de aceitabilidade das bebidas (Tab. 4) foi possível verificar que apenas os atributos

“consistência” da bebida 9 e “aparência” da bebida 7 foram inferiores a 70%, índice mínimo para que o produto seja considerado como aceito sensorialmente (Stone e Sidel, 2004). Observou-se também que as médias das notas atribuídas para a bebida 6 foram as maiores entre as bebidas avaliadas, bem como apresentou a maior média quanto a intenção de compra ( $4,03 \pm 0,96$ ), seguido da bebida 4 ( $3,85 \pm 1,06$ ), bebida 9 ( $3,58 \pm 1,02$ ), bebida 2 ( $3,46 \pm 1,07$ ) e da bebida 7 ( $3,41 \pm 0,89$ ).

**Tabela 4:** Índices de aceitabilidade (%) para as amostras de bebidas lácteas fermentadas com polpa de graviola e frutooligosacarídeo.

Bebida	Índice de Aceitabilidade (%)			
	Aroma	Sabor	Consistência	Aparência
2	86,46 <sup>a</sup>	85,45 <sup>ac</sup>	89,68 <sup>ab</sup>	90,67 <sup>ab</sup>
4	89,87 <sup>ac</sup>	89,07 <sup>ad</sup>	86,95 <sup>ac</sup>	85,19 <sup>ab</sup>
6	93,00 <sup>bc</sup>	92,47 <sup>bde</sup>	91,36 <sup>bc</sup>	90,74 <sup>a</sup>
7	91,53 <sup>ac</sup>	84,81 <sup>c</sup>	82,41 <sup>a</sup>	66,94 <sup>b</sup>
9	86,16 <sup>a</sup>	86,46 <sup>aec</sup>	66,93 <sup>a</sup>	83,86 <sup>ab</sup>

Considerando que o maior escore de aceitação foi identificado na formulação da bebida 06, esta foi submetida à avaliação da vida de prateleira. Evidenciou-se que houve decréscimo dos valores de pH e aumento da acidez no decorrer dos 28 dias de armazenamento, com importante gradiente de acidificação entre o 21º e o 28º dia (Tab. 5). Vale ressaltar que o pH final da bebida láctea fermentada com polpa de graviola mostrou-se semelhante à elaborada por Matos (2009), que sugere que diminuição do pH e o aumento da acidez são decorrentes do fenômeno de pós-acidificação.

O processo de pós-acidificação das bebidas lácteas fermentadas ocorre pela combinação da cultura *starter* com as bactérias probióticas, as quais mantêm-se ativas nas temperaturas de refrigeração e conseguem produzir pequenas quantidades de ácido lático por fermentação da lactose, resultando em perceptível diminuição do pH. Mas algumas cepas probióticas mostram sensibilidade à acidez, e este problema é agravado pela pós-acidificação no armazenamento, promovido pela  $\beta$ -galactosidase que ainda permanece ativa de 0°C a 5°C (Ballus et al., 2010; Soares et al., 2011). De acordo com Rodrigues et al. (2011) a suplementação do produto com frutooligosacarídeo e inulina não exerce influência global no fenômeno de pós-acidificação.

**Tabela 5:** Resultados das análises físico-química e microbiológicas durante 28 dias de armazenamento (4°C) da bebida láctea fermentada com polpa de graviola e frutooligossacarídeo.

PARÂMETROS	TEMPO DE ARMAZENAMENTO (DIAS)				
	0	7	14	21	28
<b>pH</b>	5,23±0,02	5,03±0,03	4,96±0,01	4,85±0,01	4,03±0,57
<b>Acidez titulável</b> (% em ácido lático)	0,61±0,01	0,83±0,02	1,05±0,01	1,08±0,01	1,20±0,02
<b>Bactérias lácticas totais</b> (logUFC/mL)	8,61±0,04	8,57±0,03	8,51±0,01	7,29±0,03	7,20±0,03
<b>Coliformes totais</b> (NMP/mL)	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0
<b>Coliformes termotolerantes</b> (NMP/mL)	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0
<b>Bolores e Leveduras</b> (UFC/mL)	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
<b>Estafilococos coagulase positiva</b> (UFC/mL)	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência

A qualidade higiênico-sanitária da bebida foi demonstrada pela ausência de micro-organismos indicadores de contaminação durante o período de vida de prateleira (Tab. 5). A viabilidade das bactérias lácticas totais na bebida mostrou-se eficiente, apesar de ter havido um decréscimo na contagem destas bactérias em um ciclo logarítmico. Contudo o número de micro-organismos viáveis manteve-se dentro dos níveis estabelecidos na legislação brasileira para bebidas lácteas fermentadas, a qual prevê a contagem total mínima de  $10^6$ UFC/g no produto final durante todo o prazo de validade (Brasil, 2005).

Diante destes resultados é relevante enfatizar que além das análises físico-químicas e microbiológicas, a análise sensorial também resultou numa importante ferramenta de qualidade para a bebida desenvolvida, visto que no planejamento de mistura, metodologia importante para o desenvolvimento e otimização de produtos alimentícios, as características de qualidade de um alimento normalmente dependerão das proporções dos ingredientes individuais que estão presentes nas formulações.

Por isso, vale ressaltar as afirmações de Moreira et al. (2010) de que a indústria de alimentos esforça-se continuamente para oferecer produtos novos e inovadores com o objetivo de satisfazer as necessidades do consumidor. Mas é imprescindível destacar ainda que o reaproveitamento do soro lácteo originário da produção de queijo de coalho é uma alternativa para aumentar a competitividade dos laticínios com o desenvolvimento de outros produtos, além de evitar os gastos adicionais do tratamento desse resíduo com alto poder poluente.

## CONCLUSÕES

A bebida com baixa concentração de leite em pó desnatado e alta concentração de soro lácteo possui boa aceitabilidade sensorial, ressaltando que a presença da polpa de graviola em maior proporção na mistura favorece sua aceitação quanto ao sabor e aroma, bem como suas características nutricionais e funcionais.

A manutenção das características da bebida durante a avaliação da vida de prateleira, principalmente das contagens das bactérias probióticas em níveis recomendados pela legislação brasileira vigente, viabiliza a sua produção e manutenção no mercado.

Considerando-se que a crescente demanda por produtos saudáveis e funcionais desafia o setor de alimentos e bebidas, a produção de uma bebida simbiótica com importante índice de aceitação deve ser considerada como mais uma alternativa viável para a utilização de soro lácteo residual da produção de queijo de coalho, visando minimizar o impacto ambiental negativo do seu descarte e os custos do tratamento adequado, bem como reduzir as perdas pós-colheita da graviola.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelos recursos financeiros e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelas bolsas de doutorado e iniciação científica concedidas.

## REFERÊNCIAS

- BALDISSERA, A.C.; DELLA BETTA, F.; PENNA, A.L.B.; et al. Alimentos funcionais: uma nova fronteira para o desenvolvimento de bebidas protéicas a base de soro de leite. *Semina ciênc. agrar.*, v. 32, n. 4, p. 1497-1512, 2011.
- BALLUS, C.A.; KLAJN, V.M.; CUNHA, M.F.; et al. Aspectos científicos e tecnológicos do emprego de culturas probióticas na elaboração de produtos lácteos fermentados: revisão. *Bol. Centro Pesqui. Process. Aliment.*, v. 28, n. 1, p. 85-96, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Resolução nº 5, de 13 de novembro de 2000. *Padrões de identidade e qualidade de leites fermentados*. Diário Oficial da União, Brasília, 27 nov. 2000.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. *Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea*. Diário Oficial da União, Brasília, 24 de ago. de 2005.

- CALDEIRA, L.A.; FERRÃO, S.P.B.; FERNANDES, S.A.A.; et al. Desenvolvimento de bebida láctea sabor morango utilizando diferentes níveis de iogurte e soro lácteo obtidos com leite de búfala. *Cienc. Rural*, v.40, n.10, p. 2193-2198, 2010.
- JELIČIĆ, I.; BOŽANIĆ, R.; TRATNIK, L. Whey-based beverages- a new generation of diary products. *Mljekarstvo*, v. 58, n. 3, p.257-274, 2008.
- KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v.44, p.329-347, 2008.
- LIMA, M.A.C.; ALVES, R.E.; FILGUEIRAS, H.A.C. Comportamento respiratório e amaciamento de graviola (*Annona muricata* L.) Após tratamentos pós-colheita com cera e 1-metilciclopropeno. *Ciênc. agrotec.*, v.34, n.1, p. 155-162, 2010.
- LUTCHMEDIAL, M.; RAMLAL, R.; BADRIE, N.; CHANG-YEN, I. Nutritional and sensory quality of stirred soursop (*Annona muricata* L.) yoghurt. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, v. 55, n. 5, p. 407-414, 2004.
- MATOS, R.A. *Desenvolvimento e mapa de preferência externo de bebida láctea à base de soro e polpa de graviola (Annona muricata)*. 2009. 79f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de processos de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga.
- MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. Sensory evaluation techniques. 3<sup>a</sup> ed. Boca Raton: CRC, 1999. 390p.
- MIGUEL, A.C.A. ; ALBERTINI, S.; BEGIATO, G.F.; et al.. Perfil sensorial e aceitação de melão amarelo minimamente processado submetido a tratamentos químicos. *Ciênc. Technol. Aliment.*, v.30, n.3, p. 589-598, 2010.
- MORALES, A.A. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Zaragoza. Acribia. 1994. 198p.
- MOREIRA, R.W.M. ; MADRONA, G.S. ; BRANGO, I.G. ; et al. Avaliação sensorial e reológica de uma bebida achocolatada elaborada a partir de extrato hidrossolúvel de soja e soro de queijo. *Acta Sci. Technol.*, v. 32, n. 4, p. 435-438, 2010.
- OFFICIAL methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry. 17.ed. Washington: AOAC, 2002. 1115p.
- RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOSA, T.A.P.; PEREIRA, C.I.; et al. The potential effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled milk matrices. *LWT - Food Sci. Technol.*, v. 44, n. 1, p. 100-108, 2011.

SILVA, L.M.R., LIMA, A.S., MAIA, G.A.; et al. Desenvolvimento de bebidas mistas à base de cajá (*Spondias mombin* L.) e caju (*Anacardium occidentale*) enriquecidas com frutooligossacarídeos e inulina. *Arch. Latinoam. Nutr.*, v. 61, n. 2, p. 209-215, 2011.

SOARES, D.S.; FAI, A.E.C.; OLIVEIRA, A.M.; et al. Aproveitamento de soro de queijo para produção de iogurte probiótico. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.4, p. 996-1002, 2011.

STONE, H.; SIDEL, J. L. Sensory evaluation practices. 3ª ed. New York: Academic Press. 2004. 408 p.

ZARE, F.; ORSAT, V; CHAMPAGNE, C.; et al. Microbial and Physical Properties of Probiotic Fermented Milk Supplemented with Lentil Flour. *J. Food Research*, v. 1, n. 1, p. 94-109, 2012.

## Considerações finais

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após análise dos resultados obtidos nesta tese pode-se tecer as seguintes considerações a respeito do tema estudado:

- *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* apresentam potencial probiótico pela resistência à bile e baixa sensibilidade ao ácido clorídrico.
- *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* apresentam atividade antagonista *in vitro* frente a micro-organismos patogênicos quando presentes no soro lácteo.
- Micro-organismos probióticos possuem potencial protetor ao soro lácteo fermentado frente a diferentes patógenos.
- Os carboidratos e as fibras alimentares presentes nas diferentes variedades de graviolas são os nutrientes que merecem destaque.
- Graviolas apresentam importante concentração de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante.
- A bebida láctea simbiótica com alta concentração do soro lácteo e da polpa de graviola apresenta bons atributos sensoriais e estabilidade ao armazenamento. A associação de componente lácteo e fonte frutífera favorece a aceitação da bebida láctea quanto às propriedades nutricionais e funcionais.
- O desenvolvimento da bebida láctea simbiótica viabiliza a utilização de soro residual e gera aplicabilidade industrial a graviola, além de possibilitar a inclusão de um alimento funcional na rotina alimentar dos consumidores.

# Referências

---

## 7. REFERÊNCIAS

AOAC - ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 17. ed., Maryland: Association Official Analytical Chemists, 2002.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30. 1995.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 de agosto de 2005.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Resolução nº 5, de 13 de novembro de 2000. Oficializa os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**, Brasília, 27 de novembro de 2000.

CALDERÓN, O.; PADILLA, C.; CHAVES, C.; VILLALOBOS, L.; ARIAS, M.L. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 57, n. 1, P. 51-55, 2007.

CASTRO, F.P.; CUNHA, T.M.; OGLIARI, P.J.; TEÓFILO, R.F.; FERREIRA, M.M.C.; PRUDÊNCIO, E.S. Influence of different content of cheese whey and oligofructose on the properties of fermented lactic beverages: Study using response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 5, p. 993-997, 2009.

CRUZ, A.G.; CADENA, R.S.; WALTER, E.H.M.; MORTAZAVIAN, A.M.; GRANATO, D.; FARIA, J.A.F.; BOLINI, H.M.A. Sensory Analysis: Relevance for Prebiotic, Probiotic, and Symbiotic Product Development. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, n. 4, p. 358-373, 2010.

DANI, C.; AGINONI, J.C.; CALLONI, C.; SALVADOR, M.; SPADA, P.D.S. Viabilidade celular de cultura de linfócitos tratados com *Annona muricata* L. **Ciência em Movimento**, n. 24, p.1-8, 2010. DHEWA, T.; PANT, S.; MISHRA, V. Development of freeze dried synbiotic

formulation using a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Food Science and Technology**, Online First™, 19 July 2011.

FUCHS, R.H.B.; TANAMATI, A.A.C.; ANTONIOLI, C.M.; GASPARELLO, E.A.; DONEDA, I. Utilização de *Lactobacillus casei* e cultura iniciadora na obtenção de iogurte suplementado com inulina e oligofrutose. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 24, n. 1, p. 83-98, 2006.

GORDILLO, J.C.; ORTIZ, D.; LARRAHONDO, J.E.; MEJÍA, M.S.; PACHÓN, H. Actividad antioxidante en guanábana (*Annona muricata* L.): una revisión bibliográfica. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 11, n. 2, p.111 -126, 2012.

GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F.; SHAH, N.P. Probiotic Dairy Products as Functional Foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, n. 5, p. 455-470, 2010.

HÜTT, P.; SHCHEPETOVA, J.; LÕIVUKENE, K.; KULLISAAR, T.; MIKELSAAR, M. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero and uropathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 6, p. 1324–1332, 2006.

IAL - NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 4ª ed., São Paulo, 2005.

LIVERA, A.V.S. Desenvolvimento e Maturidade Fisiológica da graviola (*Annona muricata* L.). 1992. 80f. Dissertação (Mestrado em Nutrição). Universidade Federal de Pernambuco, Recife,1992.

MAIA, O.B.; DUARTE, R.; SILVA, A.M.; CARA, D.C.; NICOLI, J.R. Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *typhimurium*. **Veterinary Microbiology**, v.70, p.183-189, 2001.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. Sensory evaluation techniques. 3ª ed. Boca Raton: CRC, 1999. 390p.

MOHAMMADI, R.; MORTAZAVIAN, A.M.; KHOSROKHAVAR, R.; CRUZ, A.G. Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. **Annals of Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 411-424, 2011.

MORALES, A.A. **La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica**. Zaragoza. Acribia. 1994. 198p

PRADO, F.C.; PARADA, J.L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**, v. 41, n. 2, p. 111-123, 2008.

RANADHEERA, R.D.C.S.; BAINES, S.K.; ADAMS, M.C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2010.

RÖNKÄ, E.; MALINEN, E.; SAARELA, M.; RINTA-KOSKI, M.; AARNIKAUNNAS, J.; PALVA, A. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. **International Journal of Food Microbiology**, v.83. p.63-74, 2003.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 270-276, 1998.

SILVA, L.M.R., LIMA, A.S., MAIA, G.A.; et al. Desenvolvimento de bebidas mistas à base de cajá (*Spondias mombin* L.) e caju (*Anacardium occidentale*) enriquecidas com frutooligossacarídeos e inulina. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 61, n. 2, p. 209-215, 2011.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**. 3. ed. New York: Academic Press. 2004. 408 p.

WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.1801-1812, 1999.

YAŞAR, B.; ABUT, E.; KAYADİBİ, H.; TOROS, B.; SEZİKLİ, M.; AKKAN, Z.; KESKİN, Ö.; ÖVÜNÇ KURDAŞ, O. Efficacy of probiotics in *Helicobacter pylori* eradication therapy. **The Turkish Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 3, p. 212-217, 2010.

# Apêndice

---

## APÊNDICE A: Modelo do termo de consentimento livre e esclarecido



**Universidade Federal de Pernambuco**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Nutrição**

Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE  
Fone: (81)21268470



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa “**Desenvolvimento de bebida fermentada de soro de leite e polpa de graviola com potencial simbiótico**”, no caso de você concordar em participar, favor assinar ao final do documento. Sua participação não é obrigatória, e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com a pesquisadora ou com a instituição.

**TÍTULO DA PESQUISA:** Desenvolvimento de bebida fermentada de soro de leite e polpa de graviola com potencial simbiótico.

**PESQUISADORA RESPONSÁVEL:** AMANDA DE MORAIS OLIVEIRA

**ENDEREÇO:** Rua Ana Camelo da Silva, nº154, Boa Viagem, Recife-PE. CEP:51.111-040

**TELEFONE:** (81) 9902-1956

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA:** CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UFPE

**ENDEREÇO:** Av. Prof. Moraes Rego s/n, 1º andar, Cidade universitária, Recife-PE. CEP:50670-901.

**TELEFONE:** (81) 21268588

**PESQUISADORES PARTICIPANTES:** Amanda de Moraes Oliveira; Tânia Lúcia Montenegro Stamford; Eriane de Castro Lima Machado.

**OBJETIVOS:** Desenvolver e avaliar uma bebida fermentada a partir do soro lácteo e polpa de graviola com característica simbiótica.

**PROCEDIMENTOS DO ESTUDO:** Os participantes deverão fazer uma avaliação da aparência global, cor, aroma, textura e sabor das bebidas lácteas fermentadas a base de soro de leite e polpa de graviola. As amostras dos produtos serão servidas, aos provadores, em cabines individuais iluminadas com luz branca, em copos descartáveis, aleatoriamente codificados, sob temperatura de refrigeração (5°C).

**RISCOS:** Baixo risco, quanto ao desconforto sensorial. Após a análise, o participante receberá água para aliviar o desconforto, caso haja.

**BENEFÍCIOS:** Será distribuído um folder informativo sobre os benefícios dos produtos simbióticos, além disso cada participante será informado durante a degustação das amostras sobre o potencial de qualidade e a importância de consumo de produtos funcionais tal como a bebida fermentada de soro de leite com potencial atividade simbiótica.

**CUSTO/REEMBOLSO PARA O PARTICIPANTE:** Os participantes de pesquisa não arcarão com nenhum gasto decorrente da sua participação. Além disso, os participantes da pesquisa não receberão qualquer espécie de gratificação devido à participação na pesquisa.

**CONFIDENCIALIDADE DA PESQUISA:** Garantimos que somente serão divulgados dados diretamente relacionados aos objetivos da pesquisa; e a privacidade dos sujeitos, quanto aos dados pessoais, serão confidenciais.

Eu, \_\_\_\_\_  
NOME DO ENTREVISTADO(A) RGI/ CPF

declaro que li as informações contidas nesse documento, fui devidamente informado(a) pela pesquisadora AMANDA DE MORAIS OLIVEIRA dos procedimentos que serão utilizados, riscos e desconfortos, benefícios, custo/reembolso dos participantes, confidencialidade da pesquisa, concordando ainda em participar da pesquisa. Foi-me garantido que posso retirar o consentimento a qualquer momento, sem que isso leve a qualquer penalidade. Declaro ainda que recebi uma cópia desse Termo de Consentimento.

**LOCAL:** \_\_\_\_\_ **DATA:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Assinatura do Pesquisador Responsável:** \_\_\_\_\_

**NOME E ASSINATURA DO VOLUNTÁRIO:**

\_\_\_\_\_  
NOME POR EXTENSO ASSINATURA

\_\_\_\_\_  
Testemunha 1 Testemunha 2

# Anexos

---

## ANEXO 1: Documentação de encaminhamento do artigo ao periódico



Ciência Rural

[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

SCHOLARONE™  
Manuscripts

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Amanda Oliveira

### Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Ciência Rural*.

Manuscript ID: CR-2012-0678

Title: Bebidas lácteas com soro de queijo e frutas: uma revisão

Authors: Oliveira, Amanda  
Machado, Erilane  
Stamford, Tânia Lúcia

Date Submitted: 15-Aug-2012

 Print  Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.9.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2012. All Rights Reserved.  
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

 Follow ScholarOne on Twitter

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

ANEXO 2: Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 332/2010 - CEP/CCS

Recife, 01 de dezembro de 2010

Registro do SISNEP FR – 379541

CAAE – 0401.0.172.000-10

Registro CEP/CCS/UFPE N.º 405/10

Título: **Desenvolvimento de bebida fermentada de soro de leite e polpa de graviola com potencial simbiótico.**

Pesquisador Responsável: Amanda de Moraes Oliveira

Senhor(a) Pesquisador(a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 01 de dezembro 2010.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente

  
Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto  
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

A  
Doutoranda Amanda de Moraes Oliveira  
Departamento de Nutrição- CCS/UFPE

ANEXO 3: Documentação de encaminhamento do artigo ao periódico

**FUNDAÇÃO ESTUDO PESQUISA EM MEDICINA VETERINÁRIA  
FEP MVZ EDITORA  
Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**

CNPJ: 16.629.388/0001-24 Insc. Municipal: 302856.001-3  
Av. Antônio Carlos, 6627 - Caixa Postal 567 - 30123-970 Belo Horizonte MG  
Fone: (31) 3409-2042 Fax: (31) 3409-2041  
<http://journal.vet.ufmg.br> E-mail: [abmvz.artigo@abmvz.org.br](mailto:abmvz.artigo@abmvz.org.br)

Sr.(s): Amanda de Moraes Oliveira, Eriane de Castro Lima Machado, Eduardo José Nepomuceno Montenegro, Tânia Lúcia Montenegro Stamford,

Cumpre-nos informar-lhe(s) que o artigo:

**Características sensoriais e estabilidade de bebida láctea simbiótica com sabor graviola.**

enviado para publicação nesta revista, será encaminhado para análise do Corpo Editorial desde que não haja manifestação contrária de qualquer autor do [trabalho](#) e que a taxa de submissão esteja quitada.

REG.: 6059/2012

Recebido em: 11/08/2012

Atenciosamente,

**Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**