



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIANA MORAES FREIXO

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO LEITELHO EM
PÓ E SUA APLICAÇÃO EM UMA BEBIDA FERMENTADA**

Londrina
2011

JULIANA MORAES FREIXO

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO LEITELHO EM
PÓ E SUA APLICAÇÃO EM UMA BEBIDA FERMENTADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, comorequisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos.

Orientador: Profa. Dra. Lúcia Helena da Silva Miglioranza

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F866c Freixo, Juliana Moraes.
Caracterização física e química do leite em pó e sua aplicação em
uma bebida fermentada/ Juliana Moraes Freixo. – Londrina, 2011.
119 f.: il.

Orientador: Lúcia Helena da Silva Miglioranza.
Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-
Graduação em Ciência de Alimentos, 2011.
Inclui bibliografia

1. Gordura do leite – Indústria – Teses. 2. Bebidas fermentadas –
Indústria – Teses. 3. Alimentos funcionais – Teses. 4. Soro do leite. –
Teses. 5. Lactobacilo – Teses. I. Miglioranza, Lúcia Helena da Silva. II.
Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa
de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 664:637.247

JULIANA MORAES FREIXO

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO LEITELHO EM PÓ E SUA
APLICAÇÃO EM UMA BEBIDA FERMENTADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora. Profa. Dra. Lúcia Helena da Silva
Miglioranza
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Lúcio Alberto Forti Antunes
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Marly Sayuri Katsuda
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 26 de agosto de 2011.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me proporcionado esta oportunidade, por ter me capacitado e pela Sua fidelidade em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais por terem apoiado as minhas decisões, pelos incentivos, ensinamentos e compreensão em mais essa etapa da minha vida.

À Profa. Dra. Lúcia Helena da Silva Miglioranza pela orientação e apoio na elaboração deste trabalho.

À empresa Confepar, na pessoa de Fabiano Cunha, pela gentil doação das amostras de leite em pó essenciais na realização deste trabalho.

À empresa Chr. Hansen, na pessoa do Dr. Lúcio Antunes, pela gentil doação das culturas e pelas sugestões e esclarecimentos via email.

À Capes pela concessão da bolsa de estudos.

Aos grandes amigos do Laboratório 758, Juliane, Rafael e Elisa, pela amizade, apoio, colaboração, compreensão e pelos divertimentos e descontrações.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina, pela possibilidade de execução deste trabalho.

Enfim, a todos aqueles que participaram de alguma maneira do trabalho ou da minha vida neste período, meu obrigada.

*“O temor do Senhor é o princípio da sabedoria
e o conhecimento do Santo é prudência”*

Provérbios 9:10

FREIXO, Juliana Moraes. **Caracterização física e química do leitelho em pó e sua aplicação em uma bebida fermentada**. 2011. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

Na produção da manteiga ocorre a bateção do creme, rompimento dos glóbulos de gordura e, conseqüente liberação da fase aquosa, denominada leitelho. No Brasil, este subproduto é geralmente descartado, sendo uma grande fonte de poluição ambiental. O leitelho contém todos os compostos hidrossolúveis do creme, sendo seu principal componente a membrana do glóbulo de gordura do leite (MGGL), que é composta principalmente de proteínas específicas e fosfolipídios. Este trabalho teve como objetivo estudar as características físico-químicas do leitelho em pó e aplicá-lo como ingrediente em uma bebida fermentada. Para caracterizar o leitelho em pó, realizaram-se análises de composição centesimal, determinação do pH, determinação da atividade de água, análises de DQO e DBO, perfil protéico e acompanhamento da vida de prateleira durante 10 meses de armazenamento. Para a aplicação do leitelho em pó em uma bebida fermentada, realizaram-se análises de crescimento do microrganismo probiótico, testes para aplicação de culturas lácticas, desenvolvimento de três formulações de bebida fermentada e análises físico-químicas e viabilidade dos microrganismos durante os 28 dias de armazenamento dessas bebidas. Um teste sensorial foi aplicado para verificar a aceitação das formulações desenvolvidas. Os dados obtidos neste estudo foram submetidos a análises estatísticas (valores médios com os respectivos desvios padrão, análise de variância e teste de Tukey). Os resultados demonstraram que o leitelho em pó possui composição média de 32,46% de proteínas, 6,32% de lipídios, 53,39% de lactose e 7,62 de cinzas, sendo estes valores dentro da faixa encontrada na literatura. A caracterização do perfil proteico demonstrou a presença de três grupos de proteínas: caseínas, proteínas do soro e proteínas da MGGL. As análises de DQO e DBO, 120.900 e 80.450 mg/L, respectivamente, demonstraram que o leitelho possui alta carga poluente. Durante o período de armazenamento do leitelho em pó, não foram observadas grandes alterações nos valores de pH, atividade de água e contagem de mesófilos, porém os valores de oxidação aumentaram com o tempo, principalmente após o 8º mês. A aplicação do leitelho em pó em uma bebida fermentada é uma alternativa viável, pois o leitelho reconstituído é um meio eficiente de crescimento de microrganismos. A bebida formulada com leitelho possui características de sinérese, pós-acidificação, viabilidade de microrganismos (lácticos e probiótico) semelhantes à bebida fermentada formulada com leite integral (controle). A análise sensorial demonstrou que a substituição, por leitelho, de parte do leite aplicado na formulação de uma bebida láctea fermentada é interessante, pois não altera o sabor, textura e aroma, podendo ser uma alternativa para o reaproveitamento deste subproduto e até redução do custo de produção.

Palavras-chave: Propriedades funcionais. Aproveitamento de resíduos. *Lactobacillus paracasei*. Teste de aceitação.

FREIXO, Juliana Moraes. **Buttermilk physical and chemical characterization and its application in a fermented beverage**. 2011. 119 p. Dissertation (Master in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

Buttermilk is the aqueous phase released by the cream churning during butter manufacture. In Brazil this byproduct is usually discarded becoming source of environmental pollution. Buttermilk contains all the water-soluble cream compounds, especially the material derived from milk fat globule membrane (MFGM), which contains mainly specific proteins and phospholipids. This work aimed the study of physical and chemical characteristics of buttermilk powder and its application as an ingredient of a fermented beverage. Chemical composition analysis, pH, water activity, DQO and DBO, protein profile and also a shelf life evaluation during 10 months storage were performed at buttermilk powder. For its application in a fermented beverage was performed analysis of the probiotic microorganism growth in buttermilk medium. Also were done tests for the application of lactic culture, development of three fermented beverage formulations and chemical analysis and viability of microorganisms during 28 storage days. Acceptance test was applied to evaluate the developed formulations. The results were subjected to statistical analysis (mean values with the respective standard deviations, analysis of variance and Tukey test) and indicated that buttermilk powder had 32.46% protein, 6.32% lipid, 53.39% lactose and 7.62 ash, mean values within the range found in the literature. The protein profile demonstrated the presence of three groups of proteins: casein, whey proteins and proteins of MGGL. The analyses of COD and BOD, 120,900 and 80,450 mg/L, respectively, showed that the buttermilk has high pollutant load. During buttermilk powder storage, it was not observed changes in pH, water activity and mesophilic count, however the oxidation values increased with time, especially after the 8th month. The use of buttermilk powder in a fermented beverage is a viable alternative, since reconstituted buttermilk is an efficient medium for microorganism growth. The beverage made with buttermilk was similar in syneresis analysis, post-acidification and microorganisms viability (lactic and probiotic) to the control beverage made with whole milk. The sensory analysis showed that is viable the replacement of part of the milk used in the formulation of a fermented milk with buttermilk, because it did not change the taste, texture and aroma. This could be an interesting alternative for the reuse of this by-product and even to reduce the production cost.

Key words: Functional properties. Waste recovery. *Lactobacillus paracasei*. Acceptance test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática para a formação, crescimento e secreção dos glóbulos de gordura.....	18
Figura 2 – Fluxograma do processo de obtenção do leite ácido e do leite doce.....	24
Figura 3 – Estrutura da membrana do glóbulo de gordura do leite.....	26
Figura 4 – Estrutura química dos principais fosfolipídios e esfingomiéline encontrados na MGGL	28
Figura 5 – Leite em pó fabricado por diferentes empresas: Fonterra (Nova Zelândia), Farmers (Canadá), Amalac (Filipinas).....	35
Figura 6 – Pães elaborados com diferentes concentrações de leite (foto (1): adição de 50% de leite; foto (2): adição de 100% de leite)	37
Figura 7 – Fluxograma de produção das bebidas fermentadas.....	56
Figura 8 – Perfil proteico do leite em pó obtido por SDS-PAGE (13% de poliácridamida). XO: xantina oxidase; BTN: butirifilina; PAS 6/7: ácido periódico de Schiff 6/7	63
Figura 9 – (a) Colônias de <i>L. paracasei</i> em meio MRS com vancomicina. (b) Visão microscópica da lâmina contendo células de <i>L. paracasei</i> , após coloração de Gram	84
Figura 10 – (a) Colônias de <i>S. thermophilus</i> em meio M17. (b) Visão microscópica da lâmina contendo células de <i>S. thermophilus</i> , após coloração de Gram	84
Figura 11 – Visão microscópica da lâmina contendo células de <i>L. bulgaricus</i> , após coloração de Gram	85
Figura 12 – Fotos dos frascos contendo a Formulação 1 (100% leite), Formulação 2 (100% leite) e Formulação 3 (33% leite, 33% leite, 33% soro de leite).....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classes de lipídios e porcentagens presentes no leite.....	16
Tabela 2 – Conteúdo de fosfolipídios e sua distribuição na MGGL e no leite integral	29
Tabela 3 – Estudos sobre as propriedades benéficas da membrana do glóbulo de gordura do leite (MGGL) a saúde	31
Tabela 4 – Produtos encontrados em supermercados no país e que contém leite em sua formulação.....	42
Tabela 5 – Composição proximal do leite em pó.....	60
Tabela 6 – Comparação da média dos valores da composição proximal obtidos com valores encontrados na literatura.....	61
Tabela 7 – Valores do pH e atividade de água do leite	62
Tabela 8 – Valores obtidos de fósforo, lipídios e fosfolipídios das amostras de leite em pó	64
Tabela 9 – Conteúdo de lipídios polares em diferentes produtos lácteos	65
Tabela 10 – Valores de DBO e DQO de produtos lácteos	66
Tabela 11 – Velocidade específica máxima de crescimento e tempo de geração do <i>L. paracasei</i> nos diferentes meios de fermentação	75
Tabela 12 – Média das análises de sinérese e acidez das bebidas fermentadas com as culturas YF-L904 e YF-L812.....	79
Tabela 13 – Contagem média (log UFC mL ⁻¹) das células viáveis de <i>S. thermophilus</i> nas diferentes formulações.....	87
Tabela 14 – Contagem média (log UFC mL ⁻¹) das células viáveis de <i>L. paracasei</i> nas diferentes formulações.....	88
Tabela 15 – Susceptibilidade a sinérese das três Formulações durante o período de armazenamento	89
Tabela 16 – Desenvolvimento da acidez, em % ácido láctico, durante o período de armazenamento a 5 °C	91

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Valores da oxidação (g de malonaldeído) do leite em pó durante o tempo de estocagem a 25 °C.....	69
Gráfico 2 – Curva de crescimento e acidificação de <i>L. paracasei</i> no meio constituído de leite em pó.....	74
Gráfico 3 – Curva de crescimento e acidificação de <i>L. paracasei</i> no meio constituído de leite desnatado.....	74
Gráfico 4 – Curva de crescimento e acidificação de <i>L. paracasei</i> no meio constituído de soro de leite	75
Gráfico 5 – Curva de acidificação das culturas YF-L812 e YF-L904 durante fermentação a 42°C	78
Gráfico 6 – Comparação da susceptibilidade à sinérese das bebidas fermentadas com YF-L812 e YF-L904 durante o período de armazenamento à 5 °C	81
Gráfico 7 – Resultados da capacidade de retenção de água (CRA) e viscosidade das bebidas fermentadas com YF-L812 e YF-L904	82
Gráfico 8 – Susceptibilidade a sinérese das três formulações durante o período de estocagem refrigerado	90
Gráfico 9 – Desenvolvimento da acidez, em % ácido láctico, durante o período de armazenamento à 5 °C	92
Gráfico 10 – Média das notas atribuídas pelos provadores para os atributos de sabor, textura, aroma e avaliação global, das diferentes formulações. Sendo Formulação 1, 100% de leite, Formulação 2, 100% de leite em pó e Formulação 3, 33% de leite, 33% de leite em pó e 33% de soro.....	95

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	OS LIPÍDIOS DO LEITE E A SÍNTESE DOS GLÓBULOS DE GORDURA	15
2.2	FABRICAÇÃO DA MANTEIGA E OBTENÇÃO DO LEITELHO	19
2.3	MEMBRANA DO GLÓBULO DE GORDURA DO LEITE (MGGL)	25
2.3.1	Composição Lipídica da MGGL	27
2.3.2	Composição Proteica da MGGL	29
2.3.3	Benefícios a Saúde Promovidos por Componentes da MGGL	31
2.4	LEITELHO E SUAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS	33
2.4.1	Aplicação do Leitelho em Alimentos	34
2.4.2	Propriedades Funcionais do Leitelho	39
2.4.3	Leitelho como Fonte para Extração de Componentes Funcionais	40
2.4.4	Aplicações Comerciais do Leitelho no Brasil	41
3	OBJETIVOS	45
3.1	OBJETIVO GERAL	45
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1	MATÉRIAS-PRIMAS	46
4.1.1	Leitelho em pó	46
4.1.2	Culturas	46
4.1.3	Outros Ingredientes	46
4.2	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITELHO EM PÓ	47
4.2.1	Composição Proximal	47
4.2.2	Determinação do pH	47
4.2.3	Determinação da Atividade de Água	47
4.2.4	Determinação do Perfil Protéico	47
4.2.4.1	Preparo do tampão	47
4.2.4.2	Preparo da amostra e corrida eletroforética	48
4.2.5	Determinação de Fosfolipídios	48

4.2.6	Determinação do Potencial Poluente	49
4.2.7	Acompanhamento Durante o Armazenamento	49
4.2.7.1	Oxidação lipídica	49
4.2.7.2	Análise do pH	50
4.2.7.3	Contagem de mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis	50
4.3	ESTUDO DA APLICAÇÃO DO LEITELHO EM PÓ EM UMA BEBIDA FERMENTADA	50
4.3.1	Preparo dos Inóculos	50
4.3.2	Análises Físico-Químicas	51
4.3.2.1	Acidez titulável.....	51
4.3.2.2	Susceptibilidade à sinérese	52
4.3.2.3	Capacidade de retenção de água.....	52
4.3.2.4	Viscosidade	53
4.3.3	Comparação do Crescimento de <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> em Diferentes Meios	53
4.3.4	Estudo e Comparação das Culturas Yo-flex®	54
4.3.5	Desenvolvimento da Bebida Fermentada	55
4.3.5.1	Determinação das formulações	55
4.3.5.2	Preparo das bebidas.....	55
4.3.5.3	Contagem e diferenciação dos microrganismos incorporados à bebida fermentada.....	57
4.3.5.4	Vida-de-prateleira das bebidas fermentadas	58
4.4	ANÁLISE SENSORIAL	58
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LEITELHO EM PÓ	60
5.1.1	Composição Proximal	60
5.1.2	Análises de pH e Atividade de Água	62
5.1.3	Caracterização do Perfil Protéico	63
5.1.4	Concentração de Fosfolipídios Totais	64
5.1.5	Potencial Poluente do Leite	66
5.1.6	Acompanhamento Durante o Armazenamento	68
5.1.6.1	Oxidação	68

5.1.6.2	Valores de pH e atividade de água.....	72
5.1.6.3	Contagem de aeróbios mesófilos	72
5.2	APLICAÇÃO DO LEITELHO EM PÓ EM UMA BEBIDA FERMENTADA	72
5.2.1	Curva de Crescimento e Acidificação de <i>L. casei</i> em Diferentes Meios	73
5.2.2	Comparativo entre as Características das Culturas Yoflex®	77
5.2.3	Diferenciação dos Microrganismos Incorporados à Bebida Fermentada	83
5.2.4	Análises no Período de Armazenamento das Bebidas Fermentadas	86
5.2.4.1	Contagem dos microrganismos	86
5.2.4.2	Pós-acidificação e susceptibilidade à sinérese.....	89
5.2.4.3	Extrato seco total e extrato seco desengordurado.....	92
5.3	ANÁLISE SENSORIAL.....	93
5.3.1	Parâmetros Microbiológicos.....	93
5.3.2	Teste de Aceitação	94
5.3.3	Intenção de Compra	97
6	CONCLUSÕES	99
7	PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	101
	REFERÊNCIAS.....	102
	APÊNDICE – Ficha da análise sensorial.....	114
	ANEXOS	115
	ANEXO 1 – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética	115
	ANEXO 2 – Ficha de recrutamento de provadores para teste de aceitação e termo de consentimento livre e esclarecido	116
	ANEXO 3 – Resultados das análises de DBO e DQO (Laboratório São Camilo, divisão Alimentos e Água).....	119

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um importante produtor mundial de leite e sua produção vem apresentando crescimento contínuo. Porém, além de seus principais produtos, essa indústria gera uma grande quantidade de resíduos, em que alguns podem ser considerados subprodutos. Nas últimas décadas, houve novas aplicações para estes subprodutos da indústria láctea que foram viabilizadas com o desenvolvimento e/ou aperfeiçoamento de tecnologias emergentes e por trabalhos científicos envolvendo este tema.

A produção da manteiga é um setor importante dentro da indústria de lácteos, sendo o leitelho o principal subproduto dessa indústria. A manteiga é produzida a partir da bateção do creme, onde ocorre o rompimento dos glóbulos de gordura e a inversão de fases (transformação da emulsão de gordura em água, para emulsão de água em gordura). A fase aquosa liberada durante a bateção é denominada leitelho (ou soro da manteiga) e, este contém todos os componentes do creme que são solúveis em água, como proteínas, lactose e minerais, além de conter material derivado da membrana do glóbulo de gordura do leite (MGGL).

As ações para a preservação do meio ambiente pelas indústrias de lácteos ainda necessitam de mudanças e inovações. Inúmeros laticínios ainda não implantaram sistemas que contribuem para a sustentabilidade e minimização do impacto ambiental. No Brasil, o leitelho é geralmente descartado e, neste caso, é uma grande fonte de poluição ambiental. Entretanto, a utilização de leitelho em pó como ingrediente pode aumentar o valor econômico deste subproduto, além de reduzir o custo com o tratamento do resíduo industrial.

O leitelho pode ser utilizado como ingrediente funcional em vários produtos alimentícios, tais como pães, iogurtes, chocolates, sopas, molhos, sorvetes, queijos. O seu uso pode contribuir para o melhoramento da textura, sabor, aroma e capacidade emulsificante.

A composição do leitelho é semelhante ao leite desnatado, no entanto, o leitelho contém maior quantidade de lipídeos e de componentes da membrana do glóbulo de gordura do leite. A MGGL é constituída principalmente por proteínas e fosfolipídios, sendo os principais fosfolipídios, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomiéline, fosfatidilinositol e fosfatidilserina. Diversas pesquisas demonstram que esses componentes da MGGL podem promover efeitos

benéficos à saúde, podendo ajudar na prevenção do aparecimento do câncer, controlar o crescimento de células cancerígenas, agir como redutor de colesterolemia, agente contra patógenos gastrointestinais, carreadores de vitaminas, entre outros.

O conhecimento sobre o leiteiro e a MGGL tem crescido significativamente nos últimos anos, devido ao emprego de técnicas analíticas mais sofisticadas. Devido à sua composição e propriedades únicas, o leiteiro possui um grande potencial de aplicação como ingrediente funcional, além da vantagem econômica de ser uma matéria-prima de baixo custo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 OS LIPÍDIOS DO LEITE E A SÍNTESE DOS GLÓBULOS DE GORDURA

O leite é a secreção produzida pela glândula mamária de mamíferos, essencialmente para atender todos os requisitos nutricionais do recém-nascido, como a energia, aminoácidos e ácidos graxos essenciais, vitaminas, minerais e água. O leite é uma fonte efetiva e balanceada de lipídios, proteínas, carboidratos, minerais, enzimas, vitaminas e elementos traço (TAMIME, 2009).

A composição do leite varia grandemente entre as espécies e, em menor intensidade, dentro da mesma espécie animal. O leite bovino apresenta cerca de 87,1% de água (85,3-88,7%), 4,0% de gordura (2,5-5,5%), 3,25% de proteína (2,3-4,4%), 4,6% de lactose (3,8-5,3%) e 0,7% de minerais (0,57-0,83%). Essa proporção entre os componentes do leite é afetada por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos, incluindo, dentre outros, fatores genéticos, saúde do animal, alimentação, manejo e época de lactação (WALSTRA et al., 2006).

Os lipídeos do leite são a maior fonte de energia e componentes estruturais essenciais para as membranas celulares do recém-nascido de todas as espécies de mamíferos (FOX, 1995). Na prática os lipídios do leite são de grande importância, pois conferem propriedades nutricionais, de textura e sensoriais distintas em produtos lácteos, como creme, manteiga, leite em pó, queijo, iogurte, entre outros (FOX e McSWEENEY 2006).

Os lipídios podem ser definidos como ésteres de ácidos graxos e compostos a estes relacionados que são solúveis em solventes orgânicos apolares e (ligeiramente) insolúveis em água. Podem ser divididos em três grupos: lipídios neutros (tri-, di- e monoacilgliceróis), lipídios polares (fosfolipídios e glicolipídios) e lipídios derivados (esteróis, carotenóides e vitaminas) (TAMIME, 2009).

As funções biológicas dos lipídios são tão diversas quanto as suas funções químicas. Em muitos organismos, gorduras e óleos são as principais formas de armazenamento de energia. Fosfolipídios e esteróis são os principais elementos estruturais de membranas biológicas. Outros lipídios, mesmo quando presentes em quantidades relativamente pequenas têm papéis cruciais como co-fatores enzimáticos, transportadores de elétrons, pigmentos que absorvem radiações

luminosas, âncoras hidrofóbicas, agentes emulsificantes, hormônios e mensageiros intracelulares (NELSON e COX, 2000).

A composição e estrutura dos lipídios do leite têm sido muito estudadas por diversos pesquisadores. Os lipídeos do leite bovino são compostos por grande quantidade de triacilgliceróis; no entanto, também estão presentes pequenas quantidades de diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, fosfolipídios e esteróis (Tabela 1). São encontradas ainda, no leite bovino, quantidades traço de vitaminas lipossolúveis, β -caroteno e compostos saborizantes lipossolúveis (FOX e McSWEENEY, 2006).

Tabela 1 – Classes de lipídios e porcentagens presentes no leite

LIPÍDIOS DO LEITE	
Classes de lipídios	Porcentagem na gordura do leite (p/p)
Glicerídeos neutros:	98,7
Triglicerídeos	98,3
Diglicerídeos	0,3
Monoglicerídeos	0,03
Ácidos graxos livres	0,1
Fosfolipídios:	0,8
Fosfatidilcolina	0,27
Fosfatidiletanolamina	0,26
Fosfatidilserina	0,03
Fosfatidilinositol	0,04
Esfingomielina	0,20
Cerebrosídeos	0,1
Gangliosídeos	0,01
Esteróis:	0,32
Colesterol	0,30
Ésteres de colesterol	0,027
Carotenóides + vitamina A	0,002

Fonte: WALSTRA et al. (2006).

Devido à grande quantidade, mais de 98% do total de lipídios, os triacilgliceróis têm um efeito maior e mais direto nas propriedades da gordura do

leite, como por exemplo, hidrofobicidade, densidade e características de fusão. Os fosfolipídios representam apenas 0,8% dos lipídeos do leite e são importantes devido às suas propriedades anfífilas. Aproximadamente 65% são encontrados na membrana do glóbulo de gordura do leite (MGGL), sendo o restante encontrado na fase aquosa (FOX e McSWEENEY, 2006).

Quanto à estrutura, os lipídios estão presentes no leite na forma de glóbulos, que variam aproximadamente de 0,2 a 15 μ m de diâmetro. Cada glóbulo de gordura é envolto por uma membrana, que tem a função de impedir a coalescência dos glóbulos (WALSTRA et al., 1999) e impedir a ação de enzimas lipolíticas nativas do leite sobre os lipídios contidos no seu interior (COSTA et al., 2009). O leite contém mais de 10^{10} glóbulos de lipídio mL⁻¹, onde 80% possui um diâmetro menor que 1 μ m. No entanto, esses pequenos glóbulos compreendem apenas cerca de 3% da massa total dos lipídios do leite. A maior parte (> 90%) são glóbulos com diâmetro que varia entre 1 e 10 μ m, com uma pequena proporção de glóbulos com diâmetro maior que 10 μ m (TAMIME, 2009).

Essa variação no diâmetro das partículas resulta em diferentes proporções entre triglicerídios e fosfolipídios no glóbulo de gordura, já que quanto menor o seu tamanho, maior será a quantidade de membrana em relação à quantidade de lipídios presente no interior do glóbulo. A distribuição de diâmetro dos glóbulos de gordura no leite é influenciada pelas condições fisiológicas, como estágio de lactação e pelo tipo de alimentação e condição nutricional do animal. Porém, o exato mecanismo intracelular que governa essa distribuição de tamanho ainda não foi estabelecido (COSTA et al., 2009).

O tamanho do glóbulo de gordura pode ser alterado consideravelmente por diversos tratamentos, principalmente a homogeneização. O tamanho dos glóbulos obtidos depende do tipo de equipamento e condições durante o processo de homogeneização, especialmente à pressão aplicada (FOX, 1995).

Os lipídios são processados no retículo endoplasmático rugoso, o qual libera gotículas compostas principalmente por triglicerídios. Estas são liberadas no citoplasma envoltas por uma camada de proteínas e de lipídios polares derivados da membrana do retículo endoplasmático. Glóbulos de todos os tamanhos são transportados unidirecionalmente para a membrana apical da célula epitelial, provavelmente por mecanismos que envolvem o citoesqueleto celular. Nesse

caminho no citoplasma, algumas gotículas se fundem e aumentam de tamanho antes de serem liberadas para o lúmen alveolar enquanto muitas outras são liberadas praticamente sem alteração de tamanho (Figura 1) (COSTA et al., 2009).

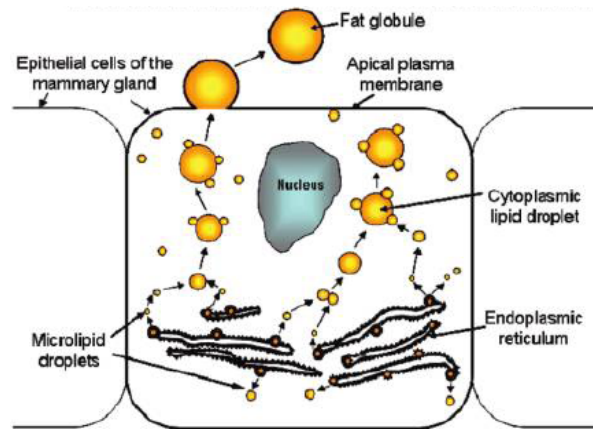


Figura 1 – Representação esquemática para a formação, crescimento e secreção dos glóbulos de gordura. Fonte: Lopez et al., 2008.

As células epiteliais mamárias possuem um elevado nível de organização e uma habilidade em converter nutrientes que estão circulando na corrente sanguínea em componentes do leite. Há mais de 300 anos, Van Leeuwenhoek foi o primeiro a observar as gotículas de lipídio do leite em microscópio óptico. Em meados do século 19, Ascherson descreveu a primeira evidência da presença de uma membrana na superfície dessas gotículas. Recentemente importantes descobertas têm sido feitas em decorrência do desenvolvimento de técnicas modernas como a microscopia eletrônica, técnicas de clonagem bioquímicas e moleculares e tecnologias de gene alvo (gene dominante). Com a aplicação dessas técnicas ocorreu um rápido progresso na identificação das proteínas da membrana do glóbulo de gordura do leite, além de surgirem evidências de sua função na secreção de lipídeos (BAUMAN et al., 2006).

As proteínas da membrana do glóbulo de gordura apresentam grande influência na síntese de lipídios do leite. Este fato foi comprovado a partir de estudos genéticos em ratos, onde foram substituídos genes responsáveis pela codificação das proteínas da MGGL, xantino desidrogenase/oxidase (XDH/XO) e butirofilina (BTN). Observou-se que a secreção de lipídeos pela glândula mamária foi desregulada, enorme quantidade de triglicerídeos se acumulou no citoplasma das

células secretoras e grandes gotas saíram da célula sem apresentarem uma membrana externa, formando agregados de gordura na glândula mamária. Esses resultados sugerem a importância dessas proteínas na secreção lipídica e foi proposto que a BTN, integrante da membrana celular apical, se liga à XDH/XO para envolver as gotas lipídicas intracelulares com a membrana plasmática (COSTA, 2008).

Ao longo dos últimos 25 anos, mais progressos foram obtidos na descoberta dos mecanismos envolvidos na formação e secreção dos lipídios do leite e a composição das proteínas da MGGL. O entendimento desses mecanismos de secreção e o papel da MGGL na estabilização dos glóbulos de gordura após sua secreção é de extrema importância na indústria processadora de leite. Isto devido à influência que a natureza da fração lipídica exerce na produção e qualidade sensorial do leite ou produtos lácteos (BAUMAN et al., 2006).

2.2 FABRICAÇÃO DA MANTEIGA E OBTENÇÃO DO LEITELHO

A legislação define a manteiga como o produto gorduroso obtido exclusivamente pela bateção e malaxagem, com ou sem modificação biológica de creme pasteurizado derivado exclusivamente do leite de vaca. A matéria gorda da manteiga deverá estar composta exclusivamente de gordura láctea, sendo seu conteúdo mínimo de gordura de 82% (m/m) e no caso da manteiga salgada não poderá ser inferior a 80% (BRASIL, 1996). Pereda et al. (2005), definem a manteiga como sendo uma emulsão do tipo água/gordura, na qual a fase contínua ou dispersante é constituída por gordura livre, onde encontram-se dispersos glóbulos de gordura cristalizados e gotículas de leiteiro mais ou menos diluída pela água de lavagem. Segundo Spreer (1991), a manteiga é uma emulsão plástica de água em gordura obtida por procedimentos mecânicos.

Keenan e Patton (1995), afirmam que possivelmente a primeira produção de manteiga aconteceu por acidente a milhares de anos atrás, quando um animal de carga transportava um recipiente contendo leite. Com a agitação constante durante o trajeto o leite se transformou em manteiga.

Segundo dados da FAO, a produção de manteiga e manteiga clarificada no Brasil foi de 87.800 toneladas em 2009. Quanto à produção de leiteiro não há dados registrados. Nos EUA a produção de manteiga no mesmo ano foi bem

superior, 713.597 toneladas, sendo a produção de leite/leite desnatado em pó de 818.800 toneladas (FAO, 2011).

Na fabricação da manteiga obtém-se primeiramente o creme, por meio do desnate do leite, que é a operação pela qual a gordura do leite é separada dos demais componentes pela aplicação da força centrífuga. O leite integral é centrifugado em temperatura de 40-50 °C até concentração de 36-42% de gordura para o processo contínuo e 25-35% de gordura para o processo por batelada. A temperatura baixa dificulta a separação dos glóbulos devido a menor viscosidade (BEHMER, 1982; GUNSTONE e PADLEY, 1997). Segundo Tamime (2009), a temperatura ótima de separação é de 63 °C, sendo que temperaturas elevadas podem levar a desnaturação das proteínas do soro, prejudicando as propriedades do leite desnatado.

Após a obtenção do creme pelo processo de desnate, procede-se a pasteurização. A pasteurização do creme é importante devido a diversos fatores, como: destruição dos microrganismos patogênicos e microrganismos prejudiciais tecnologicamente (bactérias, leveduras e mofos); inativação de enzimas proteolíticas e lipolíticas que além de decomporem as proteínas e lipídios, podem provocar oxidação da manteiga; ligeira diminuição da viscosidade do creme, para facilitar o tratamento do mesmo. A temperatura de pasteurização pode variar entre 95 a 110°C. Estas temperaturas são relativamente elevadas se comparadas com a pasteurização do leite, porém são necessárias, pois os microrganismos se encontram protegidos pela camada de gordura, aumentando sua resistência ao calor (SPREER, 1991).

Tratamentos térmicos severos ao creme devem ser evitados, tanto para minimizar a formação de sabor de cozido, como para minimizar a absorção do cobre na membrana do glóbulo de gordura. O cobre é um pró-oxidante muito potente ao nível de 10 ppb (TAMIME, 2009).

Após o processo de pasteurização o creme é resfriado. No resfriamento é onde começa o processo de maturação. A gordura que estava liquefeita pelo efeito do calor se cristaliza, segundo o método de resfriamento. A refrigeração rápida do creme favorece a formação de cristais pequenos e em um resfriamento lento, a formação de cristais maiores (AMIOT, 1991).

Nesta etapa, o creme pode ser destinado a dois tipos de processos, a maturação sem acidificação e a maturação com acidificação. Portanto, a manteiga

pode ser dividida em duas categorias principais: manteiga de creme doce, onde para sua obtenção utiliza-se um creme sem prévia acidificação, e manteiga de creme ácido (ou manteiga maturada), onde o creme é acidificado por crescimento microbiano antes de sua produção (PEREDA et al., 2005).

No caso da produção da manteiga maturada, deve-se adicionar o fermento láctico ao creme após o resfriamento. Para a maturação do creme utilizam-se algumas culturas de microrganismos, entre elas, *Lactococcus lactis*, *L. cremoris*, *L. cremoris* subsp. *diactylactis* e *Leuconostoc cremoris*, que produzem acidez e sabor característicos. O diacetil é o principal componente do sabor do creme maturado, porém um grande número de outros compostos também contribuem sensorialmente, podendo ocorrer uma interação sinérgica (ROBINSON, 1986).

O uso do creme maturado produz um maior rendimento do processo de fabricação da manteiga, porque os glóbulos gordurosos se unem mais rapidamente durante a bateção. Têm-se como fatores principais para esta particularidade a maior concentração dos íons de hidrogênio e a precipitação prévia da caseína (BEHMER, 1982). O creme ácido é mais sensível à oxidação, já que, no processo, os íons metálicos são arrastados com a gordura, enquanto que, no creme doce, os íons são transportados com o leiteiro (PEREDA et al., 2005).

Para obtenção da manteiga de creme doce, o creme deve ser refrigerado durante o tempo suficiente para se obter uma relação ótima entre a gordura solidificada e a gordura líquida. Este processo deve ser mais longo no verão do que no inverno, visto que nesta época do ano a proporção dos ácidos graxos insaturados de baixo ponto de fusão é maior. Em geral o creme é resfriado a 7-10 °C no verão e de 10 a 12,5 °C no inverno, em tempo mínimo de 3 a 4 horas (AMIOT, 1991).

Com a redução da temperatura ocorre a alteração do equilíbrio da dissolução, provocando uma supersaturação. Primeiro são formados pequenos cristais (sementes de cristalização) que vão aumentando de tamanho. Com a cristalização da gordura há uma redução do volume dos glóbulos de gordura, com a diminuição das forças de tensão superficial entre a membrana e a fase aquosa (interior) (SPREER, 1991).

Os glóbulos presentes no creme após a maturação contém tanto gordura cristalizada como gordura líquida. Os cristais de gordura dispõem-se na superfície do glóbulo formando uma cobertura que será tanto mais rígida quanto

maior for sua espessura, e depende da composição da gordura (grau de saturação e extensão da cadeia dos ácidos graxos integrantes) e do processo de cristalização (PEREDA et al., 2005). Segundo Robinson (1986), os cristais tornam os glóbulos menos elásticos, facilitando a ruptura da membrana quando o glóbulo é submetido à força mecânica.

O processo de fabricação da manteiga, tanto em batelada como em processo contínuo, consiste nas seguintes fases: preparação do creme (com maturação ou sem maturação), desestabilização e quebra da emulsão O/A (óleo em água), agregação e concentração das partículas de gordura, formação da emulsão estável A/O (água em óleo), embalagem, armazenamento e distribuição (ROBINSON, 1986).

O processo contínuo de fabricação da manteiga foi criado em 1939, pelo Dr. Willi Fritz, técnico de máquinas de laticínios de Freising, Weihenstephan, Alemanha. Em 1942 diversas instalações comerciais estavam em atividade, chegando a ter 40 fábricas, que utilizavam esse processo (BEHMER, 1982). Nos últimos 50 anos, o método de Fritz de produção contínua da manteiga tornou-se a tecnologia dominante, pelo menos na Europa Ocidental. O método Fritz apresenta etapas similares ao processo tradicional de produção por batelada, porém com uma maior capacidade de produção e controle de processo (TAMIME, 2009). A principal vantagem do processo contínuo é a sua capacidade de produção, alguns modelos podem fabricar até 5.000Kg por hora. O rendimento obtido é ligeiramente superior no processo contínuo se comparado com o processo de batelada (AMIOT, 1991).

Uma vez determinado o tipo de creme a ser processado, este é transferido para o equipamento, onde ocorrerá o rompimento dos glóbulos de gordura sob condições controladas, a fim de desestabilizar a emulsão e proporcionar a aglomeração da gordura do leite (ROBINSON, 1986). Segundo Pereda et al. (2005), o creme ácido pode ser batido mais rapidamente que o creme doce, já que a membrana do glóbulo de gordura está parcialmente desnaturada, o que a torna menos hidrófila. Já o creme doce deve ser batido por mais tempo para se obter os mesmos resultados. Em geral, utiliza-se o creme com conteúdo de gordura entre 30 e 40%. Para cremes com quantidades maiores a batidura se torna mais difícil, pois o creme se encontra mais viscoso e, se o conteúdo for muito baixo, será necessário volume maior para obter o mesmo rendimento, além de ocorrer maiores perdas de gordura para o leiteiro.

O processo de fabricação da manteiga consiste na transformação do creme em grãos de manteiga e leiteiro, através de uma agitação vigorosa e pela incorporação de ar ao creme. No começo da bateção, o ar é incorporado ao creme e as proteínas (lactoglobulina, lactoalbumina e caseína) são atraídas para a interface gás-líquido, formando uma espuma instável (GUNSTONE e PADLEY, 1997).

Ao mesmo tempo a força mecânica aplicada no processo gera colisões entre os glóbulos de gordura resultando na ruptura da membrana e dispersão da gordura líquida no meio. Esta gordura dispersa é hidrofóbica e no decorrer do processo irá se associar com a gordura liberada por outros glóbulos de gordura rompidos. Esta gordura associada migra para a interface gás-líquido das bolhas de ar e desloca as proteínas da interface, ocasionando o aumento da taxa de coalescência das bolhas. Essas bolhas grandes são menos estáveis na suspensão, e acabam deixando o creme, de forma que os glóbulos de gordura danificados são liberados como aglomerados de gordura e podem aprisionar glóbulos de gordura intactos na matriz (TAMIME, 2009).

Uma vez formados os grãos de manteiga, separam-se duas fases: uma gordurosa (manteiga) e uma aquosa (leiteiro). O processo de separação dessas fases realiza-se mediante um dispositivo de drenagem que, como um crivo ou peneira, retém os grãos enquanto o leiteiro o atravessa e é despejado em um circuito complementar. Em termos gerais, pode-se dizer que quanto maiores sejam os grânulos e maior seja a quantidade de leiteiro, maior será o conteúdo em extrato seco desengordurado da manteiga (PEREDA et al., 2005).

Ao final do processo o leiteiro é drenado e a manteiga é lavada com água fria (4 a 8 °C), de forma a reduzir o conteúdo de sólidos do leiteiro. Esses processos são controlados para que a umidade final da manteiga esteja de acordo com os parâmetros estabelecidos (GUNSTONE e PADLEY, 1997). O leiteiro obtido contém uma composição que consiste da dispersão de gotículas de gordura, presença da membrana do glóbulo de gordura e cerca de 0,5 g de gordura 100 g⁻¹ como uma dispersão coloidal (TAMIME, 2009).

Grande parte da membrana, porém não toda, migra para o leiteiro. A membrana ainda é mantida por alguns dos glóbulos de gordura na manteiga, contribuindo para a incorporação de umidade durante o processamento e a criação de um produto com característica sensorial suave (KEENAN e PATTON, 1995).

Na Figura 2 está demonstrado o fluxograma do processo para obtenção do leite doce e do leite ácido.

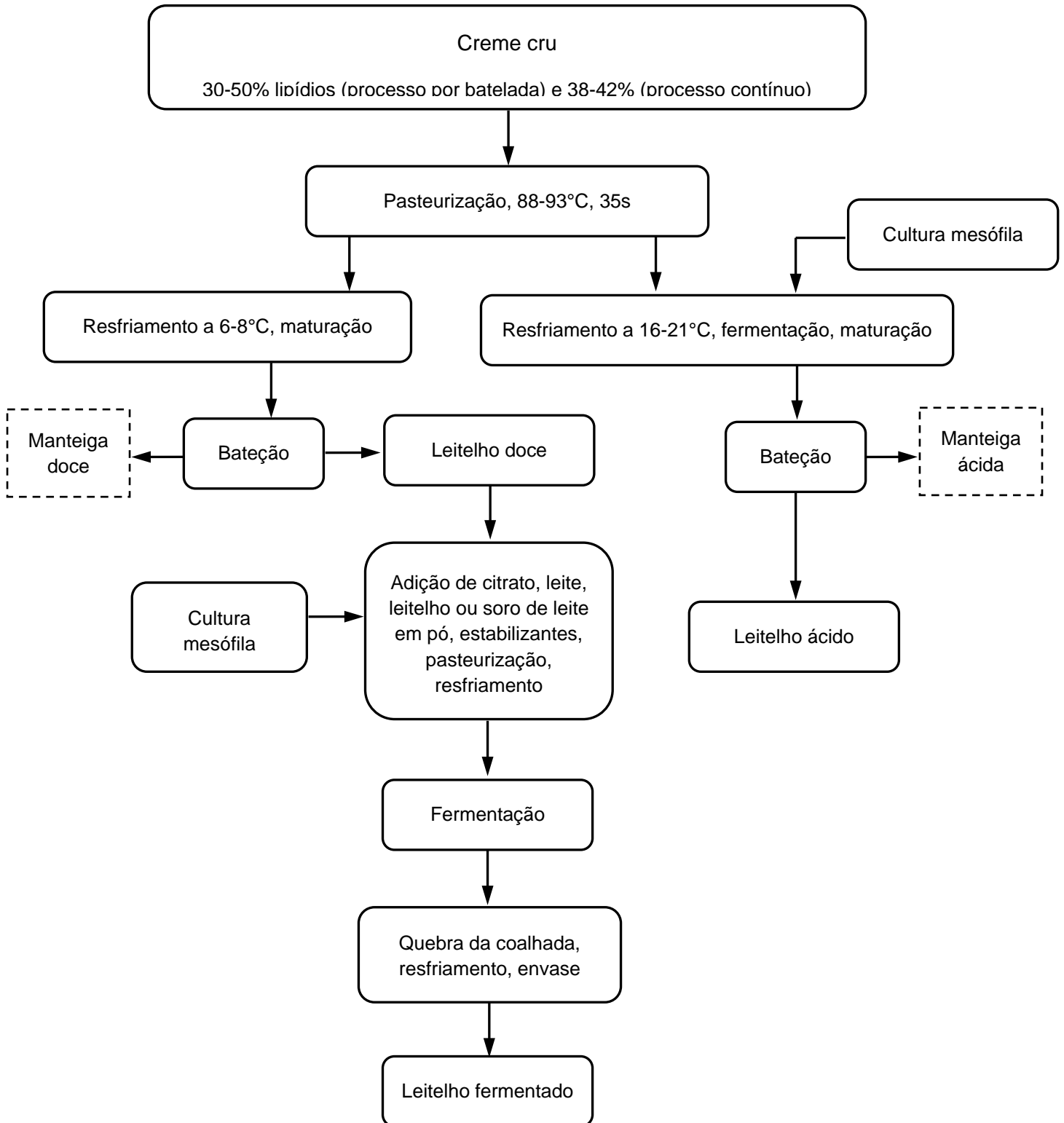


Figura 2 – Fluxograma do processo de obtenção do leite ácido e do leite doce. Fonte: LIBUDZISZ e STEPANIAK, 2002.

Os grumos da manteiga, quando retirados da batedeira, não saem aglomerados, de modo que se torna necessário transformá-los em uma massa consistente, elástica e homogênea. Este processo ocorre no equipamento denominado de malaxador. Pelo processo de amassadura o excesso de água é extraído da massa da manteiga (BEHMER, 1982).

A eficácia da batedura proporciona uma medida da quantidade de gordura que se transformou em manteiga e, esta medida se expressa levando em conta a quantidade de gordura perdida no leiteiro. Ao todo as perdas de gordura no leiteiro nunca devem ultrapassar 0,6%. A temperatura da batedura condiciona o rendimento do processo já que, em princípio, quanto maior for a temperatura, maior será a velocidade da batedura, porém a perda de gordura no leiteiro é maior; normalmente, trabalha-se entre 11 a 15°C (PEREDA et al., 2005).

De acordo com Behmer (1982), a cada 100 Kg de leite que são encaminhados para o processo de desnatado, são gerados 10 Kg de creme e 90 Kg de leite desnatado. Os 10 Kg de creme são processados e obtém-se 4,5 Kg de manteiga e 5,5 Kg de leiteiro.

2.3 MEMBRANA DO GLÓBULO DE GORDURA DO LEITE (MGGL)

Os glóbulos de gordura do leite são envoltos por uma fina membrana, denominada membrana do glóbulo de gordura do leite (MGGL). Essa membrana, com cerca de 10-20 nm de secção transversal, age como um emulsificante, e protege os glóbulos de gordura da coalescência e da degradação enzimática. Nos últimos anos vários estudos têm sido desenvolvidos com o interesse de investigar o potencial uso da membrana do glóbulo de gordura do leite em alimentos. A membrana por ser altamente estruturada e conter proteínas e lipídios polares específicos, possui propriedades funcionais únicas, além de diversas evidências científicas sobre seus benefícios a saúde (DEWETTINCK et al., 2008; SINGH, 2006).

A quantidade e a composição da MGGL podem variar consideravelmente dependendo do teor de gordura e o tamanho do glóbulo de gordura, sendo estes afetados por diversos fatores como, a dieta, raça, saúde e estágio de lactação dos animais. Além disso, processos aplicados ao leite, como por

exemplo, agitação, inclusão de ar, tratamento térmico, entre outros, podem afetar a composição da MGGL (SINGH, 2006).

A característica central na arquitetura de membranas biológicas é a camada dupla de lipídios, a qual age como uma barreira impedindo a passagem de moléculas polares e íons. Os lipídios da membrana são anfipáticos, ou seja, um lado da molécula é hidrofóbico e o outro é hidrofílico. As interações hidrofóbicas entre si e as interações hidrofílicas com a água direcionam sua organização como bicamadas de membrana (NELSON e COX, 2000).

A MGGL por ser uma membrana biológica é constituída de proteínas, fosfolipídios, glicoproteínas, lipídios neutros, enzimas entre outros componentes secundários (Figura 3) (VANDERGHEM et al., 2010). No entanto os componentes que constituem a maior parte da MGGL são as proteínas específicas da membrana (principalmente as glicoproteínas) e os fosfo- e esfingolipídios.

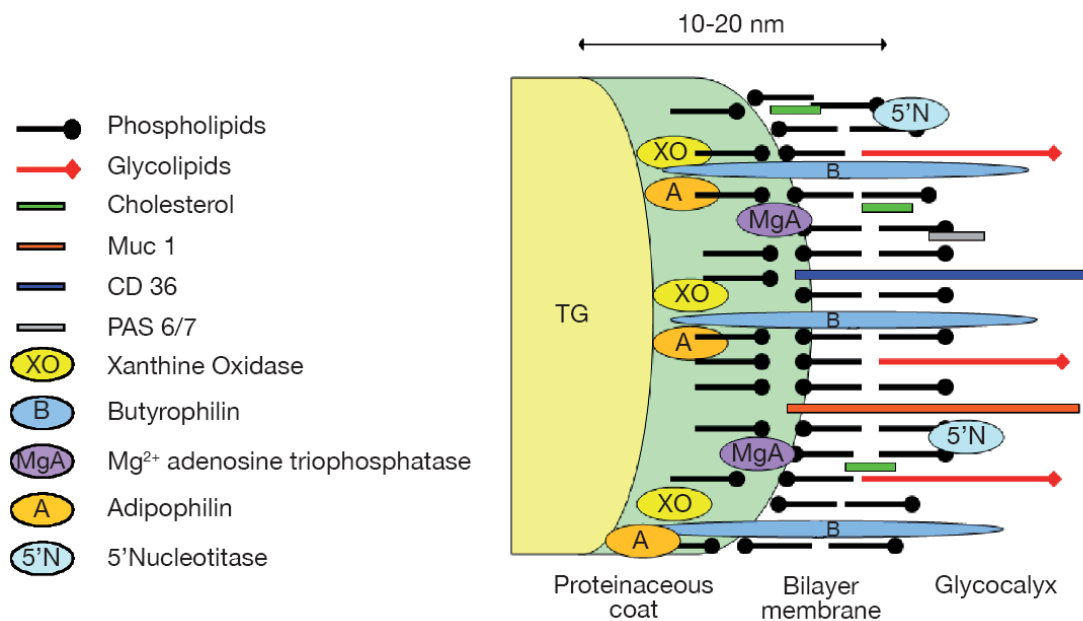


Figura 3 – Estrutura da membrana do glóbulo de gordura do leite. Fonte: VANDERGHEM et al., 2010.

A MGGL é composta por uma estrutura de três camadas. Verifica-se primeiro uma monocamada interna que possivelmente envolve as gotículas lipídicas intracelulares, sendo originada no retículo endoplasmático e possivelmente de outros compartimentos intracelulares. Nessa monocamada a parte hidrofóbica dos lipídios polares está em contato com os triglicerídios do núcleo. Em seguida, há uma bicamada externa originada na membrana apical plasmática, onde, na parte externa,

as porções hidrofílicas dos grupos de lipídios polares estão em contato com a fase aquosa do leite. Esta bicamada possui uma cobertura proteínica eletrodensa na parte interna (VANDERGHEM et al., 2010).

2.3.1 Composição Lipídica da MGGL

Os lipídios da MGGL são constituídos principalmente de lipídios polares, embora lipídios neutros possam estar presentes. Dentre os lipídeos neutros na MGGL são encontrados, principalmente, os triglicerídeos (~95%) e, em menor proporção, os di- e monoglicerídeos, além do colesterol e seus ésteres. Os triglicerídeos da MGGL são constituídos em maior proporção por ácidos palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0) e em menor proporção por ácidos graxos insaturados, como miristoléico (C14:1), palmitoléico (C16:1), oléico (C18:1) e linoléico (C18:2) (DEWETTINCK et al., 2008; COSTA, 2008).

Os lipídeos polares são constituídos de diversos grupos de fosfolipídios e esfingofosfolipídios e representam de 15-43% do total de lipídios na MGGL. Os principais fosfolipídios encontrados na MGGL são fosfatidilcolina (FC, 25-40%), fosfatidiletanolamina (FE, 27-37%), fosfatidilinositol (FI, ~5%) e fosfatidilserina (FS, ~3%), enquanto que a lisofosfatidilcolina e etanolamina são encontrados em pequenas quantidades e difosfatidilglicerol aparece apenas em traços (Figura 4). Três esfingolipídios são também encontrados: esfingomielina (EM, 20-25%), lactosilceramida (traços) e glucosilceramida (traços). Os ácidos graxos livres e gangliosídeos são encontrados em pequenas quantidades (DEWETTINCK et al., 2008; COSTA, 2008; VANDERGHEM et al., 2010).

Os fosfolipídios são constituídos de uma porção hidrofóbica, sendo constituída de ácidos graxos e uma porção hidrofílica, que contém um resíduo fosfato ligado a diferentes grupos orgânicos, como colina, serina e etanolamina, entre outros (DEWETTINCK et al., 2008; COSTA, 2008). A atividade surfactante dos fosfolipídios faz com que eles possam ser utilizados para a modificação das propriedades físicas de lipídios, atuando como emulsificantes, bem como para a modificação do comportamento de cristalização de lipídeos (MCCLEMENTS e DECKER, 2010).

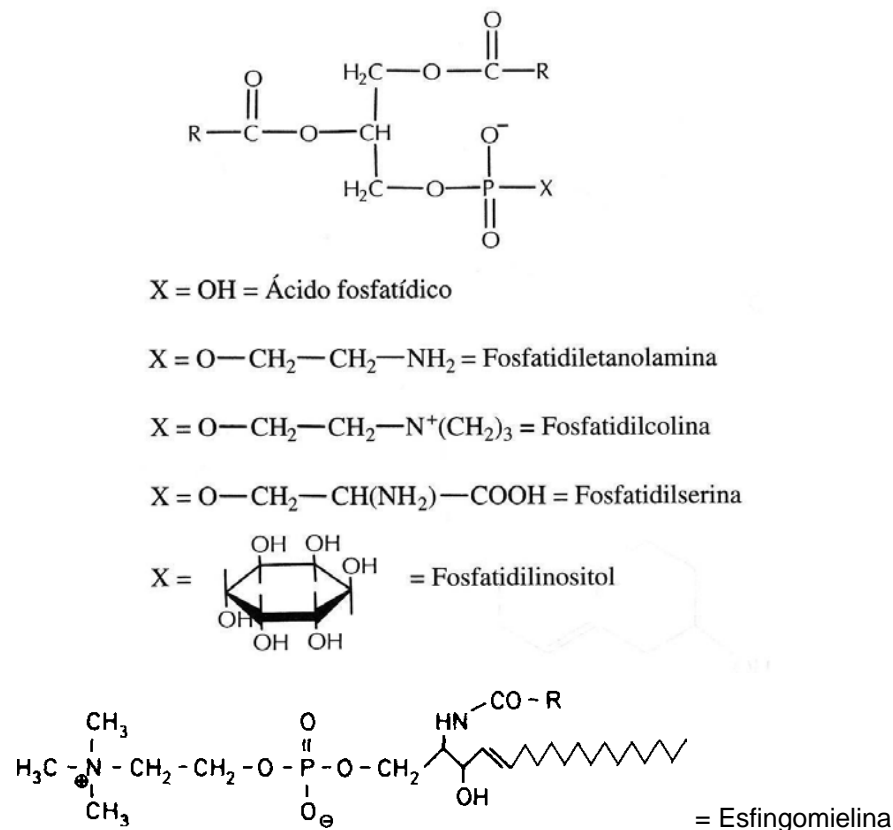


Figura 4 – Estrutura química dos principais fosfolipídios e esfingomiolina encontrados na MGGL. Fonte: MCCLEMENTS e DECKER (2010); BELITZ et al., 2009.

Em estudo realizado por Sánchez-Juanes et al. (2009), determinou-se o conteúdo de fosfolipídios e a distribuição das espécies individuais de fosfolipídios na MGGL e no leite integral (Tabela 2). Na MGGL observou-se presença de fosfatidiletanolamina (FE), fosfatidilcolina (FC), fosfatidilserina (FS), fosfatidilinositol (FI), esfingomiolina (EM), lisofosfatidiletanolamina e lisofosfatidilcolina. O leite integral contém os mesmos fosfolipídios individuais da MGGL, exceto pela forma lisofosfatidiletanolamina.

O termo “liso” significa que um ácido graxo foi removido do fosfolipídio. Na indústria de alimentos, lisofosfolipídio geralmente indica um fosfolipídio do qual o ácido graxo foi removido da posição *sn-2* (MCCLEMENTS e DECKER, 2010).

Os valores encontrados na literatura para teores de fosfolipídios individuais presentes na MGGL e no leite integral mostraram grandes diferenças (Tabela 2). Tais diferenças podem ser resultantes da metodologia aplicada no

estudo, raça dos animais, práticas de alimentação nas fazendas, ou aos tratamentos aplicados nas amostras de leite (SÁNCHEZ-JUANES et al., 2009).

O leitelho contém maior quantidade de fosfolipídios se comparado com o leite, devido ao fato dos fosfolipídios constituírem cerca de um terço da MGGL (base seca) (SODINI et al., 2006). Segundo Gassi et al. (2008), o leitelho possui de 5 a 7 vezes mais fosfolipídios em sua composição se comparado com o creme. Morin et al. (2007), afirmam que se comparado com o leite desnatado, leite integral e creme, o leitelho contém 4, 5 e 10 vezes mais fosfolipídios em base seca, respectivamente.

Tabela 2- Conteúdo de fosfolipídios e sua distribuição na MGGL e no leite integral

Fosfolipídio ^b	MGGL	Leite	MGGL (Literatura)	Leite (Literatura)
FC	27.4 ± 0.0*	32.7 ± 1.6	33.6; 33.2; 32.1	35.1; 21.1
FE	33.0 ± 1.9	28.5 ± 1.5	22.3; 32.6; 36.4	19.8; 46.3
FS/Fl	17.8 ± 2.2	14.1 ± 1.4	4.3; 12.9; 14.1	13.7; 12.7
EM	18.8 ± 1.1	23.0 ± 1.6	35.3; 21.3; 17.3	31.4; 19.8
LFE	1.4 ± 0.5	N.D		
LFC	1.6 ± 0.4	1.8 ± 0.5		

^a Os valores apresentados são porcentagens do conteúdo total de fosfolipídio e são médias ± SD de três determinações independentes; ND, não detectado; e o asterisco indica diferença significativa $p < 0.05$. O conteúdo total de fosfolipídios determinados foi de $9750 \pm 1146 \mu\text{g } 100 \text{ mg}^{-1}$ em peso seco para a MGGL e $168.8 \pm 6.7 \text{ mg L}^{-1}$ para leite fresco.

^b Abreviações são: FC, fosfatidilcolina; FE, fosfatidiletanolamina ; FS, fosfatidilserina ; Fl, fosfatidilinositol ; EM, esfingomielina ; LFE, lisofosfatidiletanolamina ; LFC, lisofosfatidilcolina.

Fonte: SÁNCHEZ-JUANES et al., 2009

2.3.2 Composição Proteica da MGGL

As proteínas da membrana do glóbulo de gordura representam apenas 1-2% da fração total de proteínas presentes no leite. A composição das proteínas da MGGL é bem complexa, contendo cerca de 40 diferentes tipos de proteínas, com massa molecular de 15.000 a 240.000 Da. Essas proteínas possuem diversas funções, que são de grande relevância na atividade, promoção do crescimento e defesa das células (RICCIO, 2004).

Análises das proteínas encontradas na MGGL demonstraram uma grande quantidade de polipeptídeos e muitas dessas proteínas estão presentes na membrana como glicoproteínas. A principal proteína da MGGL é a glicoproteína butirofilina, representando cerca de 40% do total de proteínas da MGGL, seguida da xantino oxidase com 12% a 13% do total. Estão presentes outras proteínas na MGGL, porém cada uma representa 5% ou menos (SPITSBERG, 2005).

As proteínas até então identificadas na MGGL são: adipofilina (ADPH), butirofilina (BTN), antígenos de diferenciação (CD36), mucina 1 (MUC1), ácido periódico de Schiff III (PASIII), ácido periódico de Schiff 6/7 (PAS 6/7), proteose peptona 3 (PP3), xantino dehidrogenase/oxidase (XDH/XO) e proteína ligante de ácidos graxos (FABP). As massas moleculares aparentes das principais proteínas da MGGL obtidas por SDS-PAGE são (em kDa): MUC1, 194; XDH/XO, 145; PASIII, 94; CD36, 78; BTN, 67; PAS 6, 50; PAS 7, 47; ADPH, 52; FABP, 13. Dentre elas, seis coram fortemente com Coomassie Blue (XDH/XO, CD36, BTN, ADPH, PAS 6/7 e FABP). Duas glicoproteínas, MUC1 e PAS III, não reagem com esse corante, mas podem ser detectadas com reagente de PAS (Ácido Periódico de Schiff) ou de prata (*silver stain*). Muitas proteínas menores também são detectáveis com corante de prata (COSTA, 2008).

No passado, a identificação e caracterização das proteínas da MGGL eram baseadas essencialmente na comparação da mobilidade eletroforética, diferentes colorações do gel, técnicas de clonagem molecular, reações com anticorpos específicos e identificação pelo sequenciamento do aminoácido N-terminal. Por estes meios, as principais bandas eram separadas e identificadas. Mais recentemente com a análise proteômica, incluindo análise de espectrofotometria de massa, os resultados obtidos são mais rápidos e precisos, tanto das proteínas principais como das proteínas em menor concentração. Apesar do grande avanço na identificação das proteínas de menor concentração, pouco ainda é conhecido sobre sua função na MGGL (VANDERGHM et al., 2010).

Em preparações de MGGL muitas outras proteínas podem ser observadas, a maioria consiste de proteínas periféricas fracamente adsorvidas na membrana, incluindo enzimas, imunoglobulinas e componentes derivados de leucócitos, do citoplasma das células secretoras da glândula mamária e da fração desnatada do leite (COSTA, 2008).

2.3.3 Benefícios a Saúde Promovidos por Componentes da MGGL

Nos últimos 20 anos uma grande quantidade de pesquisas têm sido realizada sobre os possíveis benefícios à saúde promovidos pelas proteínas e fosfolipídios presentes na membrana do glóbulo de gordura do leite bovino (SINGH, 2006). Estes benefícios são: fator redutor de colesterolemia, inibidor do crescimento de células cancerígenas, carreador de vitamina, inibidor de *Helicobacter pylori*, inibidor de beta-glucuronidase da *Escherichia coli* intestinal, xantino oxidase como agente bactericida, butirofilina como um possível supressor de esclerose múltipla, e fosfolipídios como agentes contra o câncer de cólon, patógenos gastrointestinais, doença de Alzheimer, depressão e stress (Tabela 3) (SPITSBERG, 2005).

Tabela 3 – Estudos sobre as propriedades benéficas da membrana do glóbulo de gordura do leite (MGGL) a saúde.

COMPONENTE	BENEFÍCIO À SAÚDE	REFERÊNCIA
BRCA1	Inibição do câncer de mama	Spitsberg e Gorewit, 1997b;
BRCA2	Inibição do câncer de mama	Vissak et al., 2002
Fatty acid binding protein (FABP) (proteína ligante de ácido graxo)	Inibidor do crescimento celular	Spitsberg et al., 1995; Spitsberg e Gorewit, 2002
Inibidor de beta-glucuronidase	Inibidor do cancer de cólon	Ito et al., 1993
FABP como transportador de selênio	Fator anticancer	Bansal e Medina, 1993; Whanger, 2004
Inibidor de <i>Helicobacter pylori</i>	Prevenção de doenças gástricas	Wang et al., 1998
Fator de redução da Colesterolemia	Anticolesterolêmico	Ito et al., 1992
Butirofilina	Supressão de esclerose múltipla	Mana et al., 2004
Vitamina E e carotenóides	Antioxidantes	Lindmark-Manson e Akesson, 2000; Jensen e Nielsen, 1996
Vitamina B2		Kanno et al., 1991
Xantino oxidase	Agente bactericida	Martin et al., 2004; Hancock et al., 2002
Fosfolipídios	Inibidor de câncer de cólon	Parodi, 2001
	Anticolesterolêmico	Noh e Koo, 2004
	Supressão de patógenos gastrointestinais	Sprong et al., 2002
	Anti-Alzheimer, Antidepressivo e	Harroks e Farooqui, 2004
	Antistress	McDaniel et al., 2003
Fosfoproteínas	Fonte de fósforo orgânico e fosfato de cálcio	Spitsberg e Gorewit, 1997c

Fonte: SPITSBERG, 2005.

Noh e Koo (2004), realizaram um estudo comparativo da eficiência na inibição da absorção intestinal de colesterol entre a esfingomielina (EM) presente no ovo e a esfingomielina presente no leite. Os resultados obtidos demonstraram que sob condições *in vivo*, a esfingomielina do ovo e a do leite diminuiriam a

absorção intestinal do colesterol, gordura e outros lipídios, sendo a EM do leite mais eficiente. O efeito inibitório da EM parece estar associado com o alto grau de saturação e o maior comprimento da cadeia do grupo ácido graxo. Tais características físicas da EM podem impedir a hidrólise de outros lipídeos e retardar a transferência de lipídeos micelares para os enterócitos em sua ingestão e absorção.

Demonstrou-se em animais que a fosfatidilserina ajuda a atenuar efeitos neuronais do envelhecimento, além de restaurar a memória. Efeitos positivos foram obtidos em triagens clínicas com pacientes que sofriam da doença de Alzheimer, no entanto, elevadas doses foram utilizadas (200 mg/dia). Acredita-se que a fosfatidilcolina ajuda na recuperação de danos causados por intoxicação de fármacos e cogumelos, álcool e do vírus da hepatite. Este fosfolipídio é uma fonte importante de colina, que é considerado um nutriente essencial para humanos. A colina promove a síntese e transmissão de neurotransmissores importantes para memória e pode estar envolvido no desenvolvimento do cérebro (ROMBAUT e DEWETTINCK, 2006).

De acordo com Dewettinck et al. (2008), a suplementação de fosfatidilserina em humanos que praticavam exercícios demonstrou que este fosfolipídio poderia alterar a função neuroendócrina e influenciar positivamente a percepção de dor muscular e a sensação de bem-estar. A fosfatidilcolina protege a mucosa gastrointestinal dos humanos contra compostos tóxicos e reduz o risco de morte causada por infecção e inflamação intestinal em prematuros hospitalizados. Alguns fosfolipídios são digeridos no trato gastrointestinal e formam compostos que podem ter atividade antimicrobiana. Há evidências que os fosfolipídios do leite possuem um importante papel gastro protetor em humanos, principalmente na mucosa duodenal.

Segundo Shaikh e Rathi (2009), o homem possui uma habilidade restrita na síntese da taurina. O leiteiro contém maior concentração de taurina latente que o leite. Há estudos que confirmam que o ânion superóxido é um dos maiores fatores no envelhecimento humano e a taurina tem demonstrado boa atividade antioxidante. Deste modo, o consumo abundante da taurina derivada do leiteiro pode garantir uma longevidade e retardo no envelhecimento.

2.4 LEITELHO E SUAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS

Por muitos anos o leitelho foi considerado um subproduto sem valor comercial na indústria de leite. No entanto, nas últimas duas décadas muitos estudos revelaram novas potencialidades na valorização do leitelho, principalmente como fonte de componentes funcionais (VANDERGHEM et al., 2010).

O leitelho contém todos os componentes do creme que são solúveis em água, como proteínas, lactose e minerais, que podem ser extraídas e purificadas e aplicadas em diversos alimentos ou produtos não alimentícios. Adicionalmente o leitelho contém material derivado da membrana do glóbulo de gordura do leite (MGGL), particularidade que tem atraído muita atenção devido as suas propriedades funcionais. Esta membrana é rompida durante a bateção e acaba migrando, em sua maior parte, para a fração do leitelho. Desse material derivado da MGGL encontram-se principalmente proteínas e fosfolipídios (CORREDIG e DALGLEISH, 1997; SODINI et al., 2006; VANDERGHEM et al., 2010).

De acordo com LIBUDZISZ e STEPANIAK (2002), a definição do leitelho é flexível. O termo leitelho pode ser entendido de diferentes formas de acordo com o local de comercialização. Dependendo do país, é associado ou confundido com leite ácido, “*cultured buttermilk*”, leite fermentado, alguns tipos de leites fermentados escandinavos e às vezes até com leite fermentado da Bulgária.

O termo “*cultured buttermilk*” designa o produto formulado com leite desnatado ou leite com conteúdo reduzido de gordura, previamente pasteurizado e fermentado por culturas lácticas e bactérias aromáticas (*Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Leuconostoc* e/ou *Streptococcus lactis diacetylatis*). Este produto também pode ser conhecido como “*buttermilk*”, “*comercial buttermilk*” ou “*cultured skim milk*” (leite desnatado fermentado), sendo este último a forma mais apropriada, pois expressa sua origem e propriedades, além de evitar que seja confundido com o leitelho resultante da produção da manteiga. Alguns produtores do “*cultured buttermilk*” adicionam grânulos de lipídios ao produto, como forma de melhor associar ao leitelho convencional (KOSIKOWSKI, 1978; LIBUDZISZ e STEPANIAK, 2002).

A produção total de leitelho líquido no mundo, em 2006, foi de 4,1 milhões de toneladas e de 0,6 milhões nos Estados Unidos, sendo esses dados baseados na produção anual de manteiga fabricada a partir de 40% de nata

(SODINI et al., 2006). Para a produção da manteiga, a bateção de 1 Kg de creme contendo 40% de gordura irá gerar partes iguais de manteiga e leite. Portanto, a produção mundial de leite pode ser estimada baseando-se na produção de manteiga (MORIN et al., 2007). Segundo Jinjark et al. (2006), as vendas do leite diminuíram de 420,5 milhões para 248,1 milhões Kg de 1980 a 2003. As vendas per capita também reduziram de 1,9 a 0,9 Kg de 1980 a 2003. De acordo com Gassi et al. (2008), em 2006, a França, produziu 328.850 toneladas de manteiga gerando 30.300 toneladas de leite em pó, que foram destinados principalmente para alimentação animal.

2.4.1 Aplicação do Leite em Alimentos

A utilização de leite em pó como ingrediente pode aumentar o valor econômico deste subproduto, além de reduzir o custo com o tratamento de resíduos industriais. A literatura científica aponta novas propriedades e sugere a utilização do leite e de isolados de MGGL em uma ampla diversidade de alimentos. Essas aplicações são principalmente destinadas ao setor de lácteos, em produtos como, creme reconstituído, leite evaporado reconstituído, iogurte, queijo tipo Cheddar, mozzarella, queijo para pizza e queijo com teor de gordura reduzido. Há possibilidade de se utilizar o leite como ingrediente em produtos não-lácteos, tais como, pães, sopas, molhos, chocolates e sucos naturais. A aplicação do leite nos produtos alimentícios acrescentam algumas propriedades como emulsificação, estabilidade, retenção de umidade, rendimento, estabilidade térmica, textura, consistência, sabor e aroma (RIGUEIRA, 2006; VANDERGHEM et al., 2010).

Morin et al. (2007), afirmam que a desidratação do leite líquido, oferece um maior leque de aplicações ao produto. No entanto, na forma em pó, suas propriedades funcionais podem ser mais limitadas. A sua utilização ainda é escassa e seu potencial permanece inexplorado.

De acordo com Hall e Hedrick (1971), o processo para obtenção do leite doce em pó é similar ao do leite desnatado. A desidratação ocorre em spray-drier sendo previamente concentrado por evaporação, até um total de sólidos de 40-45%, é reaquecido a 70-80°C e desidratado até o teor de umidade de 3,0-4,0%. O leite em pó geralmente é envasado em papel Kraft com um saco plástico interior (Figura 5).



Figura 5 – Leite em pó fabricado por diferentes empresas: Fonterra (Nova Zelândia), Farmers (Canadá), Amalac (Filipinas).

Na forma em pó pode ser utilizado na indústria, principalmente como ingrediente em alimentos (pães, biscoitos, panquecas, waffles, bolos, sorvetes, etc). O processo de desidratação do leite ácido é restrito devido ao seu alto conteúdo de ácido láctico. No entanto, este produto pode ser evaporado a 26-28% de sólidos e adicionado em pães e bolos (LIBUDZISZ e STEPANIAK, 2002). Segundo Webb e Whittier (1970), no começo do século XX grande quantidade do leite produzido era proveniente do creme ácido, sendo que apresentava grandes quantidades de neutralizante e era destinado para a alimentação animal.

Nos Estados Unidos o leite é utilizado comercialmente principalmente na indústria de panificação (39%), preparação de misturas secas (33%), e na indústria de lácteos (23%). Na indústria de panificação o leite é utilizado para melhorar o sabor e textura dos produtos. Outra utilização industrial para o leite é para preparação de mixes funcionais que podem ser usados em diversos tipos de alimentos, como molhos, salgadinhos e chocolates. Na indústria de lácteos o leite é utilizado na fabricação de queijo, na formulação de sorvetes ou iogurtes, ou na produção de leites reconstituídos. O leite é capaz de aumentar a estabilidade térmica de leites reconstituídos, principalmente devido às interações entre fosfolípidios e proteínas que previnem a coagulação da proteína durante o processo de esterilização. Outra utilização do leite que está sendo estudada é sua adição na produção de queijo Cheddar de baixo teor de gordura. A adição do leite melhora a textura do queijo devido à alta capacidade de aprisionamento de água pelos fosfolípidios (SODINI et al., 2006). De acordo com Jinjarak et al. (2006),

o leiteiro também pode ser utilizado como ingrediente funcional em produtos alimentícios como guarnições para saladas, molhos para macarrão, chocolate, condimentos para queijo, misturas para sorvetes, e iogurte.

Webb e Whittier (1970), afirmam que o leiteiro oferece propriedades desejáveis na aplicação em produtos de panificação, principalmente em sua forma em pó. O leiteiro em pó pode ser adicionado em grandes quantidades em mixes produzidos pelas indústrias, como por exemplo, mixes para panquecas, mixes para bolos, etc. Reger et al. (1949), apud Webb e Whittier (1970), observaram que com a adição de 6% de leiteiro em pó houve um aumento de volume do pão se comparado com o pão produzido com leite desnatado em pó. Acredita-se que o conteúdo de fosfatidilcolina presente no leiteiro é responsável por este aumento de volume. Johnson (1936), apud Webb e Whittier (1970), encontrou diversas vantagens na utilização do leiteiro em pão de centeio, tanto em escala experimental, como em escala comercial. A adição do leiteiro contribuiu positivamente no desenvolvimento do sabor, cor da crosta, textura e estrutura do miolo, absorção de água e propriedades nutritivas.

Gonzalez et al. (2009), elaboraram pães com adição de 0, 50 e 100% de leiteiro líquido na formulação (Figura 6). Os pães contendo leiteiro apresentaram uma textura macia, alvéolos pequenos e miolo ligeiramente amarelado. O sabor foi considerado agradável pelos provadores, principalmente no caso do pão contendo 50% de leiteiro, indicando que os pães assim formulados apresentaram aceitação similar aos pães com formulação convencional. Os autores afirmam que é viável a produção de pães com leiteiro, agregando assim valor nutricional diferenciado ao produto, mantendo a aceitabilidade do consumidor.

Na produção de sorvetes o emprego do leiteiro garante uma melhora nas propriedades de bateção de misturas de sorvetes, possivelmente devido ao alto teor de fosfatidilcolina, além de garantir um melhor flavor, corpo e textura. O leiteiro concede um rico sabor cremoso e sua propriedade emulsificante desenvolve um corpo e textura suave e ajuda a retardar o crescimento de cristais de gelo durante o endurecimento do sorvete (WEBB e WHITTIER, 1970).

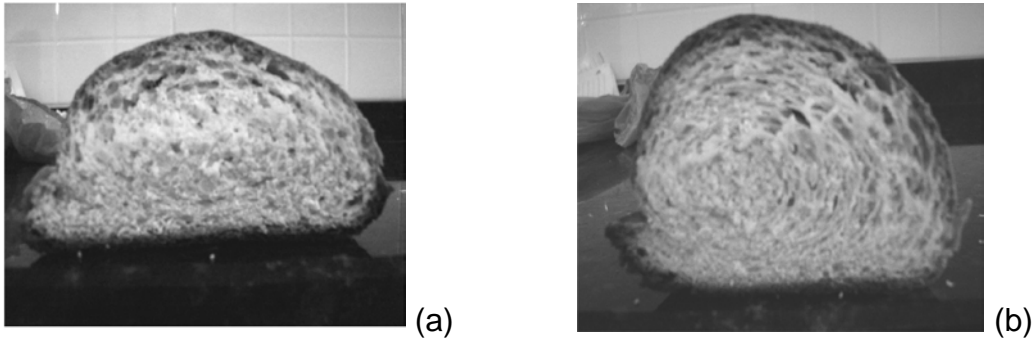


Figura 6 – Pães elaborados com diferentes concentrações de leite líquido (foto (a): adição de 50% de leite; foto (b): adição de 100% de leite). Fonte: Gonzalez et al. (2009).

Trachoo e Mistry (1998), estudaram a possibilidade de incorporação de leite doce ultrafiltrado (LDU) e leite doce em pó (LDP) em iogurte desnatado (ID) e iogurte com teor reduzido de gordura (IRG). Os resultados demonstraram que o conteúdo de proteína do IRG aumentou pela incorporação do LDU, conferindo uma maior capacidade de tamponamento e textura mais firme. De todas as formulações testadas o IRG + LDU foi o que apresentou textura mais firme. Quanto às propriedades sensoriais, o iogurte desnatado adicionado do leite em pó foi o que obteve maior aceitabilidade entre os iogurtes desnatados. Entre os iogurtes de teor reduzido de gordura, o que apresentou textura mais macia foi aquele onde se adicionou leite em pó. A formulação IRG + LDU foi a que obteve maior pontuação para aparência, porém baixa pontuação para aceitabilidade geral, possivelmente devido a firmeza excessiva apresentada. Os autores concluíram que o leite doce ultrafiltrado conferiu ao iogurte uma matrix mais densa. A adição de até 4,8% de leite doce em pó na formulação de iogurte de teor de gordura reduzido resultou em um produto suave e macio.

Vani e Zayas (1995), apud Wong e Kitts (2003a), observaram que o conteúdo proteico do leite ultrafiltrado influenciou no aumento da viscosidade aparente e diminuição da acidez (capacidade tamponante) em iogurtes sem gordura ou com teor de gordura reduzido.

Abreu et al. (1976), utilizaram o leite como substrato de fermentação, visando obter produto alimentício de elevado valor biológico para ser utilizado na suplementação da alimentação humana. A fermentação do leite, pelo microrganismo *Kluyveromyces fragilis*, possibilitou a obtenção de um pó amarelado, praticamente inodoro e insípido com elevado conteúdo proteico (72,78%). Segundo

os autores o produto alimentício obtido traz uma maior diversificação da linha de produção dos laticínios, refletindo em uma redução do preço dos produtos.

Shaikh e Rathi (2009), aplicaram o leitelho na formulação de bebidas carbonatadas flavorizadas com frutas. O leitelho estudado foi obtido pelo seguinte processo: o leite de búfalo foi padronizado a 6% de gordura, aquecido a 85° por 15min, resfriado a 40°C e inoculado com as culturas starter *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*; foi incubado até obtenção de acidez de 0,8%; a coalhada formada foi batida a 10°C obtendo-se a manteiga e o leitelho. As formulações de bebidas adicionadas de leitelho obtiveram melhores propriedades físico-químicas (viscosidade) e nutricionais (proteínas, vitaminas e minerais) se comparadas com a amostra comercial. Os autores concluíram que as bebidas de frutas carbonadas e adicionadas de leitelho tiveram grande aceitabilidade tanto sensorial como nas propriedades físico-químicas.

Govindasamy-Lucey et al. (2006), investigaram o impacto do uso de diferentes níveis, 0, 2, 4 e 6%, de leitelho concentrado (~34% de sólidos) na fabricação de queijo para pizza. Os resultados demonstraram que a adição de baixos níveis (~2%) de leitelho concentrado, obteve-se uma melhora no rendimento do queijo sem afetar a composição, propriedades reológicas e sensoriais do produto. No entanto, com a adição de altos níveis de leitelho concentrado obteve-se um produto com elevada acidez, possivelmente devido ao alto conteúdo de lactose. Os autores sugerem que aplicando-se o processo de ultrafiltração ou de diafiltração no leitelho o conteúdo de lactose deve ser minimizado.

Em trabalho posterior os autores verificaram que o uso do processo de ultrafiltração para a concentração do leitelho é interessante. Isto devido à composição do concentrado apresentar um alto conteúdo de caseína, baixo conteúdo de lactose e melhor recuperação de fosfolipídios durante o processo de fabricação do queijo, se comparado com os outros processos aplicados (osmose reversa e evaporação) (GOVINDASAMY-LUCEY et al., 2007).

A aplicação do leitelho e isolados de MGGL em alimentos tem sido comprovado em melhorar algumas características. No entanto, a quantidade utilizada como ingrediente alimentar deve ser estudada para que não ocorra interferência negativa nas propriedades funcionais e sensoriais dos produtos finais (VANDERGHEM et al., 2010).

2.4.2 Propriedades Funcionais do Leitelho

A maior parte dos estudos sobre a funcionalidade do leitelho como um ingrediente alimentar utiliza o leitelho doce, pois é o principal tipo de leitelho comercializado. Porém, segundo Sodini et al. (2006), outros tipos de leitelho como, o leitelho ácido e o leitelho de soro (obtido pela bateção do creme de soro, na fabricação de manteiga de soro), podem apresentar características funcionais interessantes.

No estudo de Sodini et al. (2006), foi proposta a avaliação de propriedades funcionais e composição do leitelho doce, leitelho ácido e leitelho do soro, sendo os resultados comparados com os do leite desnatado e soro de leite. Os resultados demonstraram diferenças nas propriedades funcionais do leitelho de soro e do leitelho (doce e ácido). O leitelho do soro apresentou maiores propriedades emulsificantes e menor capacidade na formação de espuma, possivelmente devido a maior proporção de fosfolipídios em relação a de proteínas. No entanto, todos os tipos de leitelho analisados demonstraram maior capacidade emulsificante se comparado com o leite desnatado e soro de leite.

O leitelho contém diversos agentes emulsificantes: caseínas, proteínas do soro, proteínas da MGGL e lipídios polares derivados da MGGL. A caseína é a principal proteína do leite e é considerada uma proteína com propriedades anfifílicas, na sua estrutura primária, permitindo adsorção nas interfaces. As proteínas do soro possuem estrutura globular e formam uma estrutura viscoelástica nas interfaces, favorecendo a estabilidade por longa duração. As proteínas da MGGL e os fosfolipídios são considerados como agentes emulsificantes naturais, devido a sua natureza anfifílica (VANDERGHM et al., 2010).

As proteínas da MGGL possuem uma função importante na estabilização dos glóbulos de gordura no creme e tem sido utilizada na reconstituição da gordura do leite em emulsões. Diversos estudos tem demonstrado que as proteínas da MGGL presentes no leitelho aumentam as propriedades funcionais deste subproduto (CORREDIG e DALGLEISH, 1997).

Corredig e Dalgleish (1997), investigaram a aplicação da MGGL isolada do leitelho comercial como potencial estabilizante de emulsões óleo em água. Os resultados demonstraram que embora as proteínas da MGGL tenham a

função de estabilizar o glóbulo de gordura do leite, a membrana obtida após o processo de fabricação da manteiga possui pouca propriedade emulsificante. Possivelmente devido à desnaturação sofrida pelo tratamento térmico aplicado ao creme.

Segundo Sodini et al. (2006), uma funcionalidade única do leitelho é sua capacidade em aumentar a estabilidade térmica de leites reconstituídos, principalmente devido as interações fosfolípido-proteína prevenindo, assim a coagulação proteica durante a esterilização.

VANDERGHAM et al. (2010), afirmam que a variabilidade e qualidade do creme, o pré-tratamento do creme durante o processo de fabricação da manteiga e o método para obtenção dos isolados da MGGL podem influenciar sua funcionalidade final. Estudos sobre a funcionalidade do leitelho são promissores, no entanto, mais pesquisas são necessárias nesta área.

2.4.3 Leitelho como Fonte para Extração de Componentes Funcionais

Diversos tratamentos físico-químicos têm sido aplicados no leitelho, como forma de aumentar a concentração de fosfolípidios. Os principais tratamentos são, microfiltração, ultrafiltração e extração com fluido super-crítico (SODINI et al., 2006).

O uso do leitelho como fonte de ingredientes funcionais tem se expandido nos últimos anos. Diversos estudos têm sido realizados no sentido de avaliar e melhorar as propriedades funcionais deste produto. Recentemente, a fração de fosfolípidios do leite e principalmente a esfingomiélna tem sido utilizada como fonte alternativa de fosfolípidios de gema de ovo e de grãos de soja, para uso em suplementação alimentar infantil e adulta e também para nutrição animal (SÁNCHEZ-JUANES et al., 2009; SODINI et al., 2006).

A presença de componentes da MGGL no leitelho e seus efeitos benéficos à saúde são fatores importantes no que diz respeito à valorização de sua utilização. Diferentes tratamentos têm sido aplicados com o objetivo de aumentar a concentração de fosfolípidios no leitelho, como por exemplo, microfiltração, ultrafiltração, extração com fluido supercrítico e concentração precedida de tratamento para remoção da fração de caseína (JINJARAK et al., 2006 e SODINI et al., 2006).

Morin et al. (2007), obtiveram um leitelho com 74% menos proteínas utilizando o processo de lavagem do creme com leite desnatado ultrafiltrado, antes deste ser processado. Os resultados mostraram que as principais proteínas removidas foram as caseínas e as proteínas do soro. Com isso, o processo de microfiltração do leitelho resultou em uma maior retenção de fosfolípidios, correspondendo a um fator de concentração 66% maior se comparado com a microfiltração de um leitelho proveniente do creme normal.

Segundo Costa et al. (2009), os estudos para a obtenção de isolados de MGGL a partir subprodutos lácteos têm indicado que o tipo e os pré-tratamentos aos quais é submetida a matéria-prima, bem como o método de separação, afetam significativamente a composição e a estrutura do glóbulo de gordura do leite e, conseqüentemente, as propriedades de isolados de MGGL. A importância desses compostos na tecnologia de fabricação de determinados produtos alimentícios e na obtenção de uma dieta potencialmente benéfica à saúde já foi demonstrada no meio científico. Porém, são necessários outros estudos para possibilitar a utilização dos isolados de MGGL pela indústria, fazendo com que seus benefícios cheguem ao consumidor.

De acordo com Vanderghem et al. (2010), a utilização da MGGL pura, extraída do creme cru (sem tratamento térmico), como um ingrediente funcional, não é possível no aspecto econômico. No entanto, as propriedades da MGGL podem ser valorizadas no leitelho.

2.4.4 Aplicações Comerciais do Leitelho no Brasil

No Brasil a utilização do leitelho como ingrediente alimentício ainda não está muito difundido. Na literatura nacional há poucos estudos sobre a composição, propriedades funcionais, aplicações alimentícias desse produto. Porém já se pode verificar a presença do leitelho na formulação de alguns produtos comerciais encontrados em supermercados (Tabela 4).

Tabela 4 – Produtos encontrados em supermercados no país e que contém leite em sua formulação

Produto *	Marca	Ingredientes
	Polly (Confepar)	Leitelho , leite, açúcar, soro de leite, polpa de fruta, espessante, amido, fermento.
	Buonna (Companhia do Leite)	Leite parcialmente desnatado, leitelho , açúcar, preparado de morango (açúcar, polpa de morango, aroma de morango sintético idêntico ao natural, corante carmim e ponceau e conservador sorbato de potássio), amido modificado, soro de leite em pó, fermento lácteo e estabilizantes gelatina, pectina, gomas guar e xantana.
	Vigor (JBS)	Leite desnatado, permeado de leite, açúcar, leitelho , preparado de frutas (açúcar, amido modificado, polpas de maçã, banana e mamão, acidulante ácido láctico, aroma idêntico ao natural de maçã, mamão e banana, corantes naturais carmim de cochonilha e urucum e conservante sorbato de potássio), amido modificado, soro de leite em pó desnatado e fermento lácteo.
	Mimosa	Leite pasteurizado parcialmente desnatado, leitelho , açúcar, leite em pó desnatado, fermentos lácteos, aroma, e edulcorantes.
	Lindóia (Laticínio Lindóia do Sul)	Creme de Leite Pasteurizado, água e ou leitelho , sal, corante de urucum e/ou beta caroteno, estabilizante: carragena, emulsificante: gama xantana e goma guar, aroma natural de manteiga, acidulante: ácido láctico e conservador: sorbato de potássio e/ou benzoato de sódio.
	Doriana (Brasil Foods)	Óleos vegetais líquidos e interesterificados, água, sal, leitelho (soro da manteiga) , reconstituído e pasteurizado, vitamina A, estabilizante lecitina de soja, mono e diglicerídeos de ácidos graxos e ésteres de poliglicerol de ácidos graxos, antioxidante EDTA, acidulante ácido cítrico, conservadores de benzoato de potássio e sorbato de potássio, corantes urucum e cúrcuma e aromatizante.

	Mimosa	Nata, matéria gorda láctea, leitelho , sal: 1,5%, espessante: pectina, emulsionante: ésteres cítricos de mono e diglicerídeos de ácidos gordos e corante natural: beta caroteno.
	Becel (Unilever)	Óleos vegetais líquidos e interesterificados, água, sal, leitelho (soro de manteiga) reconstituído e pasteurizado , vitamina A, estabilizantes lecitina de soja, mono e diglicerídeos de ácidos graxos e ésteres de poliglicerol de ácidos graxos, antioxidante EDTA, acidulante ácido cítrico, conservadores benzoato de potássio e sorbato de potássio, corantes urucum e cúrcuma e aromatizante.
	Doriana (Brasil Foods)	Água, óleos vegetais, leitelho (soro da manteiga) , sal, leite fermentado tratado termicamente após a fermentação (iogurte desnatado), queijo sabor de queijo cremoso (cream cheese), espessantes gelatina e goma guar, conservador sorbato de potássio, acidulante ácido cítrico, sequestrante EDTA cálcio dissódico e aromatizante.
	Parmalat	Água, doce de leite (leite, leitelho , açúcar, xarope de glicose, amido, estabilizantes bicarbonato de sódio e citrato de sódio e lactase), creme de leite, açúcar, leite de coco, leite em pó integral, leite em pó desnatado, coco em flocos, xarope de glicose, dextrose, emulsificantes ésteres de ácido graxo com propilenoglicol, espessantes goma guar e goma jataí, estabilizantes mono e diglicerídeos de ácidos graxos e aromatizantes.
	Mimosa	Leite pasteurizado, leitelho , leite em pó, fermentos lácteos, cloreto de cálcio, coalho, conservante: lisozima de ovo e sal.
	Stax (Elma Chips)	Flocos de batata, óleo vegetal de girassol, amido, farinha de arroz, dextrose, açúcar, sal, frutose, proteína hidrolisada de milho, cebola, maltodextrina, lactose, alho, tomate, pimenta tailandesa, manjeriço, leite desnatado, leitelho , emulsificantes: mono e diglicerídeos de ácidos graxos e lecitina de soja, acidulante ácido cítrico, realçadores de sabor: glutamato monossódico, inosinato dissódico e guanilato dissódico, corantes artificiais: amarelo crepúsculo, tartrazina, vermelho 40 e azul brilhante FCF, corante natural cúrcuma e corante inorgânico dióxido de titânio.



Carte D'OR
(Unilever)

Leitelho, natas (9%), açúcar, gorduras e óleos vegetais, gordura vegetal hidrogenada, **leitelho em pó**, dextrose, espessante (carragenina), aromas.



Carte D'OR
(Unilever)

Leitelho, natas (11,5%), óleos e gorduras vegetais, gordura vegetal hidrogenada, açúcar, leite magro em pó, **leitelho em pó**, gema de ovo (1%), amido modificado, dextrose, espessante (carragenina) e aromas.

* Produtos: bebida láctea Polly; bebida láctea Buona; iogurte Vigor; iogurte Mimosa; manteiga light Lindóia; margarina Dorianana; manteiga (fácil de barrar) Mimosa; margarina Becel; cream cheese Dorianana; sorvete Parmalat; queijo curado Mimosa; batata frita Elma Chips; panna cotta Carte D'OR; crème brûlée Carte D'OR.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar as características físico-químicas do leite em pó e aplicá-lo como ingrediente em uma bebida láctea fermentada.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar química e fisicamente o leite em pó;
- Determinar a concentração de proteínas da MGGL e fosfolípidios presentes no leite;
- Determinar o potencial poluente do leite em pó;
- Determinar o período de armazenamento do leite em pó;
- Estudar e comparar o desenvolvimento de *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* em leite, leite desnatado e soro de leite, reconstituídos;
- Desenvolver uma bebida láctea fermentada com *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* contendo leite em pó na formulação;
- Avaliar características físico-químicas e sobrevivência das bactérias lácticas nas formulações durante armazenamento;
- Testar sensorialmente diferentes formulações da bebida;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIAS-PRIMAS

4.1.1 Leite em Pó

O leite doce em pó utilizado no estudo foi fornecido pelo Laticínio Confepar, localizado em Londrina (PR). Foram utilizadas amostras provenientes de quatro lotes de produção e as amostras foram armazenadas congeladas a -18 °C em embalagem plástica à vácuo. As amostras foram envoltas em papel laminado para proteção contra a luz.

4.1.2 Culturas

As bactérias lácticas *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* (Linha YoFlex®, L-904 e L-812) e a bactéria probiótica *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (LC-01) foram cedidas pela empresa Chr. Hansen, localizada em Valinhos (SP).

4.1.3 Outros Ingredientes

Os ingredientes utilizados para a elaboração das diferentes formulações de bebidas fermentadas e curva de crescimento foram:

- Leite em pó integral: marca Polly;
- Leite em pó desnatado: marca SanCor;
- Soro de leite em pó: cedido pela Confepar;
- Açúcar Cristal: marca Alto Alegre;
- Polpa de maracujá: marca Redondo;

4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITELHO EM PÓ

4.2.1 Composição Proximal

As análises foram realizadas nos quatro lotes de leite em pó e todas as análises foram realizadas em triplicata.

A quantidade total de nitrogênio foi determinada pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995). A proteína total foi calculada multiplicando-se o teor de nitrogênio total por 6,38. O percentual de lipídios foi determinado pelo método de Gerber (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). O teor de cinzas foi determinado segundo método gravimétrico de incineração em mufla (AOAC, 1995) e os sólidos totais por secagem em estufa a 105 °C (AOAC, 1995). O percentual de lactose foi determinado pelo método de redução de Fehling (LANARA, 1981).

4.2.2 Determinação do pH

Para a determinação do pH das amostras foi utilizado potenciômetro (BEL Engineering, modelo W3B). As amostras foram reconstituídas a 12% em água destilada e homogeneizadas até completa dissolução. As medidas foram realizadas em quadruplicata para cada lote do produto.

4.2.3 Determinação da Atividade de Água

A atividade de água foi determinada nas amostras de leite em pó, utilizando aparelho digital Aqualab, modelo CX-2 (Decagon Devices). As medidas foram repetidas cinco vezes para cada lote da amostra.

4.2.4 Determinação do Perfil Protéico

4.2.4.1 Preparo do tampão

O tampão foi preparado conforme descrito por Laemmli (1970). A concentração dos reagentes na amostra final (amostra + tampão) consistiu de: 0,0625 M Tris-HCl (pH=6,8), 2% SDS, 10% glicerol, 0,001% de azul de bromofenol e

5% de 2-mercaptoetanol. A solução Laemmli foi dividida em pequenas alíquotas e armazenada a -18 °C, até a sua utilização. O reagente 2-mercaptoetanol foi adicionado apenas na hora do uso.

4.2.4.2 Preparo da amostra e corrida eletroforética

A amostra de leite em pó foi diluída em água deionizada na concentração de 2 mg de proteína/mL. Após completa dissolução, a amostra foi misturada em proporção de 1:1 (v:v) a uma solução tampão (Laemmli sample buffer). A análise foi realizada em condições desnaturantes, sendo assim, a amostra final foi aquecida a 95 °C por 5 min e resfriada à temperatura ambiente.

Para a análise utilizou-se o sistema de eletroforese vertical Hoefer mini VE (Amersham Biosciences – EPS 301). Foi utilizado um padrão de peso molecular contendo 10 bandas de proteínas recombinantes (10 kD, 15 kD, 20 kD, 25 kD, 37 kD, 50 kD, 75 kD, 100 kD, 150 kD e 250 kD) da marca Bio-Rad. Aplicou-se 10 µL da amostra e 10 µL do padrão de peso molecular no gel e a corrida eletroforética foi conduzida a 90 V durante a migração da amostra pelo gel de empilhamento (4% de poliacrilamida) e 110 V durante a fase de migração pelo gel de resolução (13% de poliacrilamida). Finalizada a corrida utilizou-se o corante Coomassie Brilliant Blue (R-250) e o gel foi fotografado utilizando o equipamento Molecular Imaging, Locus Biotecnologia.

4.2.5 Determinação de Fosfolipídios

A concentração de fosfolipídio total foi calculada de acordo com a Equação 1, baseada no teor de fósforo total das amostras de leite em pó. Este método foi proposto por Czerniak e Szyk (2003) e foi utilizado como base a massa molar da fosfatidilcolina, o fosfolipídios presente em maior quantidade no leite.

A análise do fósforo total foi realizada pelo Laboratório SEBRAQ (Serviço Brasileiro de Análises Ambientais, Químicas e Biológicas), segundo a Instrução Normativa nº20, de 21 de julho de 1999 (BRASIL, 1999). O laboratório é credenciado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

$$\% \text{ Fosfolipídios} = \% \text{ Fósforo} \times \frac{PM_{FL}}{PM_F} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

PM_{FL} = Peso molecular da fosfatidilcolina (764g/mol)

PM_F = Peso molecular do fósforo (31g/mol)

4.2.6 Determinação do Potencial Poluente

As análises da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e Demanda Química de Oxigênio (DQO) foram realizadas pelo Grupo São Camilo, Laboratório de Alimentos e Água. Este laboratório é credenciado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e habilitado pela ANVISA/REBLAS do Ministério da Saúde. Foi utilizado o método especificado pela APHA (2005), como referência para a análise.

4.2.7 Acompanhamento Durante o Armazenamento

Para verificar as possíveis alterações físico-químicas e microbiológicas do leite em pó durante o seu armazenamento, as amostras foram incubadas em B.O.D. (Marconi, MA 415/S) a 25 °C, durante 10 meses. Essas amostras consistiam de aproximadamente 300g de leite em pó (Lote 4), acondicionadas assepticamente em embalagens plásticas individuais, posteriormente seladas e colocadas em caixa de papelão para proteção contra a luz. Foram realizadas análises de oxidação lipídica, determinação do pH e contagem de mesófilos aeróbios, no período de 0, 3, 6, 7, 8, 9 e 10 meses.

4.2.7.1 Oxidação lipídica

A quantidade de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico foi determinada de acordo com o método adaptado de Tarladgis *et al.* (1964), modificado por Crackel *et al.* (1988) e expressas em mg de malonaldeído/Kg de produto.

Este método consiste em detectar espectrofotometricamente a 530 nm o complexo de coloração vermelha formado pela condensação de dois moles do ácido 2-tiobarbitúrico com um mol de malonaldeído. O malonaldeído é obtido pela oxidação de lipídios poli-insaturados quando aquecidos em meio ácido. Como padrão para a análise quantitativa utilizou-se o 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) e a quantidade de amostra foi ajustada para 2,5g.

4.2.7.2 Análise do pH

As amostras foram reconstituídas a 12% em água destilada e homogeneizadas até completa dissolução antes da leitura em potenciômetro (BEL Engineering).

4.2.7.3 Contagem de mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis

A contagem foi realizada segundo a Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

Pesou-se 10g da amostra de leite em pó que foi homogeneizada em 90mL de água peptonada a 0,1%, compreendendo a diluição 10^{-1} . A partir da diluição inicial efetuaram-se as demais diluições. Foi semeado 1mL de cada diluição selecionada em placas de Petri estéreis e adicionado cerca de 15mL de meio PCA fundido. Após a solidificação as placas foram incubadas invertidas a 37 °C por 48 horas.

4.3 ESTUDO DA APLICAÇÃO DO LEITELHO EM PÓ EM UMA BEBIDA FERMENTADA

4.3.1 Preparo dos Inóculos

Foram pesados asepticamente 1,77% de cada cultura DVS liofilizada Yo-Flex ® (YF-L904 e YF-L812) e em seguida dissolvidas em 50mL de leite desnatado em pó previamente reconstituído a 10% e esterilizado (121 °C por 15 min). Após completa dissolução a solução foi fracionada em tubos eppendorf

esterilizados de 1mL e foram congelados a -18 °C. Sendo que 1mL dessa solução é capaz de fermentar 250mL de bebida.

A cultura probiótica *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* foi preparada da mesma forma que as culturas Yo-Flex ®. Porém a concentração utilizada para esta cultura foi de 2,5% de cultura liofilizada para 50mL de leite esterilizado, sendo esta concentração posteriormente utilizada para a fermentação de 250mL de bebida.

Para a fermentação, as culturas, foram descongeladas a temperatura ambiente, e adicionadas diretamente na bebida a ser fermentada.

4.3.2 Análises Físico-Químicas

4.3.2.1 Acidez titulável

A determinação de acidez titulável foi realizada conforme metodologia descrita na Instrução normativa nº68, de 12 de dezembro de 2006, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2006). Pesou-se 10 g da amostra em béquer de 50 mL, adicionou-se 10 mL de água destilada e 3 gotas do indicador fenolftaleína. A solução foi titulada com solução de hidróxido de sódio a 0,1 N, até aparição de coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos. Os cálculos foram realizados segundo a Equação 2.

$$\% \text{ Ácido Láctico} = \frac{V \times f \times 0,9}{m} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

V = volume da solução de hidróxido de sódio 0,1 N gasto na titulação, em mL;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 N;

0,9 = fator de conversão para ácido láctico;

m = massa da amostra, em gramas.

4.3.2.2 Susceptibilidade à sinérese

A susceptibilidade à sinérese foi obtida segundo método proposto por Singh e Byars (2009). Pesou-se 40g da amostra a ser analisada em tubo de centrífuga, sendo as análises realizadas em triplicata. Os tubos foram centrifugados, em centrífuga refrigerada marca Eppendorf – 5804R, a 1.000g durante 15 minutos a 8 °C. O soro separado foi retirado com o auxílio da pipeta automática e em seguida pesado.

A porcentagem de sinérese foi calculada de acordo com a Equação 3.

$$\% S = \frac{mS}{mT} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

mS = massa de soro, que foi separada do gel pela centrifugação

mT = massa total de gel que foi centrifugada

4.3.2.3 Capacidade de retenção de água

A capacidade de retenção de água (CRA) foi realizada conforme método descrito por Serra et al. (2009). Pesou-se 40g da amostra a ser analisada em tubo de centrífuga, sendo cada amostra analisada em triplicata. Os tubos foram centrifugados, em centrífuga refrigerada marca Eppendorf – 5804R, a 5.000g durante 20 minutos a 20 °C. O soro separado foi retirado com o auxílio da pipeta automática e em seguida pesado.

A porcentagem de CRA foi calculada de acordo com a Equação 4.

$$\% CRA = \frac{mS}{mT} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

mS = massa de soro, que foi separada do gel pela centrifugação

mT = massa total de gel que foi centrifugada

4.3.2.4 Viscosidade

A medida de viscosidade foi realizada em viscosímetro (Brookfield, modelo DV-II), utilizando-se os seguintes parâmetros: spindle S03, velocidade de rotação de 0,3 rpm, temperatura da amostra a 10 °C e quantidade da amostra de aproximadamente 250mL. Durante as análises, o torque foi mantido entre 10 e 100%, conforme recomendações do fabricante.

4.3.3 Comparação do Crescimento de *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* em Diferentes Meios

Para avaliar a capacidade do leiteiro como substrato para fermentação, foi comparado o crescimento do microrganismo *L. paracasei* em leite desnatado, soro de leite e no leiteiro. Os três meios de crescimento foram obtidos na forma em pó e foram reconstituídos a 12%. Os meios foram esterilizados em autoclave (121 °C por 15 min) e resfriados a 37 °C, onde foi inoculado o microrganismo, na concentração de 0,1g/L. A fermentação foi realizada em banho-maria com termostato digital (Marconi, modelo MA-127), na temperatura de 37 °C ± 0,3.

A fermentação foi acompanhada por um período de 20 horas. A cada hora foi realizada a análise de acidez, obtendo-se assim uma curva de acidificação para cada meio. Outro parâmetro analisado foi a contagem do microrganismo, realizada nos tempos 0 (inicial), 3, 6, 10, 14 e 20 horas, obtendo-se assim a curva de crescimento de *L. paracasei* para cada meio estudado.

A cinética de crescimento e acidificação durante a fermentação foi investigada através dos parâmetros de velocidade específica de crescimento (Equação 5) e do tempo de geração (Equação 6), segundo Oliveira et al. (2009). O tempo utilizado para os cálculos foi entre 3 e 10 horas, período no qual se desenvolveu a fase exponencial.

$$\mu_{max} = \frac{\ln N_f - \ln N_i}{t} \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

μ_{max} = velocidade específica de crescimento

t= tempo transcorrido (fase de crescimento exponencial)

N_i = n° inicial de células (UFC/mL)

N_f = n° final de células (UFC/mL)

$$tg = \frac{\ln 2}{\mu_{max}} \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

tg= tempo de geração

4.3.4 Estudo e Comparação das Culturas Yo-flex®

Foram seleccionadas duas culturas da linha Yo-flex® (Chr. Hansen) para a aplicação na bebida fermentada, YF-L812 e YF-L904. Essas culturas são constituídas das bactérias lácticas *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*. Quando aplicadas em lácteos fermentados conferem características como: rápida fermentação, baixa pós-acidificação, sabor suave, cremosidade, alta viscosidade e maior capacidade de produção de exopolissacarídeos (EPS).

Realizou-se um estudo comparativo entre as duas culturas como forma de verificar a melhor cultura para a utilização na bebida fermentada desenvolvida. Para tal, foram analisados os seguintes parâmetros: rapidez da fermentação, viscosidade, pós-acidificação, sinérese e capacidade de retenção de água (CRA). As análises de acidez e sinérese foram realizadas nos dias 1,7, 14, 21 e 28, sendo o armazenamento a 5 °C.

4.3.5 Desenvolvimento da Bebida Fermentada

4.3.5.1 Determinação das formulações

Três formulações foram definidas a partir de testes preliminares. Essas formulações foram produzidas tanto para a análise sensorial como para o acompanhamento da vida-de-prateleira.

Para melhor padronização todos os ingredientes utilizados estavam na forma em pó, entre eles, leite integral, leite e soro de leite. Todas as formulações foram reconstituídas a 14% de sólidos e 10% de açúcar cristal. Portanto, a Formulação 1 foi elaborada com 100% de leite integral, a Formulação 2 com 100% de leite e a Formulação 3 com 33% de leite integral, 33% de leite e 33% de soro de leite.

Para a fermentação adicionou-se as bactérias lácticas e *L. paracasei* e, após a quebra da coalhada foi acrescentada polpa de maracujá (4%) para todas as formulações.

4.3.5.2 Preparo das bebidas

As formulações foram produzidas de acordo com o fluxograma da Figura 7.

Os ingredientes para cada formulação foram pesados em balança semi-analítica e acondicionados em frascos adequados, previamente limpos e esterilizados. Utilizou-se água destilada para a reconstituição dos ingredientes e, em seguida, foi feita a homogeneização para completa dissolução. Em seguida, procedeu-se o tratamento térmico, que foi conduzido em banho-maria a 85 °C por 30min. Após o tratamento térmico as misturas foram resfriadas até temperatura de 42 °C, onde as culturas lácticas e o *L. paracasei* foram inoculadas assepticamente. As culturas se encontravam armazenadas à temperatura de -18 °C, antes do uso, foram retiradas e deixadas à temperatura ambiente até total descongelamento.

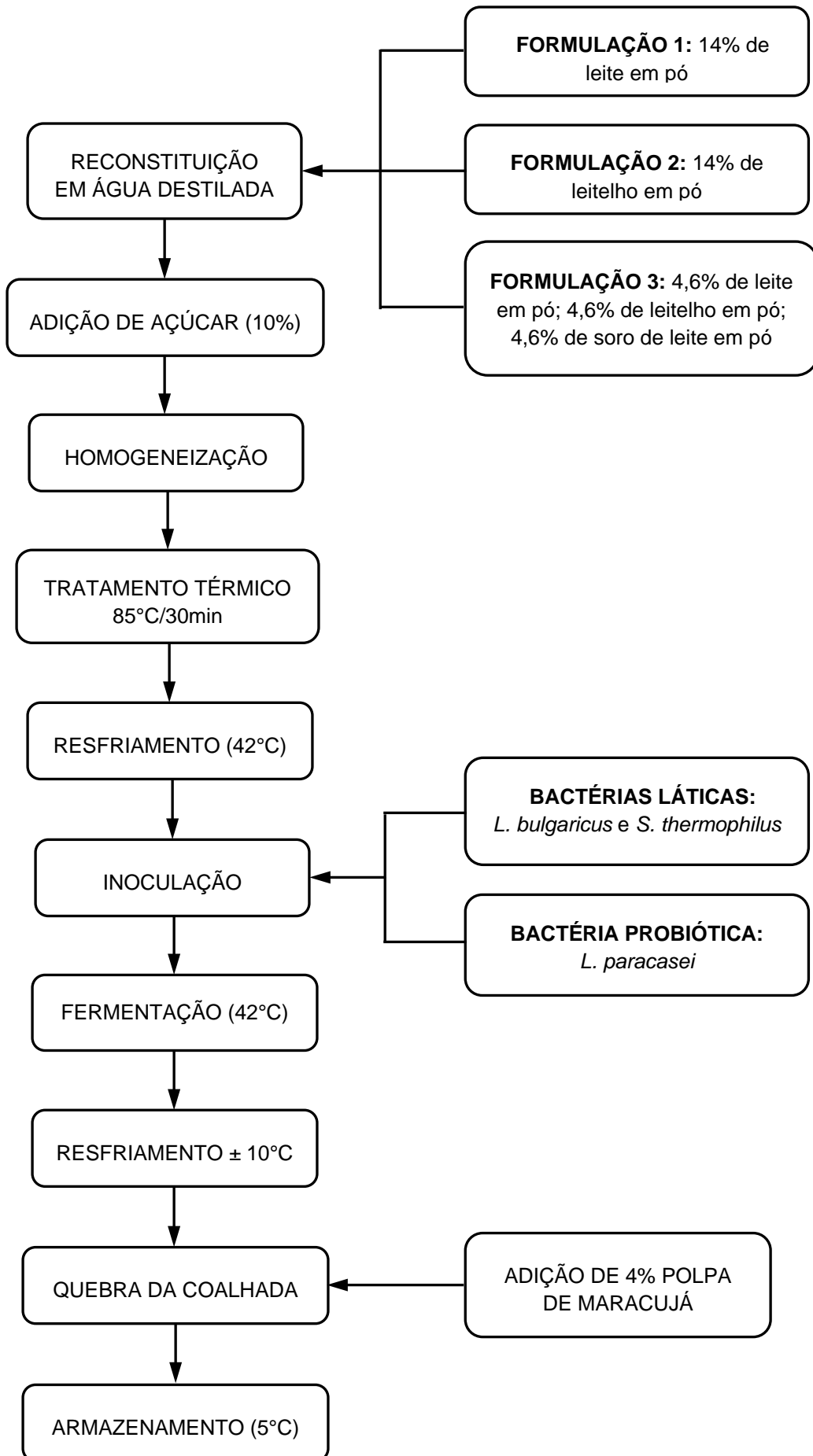


Figura 7 – Fluxograma de produção das bebidas fermentadas

Os frascos foram levados à estufa com circulação de ar (Labstore), previamente regulada à 42 °C. O ponto final da fermentação foi determinado pela % de acidez das bebidas, sendo no mínimo 0,60g de ácido láctico/100mL de bebida (BRASIL, 2007). Depois de atingida a acidez desejada, as bebidas foram resfriadas até 10 °C e, após procedeu-se a quebra da coalhada, com uma agitação leve. Adicionou-se de forma asséptica, 4% de polpa de maracujá e foi homogeneizado. As bebidas fermentadas foram armazenadas em câmara fria a 5 °C até o momento da análise sensorial.

4.3.5.3 Contagem e diferenciação dos microrganismos incorporados à bebida fermentada

Para determinação das células viáveis foram utilizados meios seletivos para cada microrganismo adicionado às bebidas fermentadas.

Para enumeração do *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* foi utilizado o meio de cultura M 17. A inoculação foi realizada em profundidade, sendo semeado uma alíquota de 1mL de cada diluição selecionada. As placas foram incubadas invertidas em aerobiose a 37 °C por 48 horas.

Para enumeração de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* foi utilizado o meio MRS acidificado (pH=5,4), utilizando-se ácido clorídrico para a diminuição do pH do meio. A inoculação foi realizada por profundidade e as placas foram incubadas invertidas em jarras contendo gerador de anaerobiose (PROBAC - Anaerobac) a 37 °C por 72 horas.

Para a enumeração do *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* utilizou-se o meio MRS adicionado de vancomicina. Foi preparada uma solução de vancomicina a 0,05%, sendo esta esterilizada por filtração em membrana Millipore 0,45µm. Após a esterilização do meio em autoclave (121 °C por 15 min) adicionou-se assepticamente 2mL desta solução para cada 1000mL de meio. A inoculação foi feita em profundidade e as placas foram incubadas invertidas em aerobiose a 37 °C por 48 horas.

4.3.5.4 Vida-de-prateleira das bebidas fermentadas

As três formulações foram armazenadas a 5 °C por um período de 28 dias. As bebidas foram analisadas nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 quanto ao valor de acidez e sinérese. No primeiro dia também foram realizadas análises de extrato seco total (AOAC, 1995) e extrato seco desengordurado (AOAC, 1995). A determinação das células viáveis de *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei*, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* foi realizada no primeiro e último dia de armazenamento.

4.4 ANÁLISE SENSORIAL

As três formulações desenvolvidas foram submetidas à análise sensorial por uma equipe de 60 provadores não treinados. Todas as bebidas foram analisadas microbiologicamente antes da análise sensorial e todas estavam de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Instrução Normativa nº46, de 23 de outubro de 2007, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2007). A análise foi realizada no laboratório de análise sensorial da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Os provadores avaliaram o quanto gostaram ou desgostaram dos produtos, utilizando escala hedônica estruturada de sete pontos, variando do valor máximo (7 = Gostei muito) até o valor mínimo (1 = Desgostei muito). Os atributos avaliados foram sabor, textura, aroma e avaliação global. Além disso, solicitou-se na ficha que os provadores assinalassem a intenção de compra de sua amostra preferida (Apêndice 1).

O teste foi conduzido em cabines individuais, onde os provadores receberam cerca de 40mL de cada amostra, armazenadas a temperatura de 8 °C. As amostras estavam codificadas com números aleatórios de três dígitos.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir dos resultados obtidos, nas análises de velocidade específica e tempo de geração do *L. paracasei*, sinérese, acidez, contagem média das células viáveis de *S. thermophilus* e *L. paracasei* e média das notas atribuídas

pelos provadores para os atributos sensoriais, foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação entre as médias. Em todas as análises foi considerado nível de significância de 5%.

Para avaliação dos dados obtidos foi utilizado o programa *Statistica* 7.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LEITELHO EM PÓ

5.1.1 Composição Proximal

Os resultados, médias e desvios-padrão das análises de sólidos totais, proteínas, lipídios, lactose e cinzas foram obtidos de quatro diferentes lotes de leite em pó (Tabela 5).

Tabela 5 – Composição proximal do leite em pó

Amostra	Sólidos totais	Proteína	Lipídios	Lactose	Cinzas
Lote 1	96,53 ± 0,01 ^a	32,07 ± 0,09 ^a	6,22 ± 0,00 ^a	53,53 ± 0,05 ^{ab}	7,54 ± 0,00 ^a
Lote 2	96,50 ± 0,07 ^a	33,30 ± 0,39 ^b	4,97 ± 0,00 ^b	53,74 ± 0,10 ^a	7,76 ± 0,01 ^b
Lote 3	96,29 ± 0,04 ^b	32,96 ± 0,05 ^b	4,15 ± 0,00 ^c	53,70 ± 0,22 ^a	7,70 ± 0,01 ^b
Lote 4	96,43 ± 0,10 ^{ab}	31,51 ± 0,07 ^a	6,91 ± 0,05 ^d	52,61 ± 0,05 ^b	7,50 ± 0,04 ^a

* Valores em base seca (g/100g), exceto para sólidos totais

** Médias seguidas com letras diferentes na mesma coluna diferiram entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Esses resultados foram comparados com valores obtidos em estudos publicados anteriormente (Tabela 6). Os valores apresentados na tabela representam as médias dos lotes analisados.

A composição do leite em pó consiste dos componentes presentes na fase aquosa do creme, entre eles as proteínas, lactose, minerais e a membrana do glóbulo de gordura do leite (MGGL). Os autores afirmam que devido à sua composição única, o interesse na sua aplicação em sistemas alimentares vem crescendo (MORIN et al., 2005).

De acordo com Gassi et al. (2008), em grande parte dos estudos encontrados na literatura as características do leite em pó não são adequadamente descritas. A forma em que é processado (processo contínuo ou batelada; bateção rápida ou bateção lenta), sua origem (creme com maturação ou creme sem maturação; creme cru ou creme pasteurizado) e sazonalidade afetam diretamente a sua composição. Apenas alguns trabalhos apresentam a composição do leite em pó

industrial, especificando os efeitos causados pelo tratamento térmico do creme, origem, tecnologia aplicada, entre outros. Sodini et al. (2006) observaram diferenças significativas entre a composição do leite comercial e o leite produzido na planta piloto (Dairy Products Technology Center – DPTC), especialmente quanto ao teor de lipídios.

Tabela 6 – Comparação de médias dos valores de composição proximal encontrados na literatura

	Sólidos totais	Proteína	Lipídios	Lactose	Cinzas
Média dos lotes	96,44	32,46	5,56	53,39	7,62
Sodini et al.	-	33,00	6,45	53,1	7,45
Trachoo e Mistry	95,83	31,45	7,43	50,02	6,93
Astaire et al.	-	35,46	4,56	52,49	7,49
Dairy Management	96,5 – 97,0	32,0 – 34,5	5,5 – 6,0	49,5 – 50,5	7,5 – 8,0
Vanderghem et al.	-	25 – 36,5	4,6 – 14,5	48,1 – 57,2	5,6 – 8,4

* Valores em base seca (g/100g), exceto para sólidos totais

** Sodini et al. (2006); Trachoo e Mistry (1998); Astaire et al. (2003); Dairy Management Inc. (www.dairyinfo.com); Vanderghem et al. (2010).

A composição do leite em pó é similar a composição do leite desnatado em pó (SPENCE et al., 2009), no entanto possui um maior conteúdo de lipídios e de fosfolipídios. Segundo Morin et al. (2008), o leite possui um teor de fosfolipídios de 8 a 10 vezes maior que o leite desnatado.

O leite analisado no estudo apresentou variação de 31,51% a 33,30% de proteínas. De acordo com Sodini et al. (2006), o teor de proteína do leite em pó é ligeiramente menor do que o teor de proteína encontrado no leite desnatado em pó. Uma pequena fração das proteínas do creme permanece na manteiga após o processo de bateção. Morin et al. (2008), também observaram que, em média, a concentração de proteína é ligeiramente menor no leite (3,12%) que no leite desnatado (3,27%), sugerindo a retenção da proteína no processo de bateção do creme.

Quanto ao teor de lipídios a variação encontrada foi de 4,15 a 6,91%, sendo o parâmetro que mais variou entre os lotes analisados. O conteúdo de

lactose variou de 52,61% a 53,74% e o conteúdo de cinzas entre 7,50% a 7,76%, sendo o parâmetro com menor variabilidade.

5.1.2 Análises de pH e Atividade de Água

A variação do pH entre os lotes analisados foi de 6,54 a 6,62 e a variação da Aa de 0,263 a 0,344 (Tabela 7).

Tabela 7 – Valores do pH e atividade de água do leite

Análises	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
pH	6,54 ± 0,01 ^a	6,58 ± 0,00 ^b	6,57 ± 0,09 ^b	6,62 ± 0,01 ^c
Aa	0,263 ± 0,02 ^{ac}	0,235 ± 0,0061 ^a	0,304 ± 0,0065 ^b	0,274 ± 0,006 ^{bc}

** Médias seguidas com letras diferentes na mesma linha diferiram entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Sodini et al. (2006), encontraram valores semelhantes de pH no leite em pó reconstituído a 4% de proteína (p/p). Os autores analisaram três lotes diferentes e os valores encontrados foram de 6,46, 6,59 e 6,61. Wong e Kitts (2003a) obtiveram o valor médio de pH de 6,5 para o leite em pó reconstituído a 5% de proteína.

A variação da atividade de água (Aa) foi de 0,235 a 0,304 para as amostras de leite em pó. Loyd et al. (2009), encontraram valores de Aa que variaram de 0,110 a 0,240 para leite integral em pó. Os autores também observaram que o produto pode apresentar valores de umidade e Aa superiores se produzidos durante a primavera e o verão.

Esses valores baixos de atividade de água são restritivos para o crescimento de microrganismos, embora estes possam sobreviver. Porém, em valores de atividade de água entre 0,2 a 0,4, algumas alterações químicas podem ocorrer, especialmente a oxidação lipídica (AZEREDO, 2004). Conforme a água é retirada de um alimento, a velocidade de oxidação de lipídios costuma diminuir. No entanto, acredita-se que em atividade de água inferior a 0,3 ocorra uma aceleração dessa reação, possivelmente devido à perda da camada de água de solvatação que recobre os hidroperóxidos lipídicos (MCCLEMENTS e DECKER, 2010).

5.1.3 Caracterização do Perfil Protéico

As amostras de leite em pó foram analisadas em triplicata para a determinação do perfil proteico por SDS-PAGE (Figura 8).

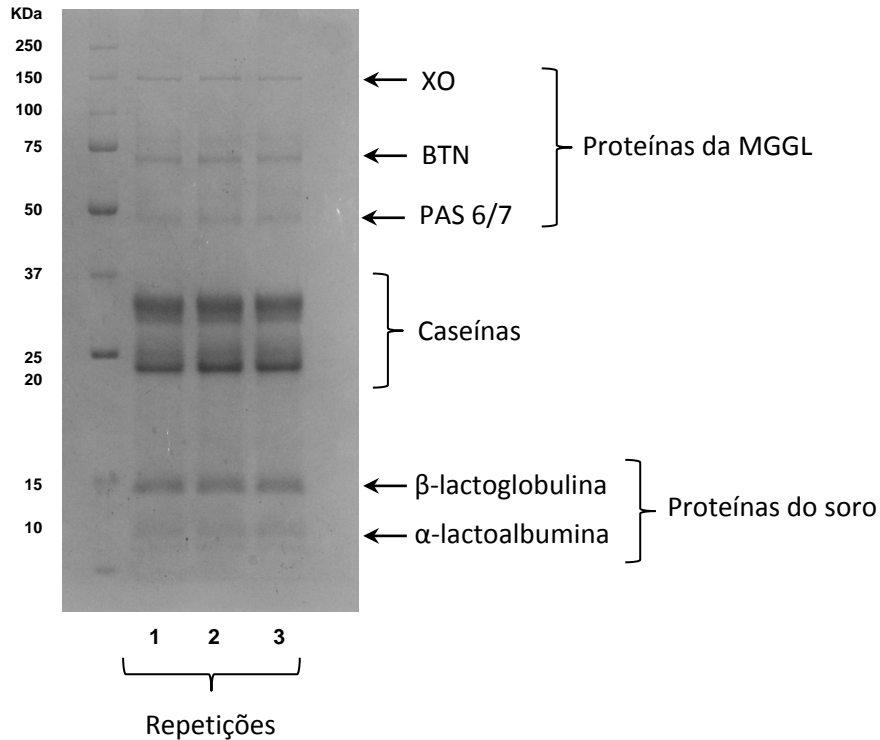


Figura 8 – Perfil proteico do leite em pó obtido por SDS-PAGE (13% de poliacrilamida). XO: xantina oxidase; BTN: butirifilina; PAS 6/7: ácido periódico de Schiff 6/7.

O resultado da análise permite observar a separação de três grupos de proteínas: as proteínas da MGGL, xantina oxidase (150 KDa), butirifilina (67 KDa) e PAS 6/7 (43-59 KDa) (MATHER, 2000), as caseínas e as proteínas do soro (β -lactoglobulina e α -lactoalbumina). Diversos autores obtiveram perfis proteicos para leite semelhante ao analisado no presente estudo (CORREDIG e DALGLEISH, 1997; MORIN et al., 2005; SODINI et al., 2006; MORIN et al., 2007; MORIN et al., 2008; COSTA, 2008).

Observando-se a intensidade das bandas no perfil SDS-PAGE (Figura 8), pode-se concluir que as caseínas representam a maior quantidade de proteínas presentes na amostra de leite. As proteínas do soro aparecem em quantidade intermediária e as proteínas da MGGL em menor quantidade.

Britten et al. (2008), estudaram os efeitos na composição proteica do leiteiro proveniente de cremes com diferentes tratamentos. Os autores observaram que para o leiteiro derivado do creme sem lavagem (processamento normal), as proporções das proteínas foram de aproximadamente, 19% das proteínas da MGGL, 59% de caseínas e 23% de proteínas do soro. Para o leiteiro derivado do creme previamente lavado a concentração de proteínas da MGGL foi proporcionalmente duplicada, a concentração de caseínas diminuiu 27% e a concentração de proteínas do soro não foi muito alterada.

Malin et al. (1994), observaram proporções semelhantes em análise densitométrica do perfil SDS-PAGE do leiteiro em pó. Os autores encontraram 10% de proteínas da MGGL, 67,67% de caseínas e 22,32% de proteínas do soro.

Os subprodutos da indústria láctea, como o leiteiro e o soro de queijo, são fontes ricas de material da MGGL (COSTA et al., 2009). A MGGL é composta principalmente por proteínas e fosfolipídios que possuem potencial aplicação como ingrediente funcional e nutricional. Recentemente diversas pesquisas estão sendo conduzidas com o objetivo de concentrar os componentes da MGGL, através da aplicação de tratamentos como, microfiltração (MORIN et al., 2005; CORREDIG et al., 2003) e microfiltração associada à extração com fluido supercrítico (ASTAIRE, 2003; SPENCE et al., 2009), sendo estas as principais.

5.1.4 Concentração de Fosfolipídios Totais

Os resultados das análises de fósforo e os valores obtidos de fosfolipídios totais estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8 – Valores obtidos de fósforo, lipídio e fosfolipídio das amostras de leiteiro em pó

ANÁLISES (%)	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Fósforo	0,02	0,09	0,04	0,05
Lipídios	6,22	4,97	4,15	6,91
Fosfolipídio Total	0,51	2,3	1,02	1,28

A variação da porcentagem de fosfolipídio total nos lotes analisados foi de 0,51 a 2,3%. Sodini et al. (2006), encontraram valores de fosfolipídios totais que variaram de 1,15 a 1,87% (em base seca), em 5 lotes de leite em pó, sendo 2 lotes comerciais e 3 lotes produzidos em planta piloto.

Na Tabela 9 estão demonstrados valores de fosfolipídios presentes em diferentes produtos lácteos. Segundo Dewettinck et al. (2008), durante o processamento, os lipídios polares (fosfolipídios e esfingolipídios) migram preferencialmente para a fase aquosa, como no caso do leite e do subproduto obtido na fabricação da gordura anidra do leite (“butter serum”).

Tabela 9 – Conteúdo de lipídios polares em diferentes produtos lácteos

Produto	Lipídios polares (g/100g)	Lipídios polares em base seca (g/100g)
Leite cru	0,03-0,04	0,23-0,32
Leite desnatado	0,02	0,28
Creme	0,19	0,40
Creme pasteurizado	0,14	0,31
Manteiga	0,14-0,23	0,17-0,26
Leitelho	0,16	2,03
Butter serum *	1,25	11,54

* Butter serum: subproduto obtido na fabricação da gordura anidra do leite
Fonte: Dewettinck et al. (2008)

Comparando os resultados de fosfolipídios com o teor de lipídios de cada amostra de leite em pó (Tabela 8), pode-se verificar que estes valores não estão relacionados, ou seja, a amostra com maior teor de lipídios não necessariamente possui o maior teor de fosfolipídio total. Os resultados obtidos por Sodini et al. (2006), também demonstraram este comportamento.

5.1.5 Potencial Poluente do Leite

As análises de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e Demanda Química de Oxigênio (DQO) foram realizadas para determinar a carga poluente do leite.

A DBO representa a medida do oxigênio dissolvido utilizada pelos microrganismos na oxidação bioquímica da matéria orgânica. A DBO é então empregada na determinação da quantidade aproximada de oxigênio que será necessária para oxidar biologicamente a matéria orgânica presente (BRAILE e CAVALCANTI, 1979; SANTOS, 2004). A DQO é usada como uma medida do oxigênio equivalente ao conteúdo de uma amostra que é susceptível à oxidação por um oxidante químico forte (SANTOS, 2004; SEIXAS, 2006).

O leite obtido no experimento apresentou valores de DBO de 80.450 mg/L e DQO de 120.900 mg/L. Os valores encontrados são altos se comparados a outros produtos da indústria, como, leite, soro, iogurte, queijo (Tabela 10).

Tabela 10 – Valores de DBO e DQO de produtos lácteos

PRODUTOS	DBO	DQO
Leite (estudo)	80.450	120.900
Leite ¹	-	56.736,47
Leite integral ²	100.000	-
Soro de leite ²	30.000 a 60.000	-
Queijo, leite em pó e creme ³	1.900	3.390
Queijo, sorvete, creme e iogurte ³	4.800	12.000
Leite pasteurizado e creme ³	1.200 – 4.000	2.000 – 6.000

* Valores expressos em mg/L

¹ Queji et al. (2007); ² Matos (2005); ³ Machado et al. (1999)

Silva et al. (2006), analisaram efluentes lançados por um laticínio situado na Zona da Mata, pertencente ao município de Viçosa (MG). Produtor de leite pasteurizado, queijo, mussarela, queijo frescal, requeijão, manteiga, doce de

leite e iogurte, o laticínio processa em média cerca de 15 mil litros de leite/dia. No caso da manteiga, foram identificados os pontos onde o consumo de água e a geração de efluentes são mais acentuados: higienização de equipamentos e utensílios (latões, tanque de maturação, batedeira e envasadeira), descarte do leite e a água de lavagem da manteiga. Dentre os tipos de resíduos gerados para a fabricação da manteiga destacam-se os seguintes resíduos: creme, leite, lactose, manteiga, detergente e soda. Como forma de minimizar estes resíduos os autores sugerem o reaproveitamento do leite na alimentação animal ou na aplicação em alimentos.

O leite e o soro podem causar grandes danos ao meio ambiente, pois possuem alto teor de lactose (AMRANE, 2001). Estes efluentes ao chegarem aos riachos, rios e lagoas, entram em decomposição biológica, um processo normal causado pelos microrganismos presentes no meio natural. Nessa etapa, há redução da concentração do oxigênio dissolvido na água, que tem como resultado o desequilíbrio da vida aquática, podendo até causar a mortalidade de peixes nos rios (PIVARO, 2008 e SILVA et al., 2006).

Atualmente o soro possui diversas aplicações alimentícias, como por exemplo, produtos de panificação, sobremesas congeladas, chocolates, fórmulas infantis, produtos à base de queijo, bebidas nutricionais, leites fermentados, entre outras aplicações em alimentos processados (VALDUGA et al., 2006).

No caso do leite, o seu reaproveitamento no Brasil ainda é restrito. Quando não descartado com os efluentes industriais, o leite pode ser destinado à ração animal ou como ingrediente alimentar em produtos como bebidas lácteas, iogurtes, margarina, sorvete, queijo, entre outros (ver Tabela 4).

Existe grande interesse econômico no aproveitamento de subprodutos, pois geram altos custos de descarte para a indústria. A utilização do leite como um ingrediente alimentar nutricional e funcional, pode aumentar seu valor econômico, assim como reduzir os custos da eliminação de resíduos da indústria (WONG e KITTS, 2003a; VALDUGA et al., 2006).

5.1.6 Acompanhamento Durante o Armazenamento

5.1.6.1 Oxidação

A oxidação lipídica é uma das alterações mais importantes em alimentos durante o período de estocagem. Esta reação não apenas diminui o tempo de vida e o valor nutritivo dos produtos alimentares, como podem gerar compostos nocivos (SILVA et al., 1999). Fatores como grau de instauração dos lipídios, oxigênio, luz, metais (endógenos e exógenos), constituintes da MGGL, temperatura de estocagem e atividade de água, afetam a taxa de oxidação de alimentos ricos em lipídios (AZEREDO, 2004; FOX, 1995).

O leiteiro pode ser altamente susceptível à oxidação lipídica. Sua grande concentração de fosfolipídios insaturados (especialmente a fosfatidiletalona) pode se ligar aos íons metálicos de maneira pró-oxidante. A presença do complexo metal-fosfolipídio em uma interface óleo-água pode facilitar a formação de lipídio hidroperóxido (ALLEN e HAMILTON, 1994). Segundo Fox (1995), o fosfolipídio fosfatidiletalona se liga fortemente ao Cu^{2+} , aumentando sua susceptibilidade à oxidação.

Devido a esses fatores realizou-se uma curva de oxidação lipídica, determinada pelo método de TBARS, do leiteiro em pó armazenado durante 10 meses à 25 °C (Gráfico 1). Segundo Fox (1995), a determinação da oxidação lipídica por este método tem sido amplamente utilizada para determinar o progresso da auto-oxidação em produtos lácteos.

Pelos resultados obtidos no presente estudo, expressos em gramas de malonaldeído, pode-se observar um aumento da oxidação durante o armazenamento. Até o 8º mês não ocorreram grandes mudanças nos valores de oxidação, porém, após esse período observa-se um aumento exponencial.

Hall e Hedrick (1971), afirmam que a qualidade do leiteiro em pó durante a estocagem é relativamente curta, de 1 a 3 meses. Os possíveis motivos atribuídos são o conteúdo de lipídios, contaminação com metais e deterioração bacteriológica antes do processo de secagem. No entanto, Ziemer et al. (1962), apud Hall e Hedrick (1971), relataram que algumas amostras de leiteiro em pó comercial analisadas mantiveram boas características de sabor por mais de 1 ano, à temperatura ambiente.

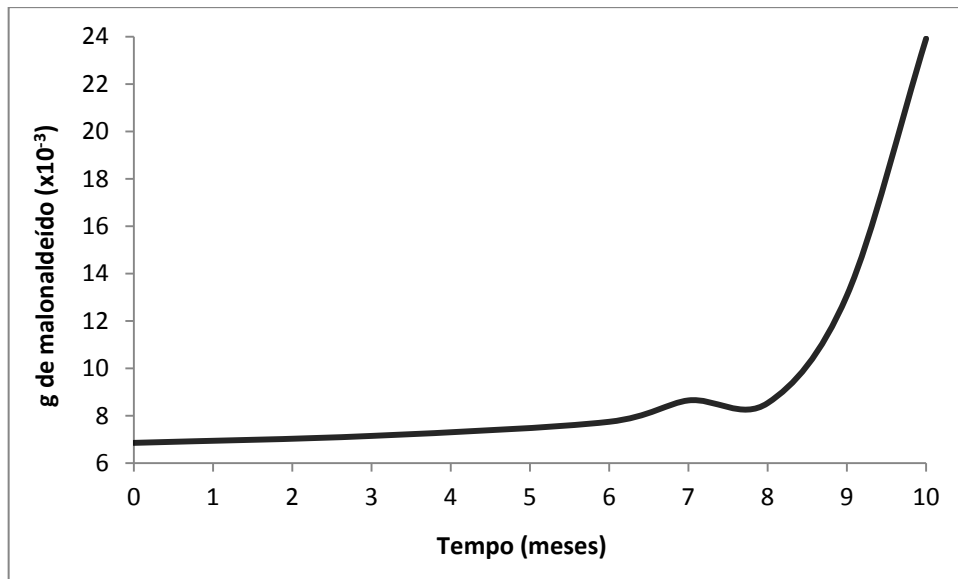


Gráfico 1 – Valores da oxidação (g de malonaldeído) do leite em pó durante o tempo de estocagem a 25 °C.

Segundo Webb e Whittier (1970), o conteúdo de fosfolipídios do leite em pó torna o produto relativamente sensível ao aquecimento, portanto, o resfriamento pode ser vantajoso como forma de manter sua qualidade. O leite em pó possui pouca estabilidade durante o armazenamento, pois é rapidamente oxidado, sendo recomendado o seu uso o mais imediato possível. Os autores também afirmam que o leite em pó possui uma vida-de-prateleira mais curta se comparado com o leite integral em pó.

Segundo McClements e Decker (2010), a cinética de oxidação de lipídios nos alimentos costuma apresentar uma fase *lag* seguida pelo aumento exponencial da taxa de oxidação. A extensão da fase *lag* é muito importante para processadores de alimentos, já que esse é o período em que a rancidez ainda não é detectada e a qualidade do alimento é preservada. Uma vez que a fase exponencial é alcançada, a oxidação de lipídios e o desenvolvimento de aromas indesejáveis ocorrem com rapidez. Os autores afirmam que uma possível explicação para a ocorrência da fase exponencial seria que, após a decomposição dos hidroperóxidos lipídicos, estes produzem radicais adicionais, sendo estes responsáveis pelo aumento exponencial da oxidação observada após a fase *lag*.

A degradação dos hidroperóxidos gera produtos voláteis, como aldeídos, cetonas e álcoois, sendo estes os responsáveis pelo desenvolvimento da

rancidez oxidativa. Muitos desses produtos, especialmente os de cadeia curta, têm limiares de percepção muito baixos, tornando o produto inaceitável, mesmo em baixíssimas concentrações (AZEREDO, 2004).

Spill (2002), apud Jinjara et al. (2006), avaliou os atributos sensoriais do leite reconstituído e a influência de diversos processos e condições de temperatura nesses atributos. O autor verificou que o armazenamento em alta temperatura, e o tempo de estocagem, estavam associados ao aparecimento dos sabores oxidado, papelão e adstringente.

Spill (2002), apud Jinjara et al. (2006), observou um aumento no sabor e aroma de papelão em amostras armazenadas a 50 °C por duas semanas. O autor, afirmou que o tempo de armazenamento está relacionado à oxidação, ao aumento do sabor e aroma de papelão e a adstringência. No entanto, para as amostras que foram processadas em altas temperaturas o sabor oxidado aumentou, porém em menor quantidade. O autor obteve resultados que indicam que o leite em pó é mais resistente à oxidação que o leite líquido. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Jinjara et al. (2006), onde o leite em pó apresentou maior quantidade de atributos desejáveis se comparado com o leite líquido.

Fox (1995), afirma que a xantina oxidase, uma metaloproteína abundante na MGGL, pode ser responsável pela susceptibilidade da membrana à oxidação lipídica. O mecanismo de ação pró-oxidante da xantina oxidase não é completamente entendido. Segundo McClements e Decker (2010), os pró-oxidantes podem acelerar a oxidação de lipídios por interação direta com ácidos graxos insaturados para a formação de hidroperóxidos lipídicos ou para a promoção da formação de radicais livres.

De acordo com Allen e Hamilton (1994), em leite e derivados, a pasteurização a 80 °C é efetiva na redução dos efeitos pró-oxidantes da lactoperoxidase e da xantina oxidase. Segundo Wong e Kitts (2003b), a atividade pró-oxidante da xantina oxidase em alimentos pode variar, dependendo da presença da enzima superóxido dismutase (antioxidante). Hill (1979), apud Fox (1995), investigou o mecanismo de ação da xantina oxidase. Ele propôs que a enzima lactoperoxidase catalisa a oxidação lipídica gerando um aldeído, que se torna substrato para a ação da xantina oxidase. Em troca, a xantina oxidase gera o peróxido de hidrogênio utilizado pela lactoperoxidase como agente oxidante.

Por outro lado, alguns estudos demonstram que o leite em pó pode ser utilizado em alimentos por sua ação antioxidante. Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, numa concentração consideravelmente menor que a do substrato oxidável, retardam o ranço oxidativo, diminuindo a velocidade da reação ou prolongando o seu período de indução (SILVA et al., 1999).

De acordo com Wong e Kitts (2001), o íon ferroso (Fe^{2+}) é conhecido como uma forma biologicamente ativa de ferro, devido a sua potente atividade oxidante. Na presença de lipídios, o Fe^{2+} induz à oxidação lipídica, ocasionando a formação de *off flavors* e *off odors* em alimentos. Já o íon férrico (Fe^{3+}) é a forma biologicamente inativa do ferro. No entanto, o Fe^{3+} pode ser reduzido para a forma ativa Fe^{2+} , por agentes redutores, como ácido ascórbico e algumas plantas fenólicas. A quelação ou sequestro do ferro livre pode prevenir a reação de oxidação induzida pelo ferro. No estudo realizado por pelos autores, o leite em pó teve uma maior afinidade de ligação com o íon Fe^{2+} . Todos os níveis de leite em pó testados foram capazes de se ligar entre 60 e 90% com o Fe^{2+} e no máximo 55% com o Fe^{3+} . Foi concluído no estudo que o leite em pó demonstrou uma habilidade excepcional em solubilizar o ferro por quelação.

O efeito primário dos metais é o de aumentar a taxa de geração de radicais livres. Os metais podem, ainda, promover oxidação de produtos secundários da reação. Podem também, transformar compostos fenólicos com capacidade antioxidante em quinonas, inativando-as pela oxidação (AZEREDO, 2004).

Wong e Kitts (2003b), concluíram em estudo posterior, que o leite em pó foi eficaz em produzir um efeito antioxidante, pela ação como agente redutor no sequestro do peróxido e do radical hidroxila e ao sequestrar os íons Fe^{2+} e Fe^{3+} . Os autores ressaltaram que o potencial antioxidante das proteínas derivadas de produtos lácteos é comprovado por diversos estudos. A atividade antioxidante das proteínas do leite foi proposta, em parte, devido à capacidade de sequestrar metais como ferro e cobre pelos resíduos fosfoseril localizados na superfície da micela de caseína. Outros estudos têm sugerido que as proteínas do soro doam hidrogênio para reduzir os radicais livres e que grupos de sulfidrilas livres da cisteína são efetivos na inibição da auto-oxidação lipídica. A presença de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase e catalase) e de antioxidantes não enzimáticos (tocoferol, carotenoides, citrato, fosfato e ácido ascórbico) no leite também contribuem com essa capacidade antioxidante.

5.1.6.2 Valores de pH e atividade de água

No decorrer do tempo de armazenamento o valor de pH não sofreu grande alteração, variando de 6,64 a 6,50. Os valores de atividade de água também não tiveram grandes mudanças, variando em média entre 0,275 e 0,403.

Jinjarak et al. (2006), utilizaram no estudo o leite doce e obtiveram valor de pH de 6,5. Gonzalez et al. (2009), encontraram valor de pH de 6,4 para o leite utilizado no estudo.

5.1.6.3 Contagem de aeróbios mesófilos

Segundo a Portaria nº146, de 7 de março de 1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, os parâmetros aceitáveis de microrganismos aeróbios mesófilos são: $m=30.000$, $M=100.000$, $n=5$, $c=2$. Por falta de legislação do produto leite em pó, utilizou-se como base a legislação para leite em pó. Todas as amostras analisadas durante o período de armazenamento se mantiveram adequadas, de acordo com esse parâmetro microbiológico.

5.2 APLICAÇÃO DO LEITELHO EM PÓ EM UMA BEBIDA FERMENTADA

Para a elaboração de uma bebida fermentada, nas três formulações propostas, utilizou-se as culturas tradicionais, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, e a cultura probiótica *L. paracasei*. Esta combinação de microrganismos foi utilizada para otimizar o tempo de fermentação das bebidas.

Alguns probióticos possuem baixa atividade proteolítica, sendo necessário um maior tempo de fermentação para reduzir o pH para 4,5, devido ao crescimento lento. Consequentemente, as bactérias lácticas do iogurte (*L. bulgaricus* e *S. thermophilus*) são adicionadas em combinação com as bactérias probióticas, de forma a reduzir o tempo de fermentação e melhorar o sabor, corpo e textura do produto final (DAVE e SHAH, 1997; DAVE e SHAH, 1998).

Segundo Kristo et al. (2003), a fermentação com o microrganismo *Lactobacillus paracasei* em conjunto com culturas tradicionais pode ser realizada com sucesso para a produção de uma bebida fermentada probiótica.

5.2.1 Curva de Crescimento e Acidificação de *L. paracasei* em Diferentes Meios

O microrganismo *L. paracasei* tem sido amplamente utilizado em produtos lácteos fermentados e na fabricação de queijos. A sua colonização do trato gastrointestinal é comprovada e como uma bactéria probiótica gera diversos benefícios à saúde humana. (ZHANG et al., 2011).

A taxonomia do *Lactobacillus casei* e do *Lactobacillus paracasei* foi discutida por um longo tempo e apenas no ano de 2008 foi definida pelo “Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Bacteria”. Como resultado, foi definido que os nomes das duas espécies são válidos, com ATCC 393^T sendo o *L. casei* e ATCC 25302^T sendo o *L. paracasei*. Esta classificação é importante, pois muitas cepas probióticas comercializadas como *L. casei*, na verdade, são mais similares à cepa de *L. paracasei* (CHARALAMPOPOULOS e RASTALL, 2009).

No presente estudo foi avaliado o crescimento e a curva de acidificação do microrganismo *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* nos meios contendo leiteiro, leite desnatado e soro de leite, preparados conforme especificado no material e métodos (Gráficos 2, 3 e 4).

A temperatura utilizada para o crescimento do microrganismo foi de 37 °C ± 0,3 e a fermentação foi conduzida em banho-maria com termostato, para que a temperatura fosse mantida constante, independente de fatores externos. Kristo et al. (2003), obtiveram maior crescimento de *L. paracasei* em temperaturas entre 36-38°C. Saarela et al. (2000), afirmam que a temperatura de fermentação entre 37°C e 40°C é a faixa onde maior parte dos microrganismos probióticos possuem melhor taxa de multiplicação.

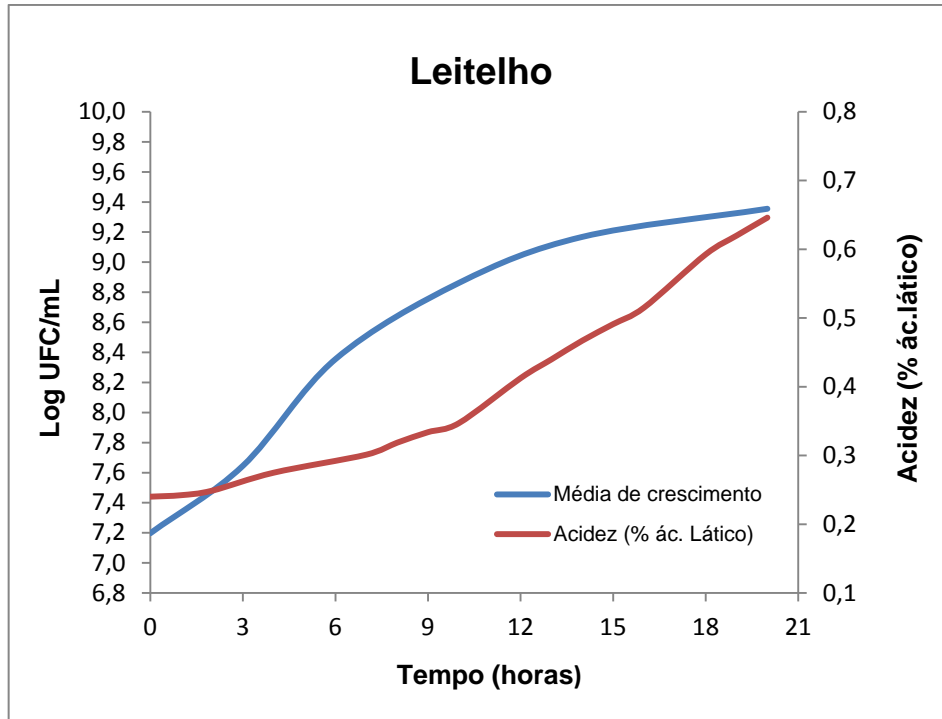


Gráfico 2 – Curva de crescimento e acidificação de *L. paracasei* no meio constituído de leiteiro.

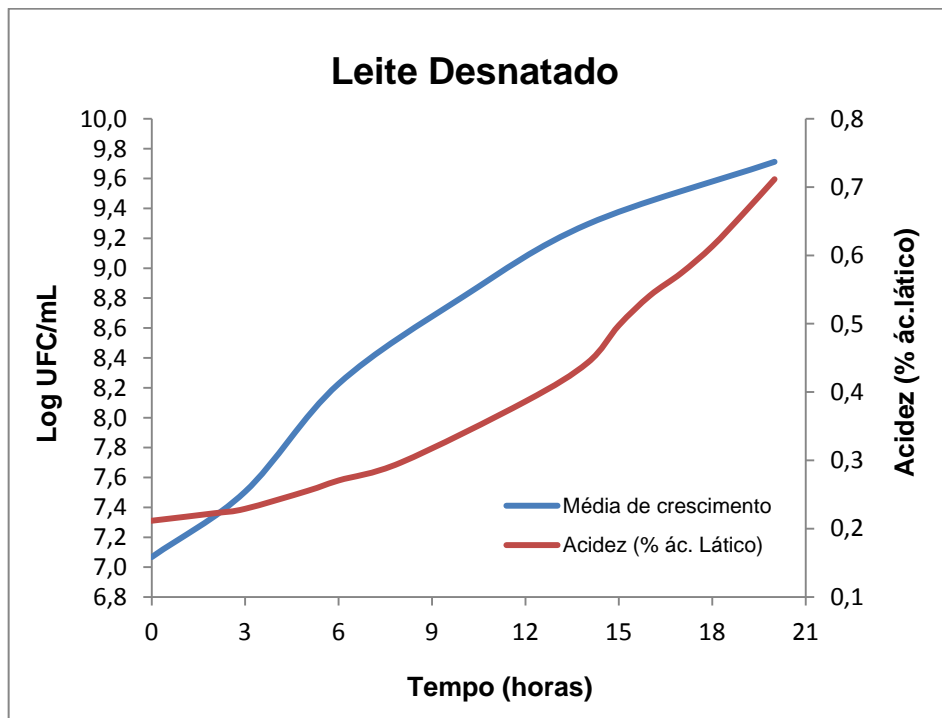


Gráfico 3 – Curva de crescimento e acidificação de *L. paracasei* no meio constituído de leite desnatado.

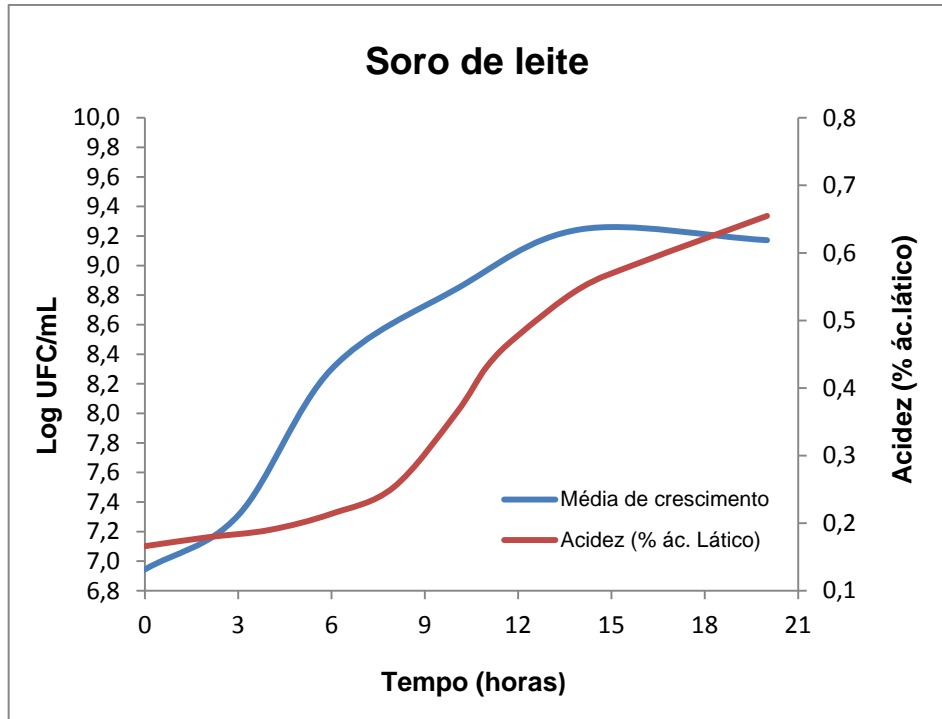


Gráfico 4 – Curva de crescimento e acidificação de *L. paracasei* no meio constituído de soro de leite.

Também foram analisados os valores de velocidade específica máxima de crescimento e tempo de geração para cada meio de fermentação (Tabela 11).

Tabela 11 - Velocidade específica máxima de crescimento e tempo de geração do *L. paracasei* nos diferentes meios de fermentação

	μ_{\max}	tg
Soro de leite	0,510833 ^a	1h22min ^a
Leite desnatado	0,423000 ^b	1h38min ^b
Leitelho	0,403733 ^c	1h43min ^c

* Médias seguidas com letras diferentes na mesma coluna diferiram entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey. ** Médias correspondentes a análises em triplicata

Os três produtos utilizados como meios de fermentação para o microrganismo *L. paracasei*, possuem composições químicas distintas. O soro de leite em pó contém, em média, aproximadamente 11% de proteínas, 73% de lactose, 1% de gordura e 8% de cinzas (WALSTRA et al., 1999). O leite desnatado em pó

contém em média aproximadamente 36,3% de proteínas, 1,6% de gordura, 46,4% de lactose e 8,02% de cinzas (ANTUNES, 2004). Já a composição média do leite em pó consiste de 31,43% de proteínas, 6,10% de gordura, 51,49% de lactose e 7,35% de cinzas (dados obtidos no presente estudo).

O soro de leite foi o meio que apresentou o melhor desenvolvimento do microrganismo estudado, apresentando maior velocidade específica de crescimento ($\mu_{\max}=0,510833$) e menor tempo de geração ($t_g=1h22min$) (Tabela 10 e Gráfico 4).

De acordo com Spreer (1991), a grande quantidade de lactose presente no soro torna este produto uma considerável fonte de energia para os processos fermentativos de diversos microrganismos. Amiot (1991), afirma que o soro possui uma composição de minerais, conteúdo energético e substâncias nitrogenadas que o fazem um excelente meio de fermentação.

O *L. paracasei* possui o metabolismo heterofermentativo facultativo, produz ácido láctico a partir da fermentação de hexoses, porém também é capaz de fermentar pentoses (CHARALAMPOPOULOS e RASTALL, 2009). Os lactobacilos heterofermentativos facultativos podem converter as hexoses em apenas ácido láctico ou em ácido láctico, ácido acético, etanol e ácido fórmico, quando a glicose é limitada (MARTH e STEELE, 2001).

Vigliengo e Reinheimer (2009), estudaram o crescimento de bactérias termófilas (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*), para produção de biomassa em meios contendo soro e leite, adicionados ou não de extrato de leveduras. Os autores afirmam que o leite e o soro representam excelentes fontes de carbono, porém possuem carência de fonte de nitrogênio que são facilmente assimiladas pelas bactérias. Por esta razão a adição de uma fonte de nitrogênio foi necessária para a obtenção de uma formulação adequada. Os resultados obtidos demonstraram que a utilização do soro e do leite suplementados com extrato de leveduras (0,3%) para o crescimento das bactérias termófilas são adequados para a produção de biomassa. Em geral, o rendimento celular e os parâmetros cinéticos obtidos nesses meios econômicos (soro e leite), podem ser semelhantes ou superiores aqueles obtidos do meio controle, que possui um custo mais elevado para produção dessas bactérias em escala industrial.

Burns et al. (2008), estudaram a formulação de meios de cultivo para o crescimento de culturas de *L. paracasei*, *L. casei* e *L. acidophilus*, utilizando o

soro de leite e o leiteiro como substrato principal. Os autores afirmam que para a produção industrial de culturas, alguns parâmetros de qualidade são importantes, como, rendimento da biomassa em larga escala, facilidade de concentração e capacidade de sobrevivência, e manutenção da sua funcionalidade durante o armazenamento congelado. Os autores observaram que o meio contendo leiteiro sem adição de extrato de levedura não obteve um crescimento de *L. paracasei* satisfatório.

Burns et al. (2008), concluíram no estudo que a utilização do soro ou leiteiro, suplementados com o extrato de levedura, para o crescimento de lactobacilos probióticos, foram adequados para a produção de biomassa, atingindo níveis de células viáveis semelhantes àqueles obtidos em meios de referência (MRS e meios comerciais). A utilização desses subprodutos gera grande vantagem para os produtores de culturas liofilizadas/congeladas, pois são produtos de baixo custo, se comparado com os meios comerciais que utilizam nutrientes de elevado custo, encarecendo todo o processo. Portanto, o uso do soro e do leiteiro como meio de cultivo e crioprotetor para bactérias ácido lácticas probióticas sugere uma nova aplicação para esses subprodutos, ajudando ainda a minimizar o impacto negativo ao meio ambiente.

5.2.2 Comparativo entre as Características das Culturas Yoflex®

As culturas YF-L904 e YF-L812 fazem parte da linha Yoflex® da Chr. Hansen. Essas culturas são produtoras de exopolissacarídeos (EPS) e conferem à bebida fermentada um sabor suave, cremosidade e textura até 20% superiores às que são obtidas com outras culturas. Devido à essas características, tais culturas podem ser empregadas em bebidas fermentadas com baixo teor de gordura e açúcar. Segundo De Vuyst e Degeest (1999) os EPS derivados das bactérias ácido lácticas (BAL) tem grande potencial na aplicação e desenvolvimento de novos produtos, além de melhorar características de produtos como, iogurte com baixo teor de sólidos do leite, iogurtes com baixo teor de gordura, iogurtes mais cremosos, etc.

Pelos resultados obtidos e apresentados (Gráfico 5) pode-se afirmar que a cultura YF-L904 desenvolveu mais rapidamente a acidez no meio, atingindo acidez de 0,8g de ácido láctico/100g de produto, durante a fermentação a 42 °C por

270 min. No mesmo tempo, a cultura YF-812 obteve valor de acidez de 0,68g de ácido láctico/100g de produto.

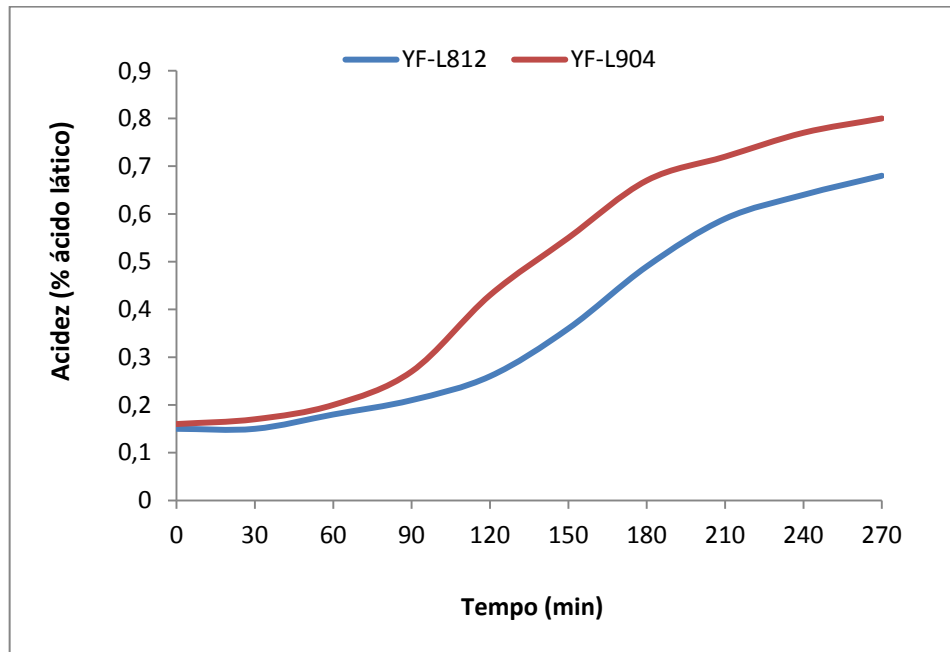


Gráfico 5 – Curva de acidificação das culturas YF-L812 e YF-L904 durante fermentação a 42°C.

Segundo Beal et al. (1999), a acidificação láctica é o resultado da fermentação da lactose pelo crescimento protossimbiótico das duas bactérias ácido lácticas, homofermentativas e termófilas, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. O desenvolvimento da acidez é influenciada pela qualidade do leite, as cepas utilizadas e a temperatura de fermentação.

O resultado do crescimento conjunto dessas duas bactérias é a aceleração do metabolismo e, conseqüentemente, a obtenção da mesma concentração de ácido láctico e de outros metabólitos em menos tempo do que se o crescimento dessas bactérias fosse separado. Atualmente, esse desenvolvimento simbiótico está bem documentado. O *L. bulgaricus* produz aminoácidos essenciais (valina, ácido glutâmico, triptofano e metionina) e alguns peptídeos, a partir da caseína, pois possui uma natureza proteolítica. Esses compostos estimulam o crescimento do *S. thermophilus*. Por sua vez, o *S. thermophilus*, estimula o crescimento do *L. bulgaricus*, possivelmente pela remoção de oxigênio, abaixamento do pH e produção de ácido fórmico e piruvato (MARTH e STEELE, 2001; PEREDA et al., 2005).

Os resultados das análises de sinérese e acidez, realizadas durante o período armazenamento à 5 °C, estão demonstrados na Tabela 12.

Tabela 12 – Média das análises de sinérese e acidez das bebidas fermentadas com as culturas YF-L904 e YF-L812

Dia	Sinérese YF-L904	Sinérese YF-L812	Acidez YF-L904	Acidez YF-L812
1	21,84 ^{aA}	33,42 ^{aB}	0,79 ^{aA}	0,78 ^{aA}
7	26,18 ^{bA}	36,35 ^{bB}	0,88 ^{bA}	0,86 ^{bA}
14	27,36 ^{bA}	33,21 ^{aB}	0,90 ^{bA}	0,91 ^{cA}
21	26,11 ^{bA}	36,97 ^{bB}	0,87 ^{bA}	0,90 ^{cB}
28	31,71 ^{cA}	34,76 ^{abA}	0,88 ^{bA}	0,90 ^{cA}

* Médias seguidas com letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferiram entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey. ** Médias seguidas com letras maiúsculas diferentes na mesma linha (no mesmo parâmetro) diferiram entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

A pós-acidificação da bebida fermentada com a cultura YF-L904 e da bebida fermentada com a cultura L-812 foram diferentes, porém no 28° dia, os valores não diferiram significativamente ($p > 0,05$). O aumento médio da acidez das culturas durante a estocagem foi de aproximadamente 12%.

Em estudo realizado por Silva (2007), foi avaliada a variação de acidez de iogurtes formulados com diferentes porcentagens de culturas lácticas, durante armazenamento refrigerado à 4 °C no período de 28 dias. Foi observado um aumento da acidez de 20,89% para a amostra com 0,5% de culturas lácticas, 24,64% para a amostra com 1,0% de culturas lácticas e 25,0% para a amostra com 1,5% de culturas lácticas.

Beal et al. (1999) observaram que em iogurtes fermentados até o pH de 4,8 e armazenados à 4 °C no período de 21 dias, houve um aumento de 25% a 44% do ácido láctico D(-), que é o isômero produzido pelo *L. bulgaricus*. Neste caso foi concluído que a pós-acidificação pode ser atribuída à produção de ácido láctico pelo *L. bulgaricus*.

Durante o armazenamento o ideal é que ocorra uma baixa pós-acidificação, para que as características da bebida fermentada sejam mantidas. O excesso de produção de ácido láctico pode ocasionar defeitos no corpo e textura da

bebida, tais como a contração do gel e desprendimento do soro (MARTH e STEELE, 2001).

Beal et al. (1999), afirmam que a pós-acidificação é principalmente afetada pelas cepas utilizadas, a temperatura de armazenamento e o tempo de armazenamento. O aumento da acidez durante o tempo de estocagem pelo ser explicado pela atividade metabólica das bactérias ácido lácticas que persistem durante a refrigeração à 4 °C. De acordo com Dave e Shah (1998), o microrganismo *L. bulgaricus* é capaz de produzir ácido láctico durante o armazenamento refrigerado, levando à pós-acidificação do produto.

O uso de culturas starter com menor concentração de *L. bulgaricus* permite a produção de iogurtes com uma menor acidez e menor risco de ocorrência da pós-acidificação. Os fabricantes de culturas lácticas têm produzido culturas contendo as bactérias tradicionais do iogurte com uma menor concentração de *L. bulgaricus* e uma maior concentração de *S. thermophilus*. A redução na contagem de *L. bulgaricus* no produto final contribui para diminuir a pós-acidificação do iogurte durante a vida de prateleira. Isto é importante para garantir ao produto final um sabor suave e para evitar que a acidificação excessiva cause efeitos adversos sobre as bactérias probióticas (BIROLLO, 2000 e SILVA, 2007).

Dave e Shah (1998), afirmam que é uma tendência nos dias de hoje a utilização de culturas starter, isentas de *L. bulgaricus*, como a ABT, que contem, *L. acidophilus*, bifidobacteria e *S. thermophilus*.

Pelos resultados obtidos no presente estudo, as duas culturas testadas, apresentaram valores baixos de pós-acidificação e no final dos 28 dias de armazenamento, não diferiram significativamente ($p > 0,05$) nos valores de acidez. Estes resultados podem ser devido a menor concentração de *L. bulgaricus* nas culturas. A contagem média obtida para a bebida fermentada com a cultura YF-L904, foi de 2,76 log UFC mL⁻¹ para o *L. bulgaricus* e de 9,26 log UFC mL⁻¹ para o *S. thermophilus*.

A susceptibilidade à sinérese das bebidas fermentadas e armazenadas 28 dias à 5 °C (Tabela 10) diferiram significativamente até o 21° dia, sendo que no 28° dia os valores foram estatisticamente iguais. As bebidas apresentaram diferentes comportamentos durante o período de armazenamento (Gráfico 6). A bebida contendo a cultura YF-L904 teve uma menor sinérese durante

os 21 dias de fabricação e no último dia o valor obtido foi igual ao da bebida contendo a cultura YF-L812.

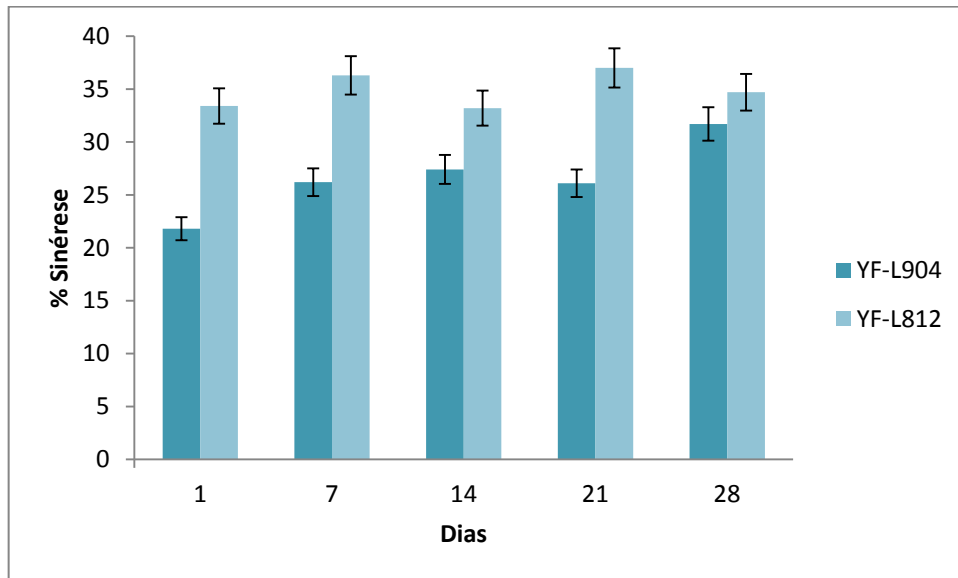


Gráfico 6 – Comparação da susceptibilidade à sinérese das bebidas fermentadas com YF-L812 e YF-L904 durante o período de armazenamento à 5 °C.

A sinérese ocorre devido ao encolhimento do gel protéico e consequente expulsão do soro, estando relacionada à instabilidade da rede protéica. Os rearranjos na rede produzidos por forças atrativas entre as moléculas de caseína ou micelas agrupadas podem levar à formação de ligações intermoleculares adicionais e consequentemente a contração do gel com expulsão de líquido. Algumas possíveis causas do desprendimento do soro em géis ácidos são: incubação em temperaturas muito altas, tratamento excessivo da mistura, baixo teor de sólidos da mistura, movimentação ou agitação durante ou logo após a formação do gel, baixa produção de ácido láctico ($\text{pH} > 4,8$). A extensão da sinérese dependerá da combinação desses fatores (ANTUNES, 2004; MAGENIS et al., 2006).

No presente estudo, as variáveis, temperatura de fermentação, pasteurização da mistura, teor de sólidos, acidez inicial da bebida, foram padronizadas. Portanto, as diferenças observadas durante a armazenagem foram devido ao comportamento das diferentes culturas utilizadas.

Como forma de comparar os resultados obtidos, foi analisado pelo mesmo método, a susceptibilidade à sinérese de um iogurte comercial (marca Líder). A média dos valores de sinérese obtida foi de 19,51%. O valor encontrado foi inferior

ao encontrado nas bebidas produzidas no experimento, porém não foi uma diferença muito grande, levando em consideração que na formulação do iogurte comercial possui ingredientes como, amido, espessante carragena, amido modificado e gelatina. Segundo resultado obtido por Modler e Kalab (1983), em uma concentração de 5%, a gelatina promoveu a imobilização da fase aquosa na rede protéica do iogurte, e assim, reduziu a sinérese significativamente.

As análises de capacidade de retenção de água (CRA) e viscosidade foram realizadas após um dia da produção das bebidas (Gráfico 7) e diferiram significativamente ($p \leq 0,05$). A bebida contendo a cultura YF-L904 apresentou valor de 31,87% de CRA e 22.080cp de viscosidade, contra 24,89% de CRA e 18.030cp de viscosidade para a cultura YF-L812. Os maiores valores de CRA e viscosidade apresentados pela cultura YF-L904 podem ser promovidas pela maior produção de exopolissacarídeos (EPS) por esta cultura. Segundo dados da Chr. Hansen, a cultura YF-L812 foi a primeira dessa linha (cepas produtoras de EPS) e, mais recentemente, foram lançadas as culturas YF-L901, YF-L902, YF-L903, YF-L904, YF-L705 e YF-L706.

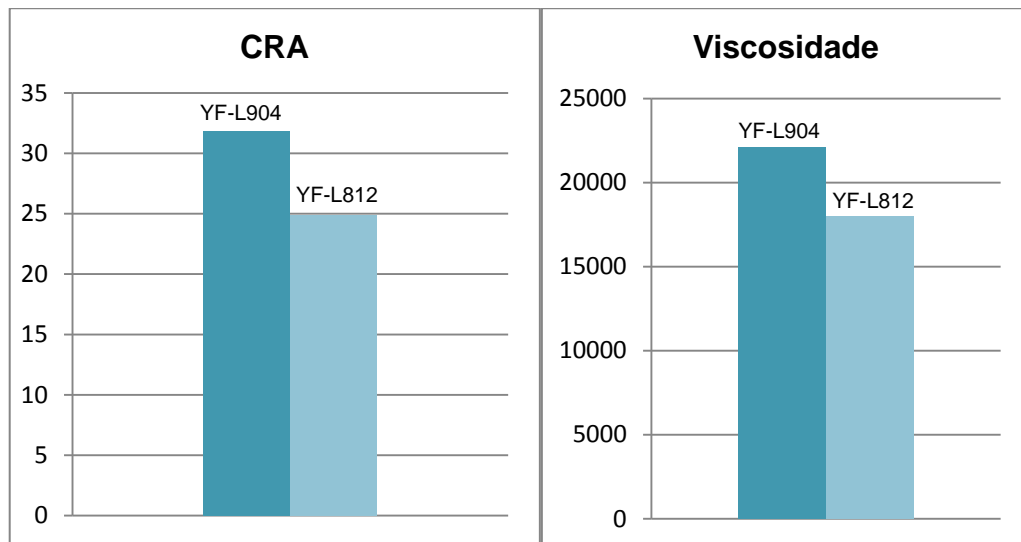


Gráfico 7 – Resultados da capacidade de retenção de água (CRA) e viscosidade das bebidas fermentadas com YF-L812 e YF-L904.

Através da análise dos resultados obtidos, optou-se pela utilização da cultura láctica YF-L904 para o desenvolvimento das formulações das bebidas lácteas fermentadas. A cultura YF-L904 apresentou maior velocidade de acidificação durante a fermentação, valores de sinérese e pós-acidificação iguais à cultura YF-

L812, melhor capacidade de retenção de água e maior viscosidade na bebida fermentada, possivelmente sendo melhor produtora de exopolissacarídeos.

Segundo Duboc e Mollet (2001), existe uma grande variabilidade na produção de EPS pelas bactérias ácido lácticas, em relação à quantidade, composição química, tamanho molecular, carga, presença de cadeias secundárias e rigidez das moléculas .

A incorporação de culturas produtoras de EPS em lácteos confere ao produto um aumento na viscosidade, estabilidade e capacidade de ligação com a água, além da interação com outros constituintes do leite, como, proteínas e micelas, fortalecendo a rede protéica. Esses fatores contribuem de forma positiva para a sensação na boca, textura e sabor em produtos lácteos fermentados (DUBOC e MOLLET, 2001; BROADBENT et al., 2003).

5.2.3 Diferenciação dos Microrganismos Incorporados à Bebida Fermentada

Realizou-se a incorporação dos microrganismos *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* (bactéria probiótica), *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* (bactéria láctica) e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (bactéria láctica) nas bebidas fermentadas. Para a diferenciação e posterior contagem de cada microrganismo, utilizou-se diferentes meios de cultivo.

O microrganismo *L. paracasei* desenvolveu colônias creme e esbranquiçadas (crescimento na base da placa), em meio MRS com vancomicina (Figura 9a). Observou-se que em MRS sem adição de vancomicina, houve crescimento de outra bactéria além do *L. paracasei*, possivelmente o *S. thermophilus*. Dave e Shah (1996), observaram crescimento de *S. thermophilus* em meio MRS, porém em menor quantidade que no meio específico para o microrganismo. Na Figura 9b, está demonstrada a lâmina contendo o microrganismo após coloração de Gram.

Talwalkar e Kailasapathy (2004), concluíram em seu estudo que os meios de cultivo para enumeração de diferentes bactérias probióticas presentes em iogurtes comerciais, não são adequados. Segundo os autores é possível que a estimativa do número de probióticos em iogurtes ser imprecisa.

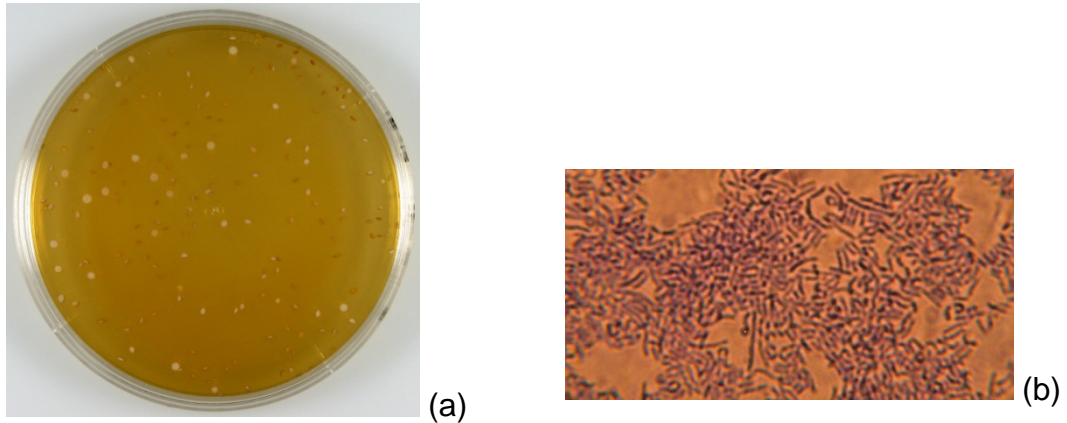


Figura 9 – (a) Colônias de *L. paracasei* em meio MRS com vancomicina. (b) Visão microscópica da lâmina contendo células de *L. paracasei*, após coloração de Gram.

Tabasco et al. (2007), observaram que o meio MRS acidificado permitiu o crescimento de *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* e *B. lactis*. Os autores afirmam que o aumento da temperatura para 45 °C, e a substituição da glicose por frutose, são condições seletivas contra o crescimento de *L. paracasei* e *B. lactis*, respectivamente.

O microrganismo *S. thermophilus* foi cultivado em meio M17 e desenvolveu pequenas colônias amareladas (Figura 10a). Após coloração de Gram, a lâmina foi fotografada, e a cultura apresentou as características apresentadas na Figura 10b.

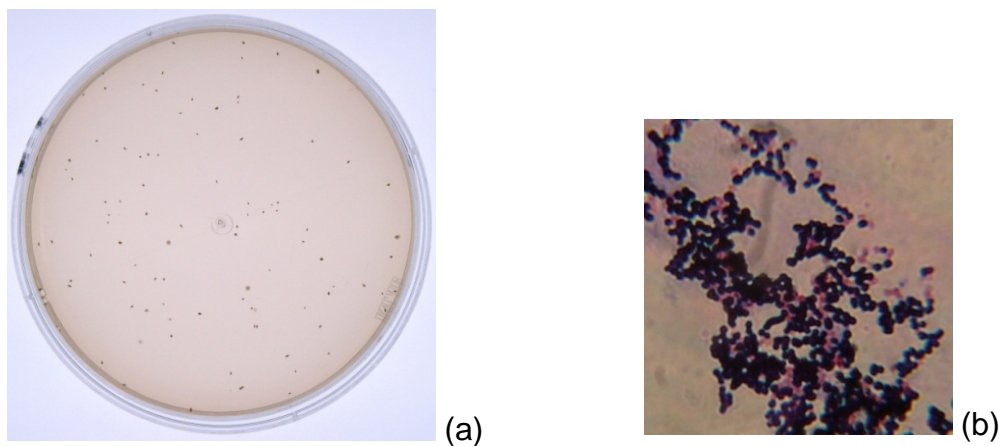


Figura 10 – (a) Colônias de *S. thermophilus* em meio M17. (b) Visão microscópica da lâmina contendo células de *S. thermophilus*, após coloração de Gram.

O microrganismo *L. bulgaricus* foi cultivado em meio MRS acidificado com ácido clorídrico até o pH de 5,4. O microrganismo apresentou culturas de cor creme e bem pequenas. Na bebida contendo todos os três microrganismos ocorreu o crescimento de *L. paracasei* nas condições estabelecidas para o crescimento de *L. bulgaricus*, não sendo possível sua diferenciação neste caso. Na Figura 11 está demonstrada a lâmina contendo *L. bulgaricus*.

Dave e Shah (1996), estudaram vários tipos de meios de cultivo para a enumeração seletiva dos microrganismos do iogurte. Foram utilizadas cinco cepas de *L. bulgaricus*, sendo observado diferentes comportamentos de algumas cepas nos meios de cultivo. Os autores utilizaram o meio MRS com pH=5,2, incubado anaerobicamente a 45 °C por 72 horas. Nestes parâmetros os autores observaram o crescimento do microrganismo e afirmam que pode ser utilizado para enumeração diferencial do *L. bulgaricus*. No presente estudo, essas condições foram testadas, porém não foi observado o crescimento do microrganismo.

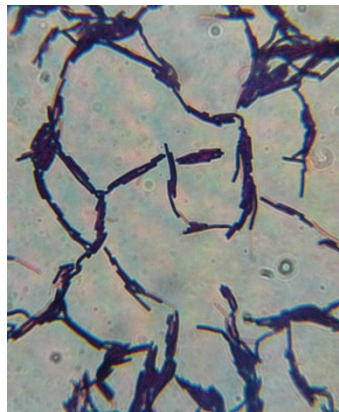


Figura 11 – Visão microscópica da lâmina contendo células de *L. bulgaricus*, após coloração de Gram.

A visualização pelo microscópio óptico, das lâminas após a coloração de Gram, demonstrou diferentes características de cada microrganismo estudado. Todos apresentaram coloração roxa, evidenciando que são bactérias Gram positivas. O *L. paracasei* e o *L. bulgaricus* possuem morfologia celular de bacilos, sendo o último em forma de bacilos mais longos e finos. O *S. thermophilus* apresentou morfologia celular de cocos.

O *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* é caracterizado por bacilos de 0,5 a 0,8 x 2 a 9 µm. Possuem morfologia celular variando de bacilos

longos e finos até, algumas vezes, como bacilos curvados e pequenos. Aparecem em cadeias curtas ou de forma individualizada. São gram positivos, regulares e não esporulados. Os *Lactobacillus* são microaerófilos e, quando em crescimento na superfície em meios sólidos, geralmente o desenvolvimento é melhor em anaerobiose ou pressão de oxigênio reduzido e 5% a 10% de CO₂. Crescem em temperaturas que variam de 2°C a 53°C, com valores ótimos, geralmente, de 30°C a 40°C (BOTELHO, 2005; PEREDA et al., 2005).

O *Streptococcus thermophilus* é caracterizado de cocos de menos de 1µm de diâmetro que formam cadeias. São gram-positivos, homofermentadores, microaerófilos, produzem L(+) lactato, acetaldeído e diacetil a partir da lactose do leite. Não crescem a 15°C, mas pode crescer a 50°C, com temperatura ótima de crescimento a 37°C (PEREDA et al., 2005; ZACARCHENCO, 2003).

Grande parte das bactérias ácido lácticas e bactérias probióticas presentes nos iogurtes comerciais possuem propriedades fisiológicas e requerimentos nutricionais muito semelhantes, além de se desenvolverem em condições ambientais similares. A enumeração diferencial desses microrganismos torna-se muito complicada (TABASCO et al., 2007; CREMONESI et al., 2011).

Métodos microbiológicos e bioquímicos convencionais são demorados, trabalhosos e menos sensíveis. Diversos métodos moleculares têm sido desenvolvidos para a detecção mais eficiente de espécies comumente utilizadas em produtos lácteos comerciais (NIKOLAOU et al., 2011). Os métodos moleculares apresentam como características a reprodutibilidade, automação e rapidez. Assim, o uso desses métodos representa um grande avanço e tem aumentado a qualidade e a eficiência da identificação microbiana. Vários estudos têm utilizado técnicas moleculares para identificar, em nível de subespécies e biovariantes, as bactérias ácido lácticas isoladas de produtos lácteos, com bastante sucesso, facilidade e rapidez (QUEIROZ, 2008).

5.2.4 Análises no Período de Armazenamento das Bebidas Fermentadas

5.2.4.1 Contagem dos microrganismos

No presente estudo foram incorporados às bebidas fermentadas as bactérias lácticas, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, e a bactéria probiótica *L.*

paracasei. Realizou-se a contagem de células viáveis das bactérias lácticas e probiótica nas três formulações de bebidas fermentadas.

Porém, não foi possível enumerar o microrganismo *L. bulgaricus*, devido ao crescimento do *L. paracasei* nas condições estabelecidas. Só foi possível enumerar as células viáveis de *L. bulgaricus* em bebida fermentada sem a adição de *L. paracasei*. Deste modo, a contagem média obtida para o microrganismo *L. bulgaricus* após 24 horas da produção da bebida foi de 2,76 log UFC mL⁻¹.

As contagens médias de células viáveis do *S. thermophilus* e *L. paracasei* são apresentados na Tabela 13 e 14, respectivamente. As contagens foram efetuadas após 24 horas do dia de produção e no 28° dia de armazenamento à 5 °C. Os valores foram convertidos à escala logarítmica antes de submetidos às análises estatísticas.

Tabela 13 – Contagem média (log UFC mL⁻¹) das células viáveis de *S. thermophilus* nas diferentes formulações.

Tempo	<i>Streptococcus thermophilus</i>		
	Formulação 1	Formulação 2	Formulação 3
1° dia	9,07 ± 0,011 ^a	9,14 ± 0,006 ^a	9,21 ± 0,025 ^a
28° dia	9,04 ± 0,008 ^a	9,04 ± 0,006 ^b	8,95 ± 0,012 ^b
Média	9,06 ± 0,009	9,09 ± 0,006	9,08 ± 0,018

* Formulação 1 = 100% leite integral; Formulação 2 = 100% leiteiro; Formulação 3 = 1/3 leite integral, 1/3 leiteiro, 1/3 soro de leite. ** Médias seguidas com letras diferentes na mesma coluna diferiram entre si (p≤0,05) pelo teste de Tukey.

O microrganismo *S. thermophilus*, sofreu uma pequena redução em sua contagem na Formulação 2, com redução de 0,1 log UFC mL⁻¹ e na Formulação 3, com redução de 0,26 log UFC mL⁻¹. A contagem de células viáveis na Formulação 1 não diferenciou significativamente durante o armazenamento (Tabela 13).

Pelos resultados obtidos (Tabela 14) verifica-se que o *L. paracasei* não sofreu redução significativa de UFC/mL durante o período de 28 dias de armazenamento refrigerado. Para a Formulação 1, apresentou valor variando de 8,06 a 8,07 log UFC mL⁻¹; para a Formulação 2, apresentou valor variando de 7,59 a

7,68 log UFC mL⁻¹; para a Formulação 3, apresentou valor variando de 7,84 a 7,74 log UFC mL⁻¹.

De acordo com Bellengier et al. (1997), as combinações entre as bactérias lácticas starter e culturas probióticas, podem gerar interações que podem ser benéficas (protocooperação) ou desfavoráveis (antagonismo). Estas interações podem levar a mudanças na composição da flora bacteriana durante a fabricação e armazenamento refrigerado de produtos lácteos fermentados. Os resultados do presente estudo demonstram que não houve interação desfavorável entre as culturas, pois tanto o *S. thermophilus* como o *L. paracasei* se mantiveram dentro dos níveis estabelecidos e tiveram uma boa sobrevivência durante a vida de prateleira.

Tabela 14 – Contagem média (log UFC mL⁻¹) das células viáveis de *L. paracasei* nas formulações.

Tempo	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp <i>paracasei</i>		
	Formulação 1	Formulação 2	Formulação 3
1° dia	8,06 ± 0,015 ^a	7,59 ± 0,056 ^a	7,84 ± 0,006 ^a
28° dia	8,07 ± 0,018 ^a	7,68 ± 0,049 ^a	7,74 ± 0,035 ^a
Média	8,065 ± 0,0165	7,64 ± 0,0525	7,79 ± 0,0205

* Formulação 1 = 100% leite integral; Formulação 2 = 100% leiteiro; Formulação 3 = 1/3 leite integral, 1/3 leiteiro, 1/3 soro de leite. ** Médias seguidas com letras diferentes na mesma coluna diferiram entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Em estudos prévios realizados por Kristo et al. (2003), a cepa de *L. paracasei* foi caracterizada como sendo resistente a 1% de bile, resistente ao pH 4,0 e sobrevivente ao pH 3,0. No estudo, os autores determinaram a sobrevivência dos microrganismos, *L. paracasei*, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, em leite fermentado, durante 21 dias de armazenamento a 4°C. Os resultados demonstraram uma ótima sobrevivência do *L. paracasei* durante o armazenamento, o que também implica em sua boa compatibilidade com as culturas tradicionais, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*. Quanto ao *S. thermophilus*, a contagem durante o armazenamento manteve-se inalterada e o número de *L. bulgaricus* diminuiu.

Os autores estudaram a viabilidade de bactérias probióticas na produção industrial de queijo fresco probiótico Argentino. Foi observado que durante

os 60 dias de armazenamento à 5 °C, houve um pequeno aumento no número de células viáveis de *L. paracasei*, sem alteração negativa nas propriedades sensoriais do produto. Nas amostras armazenadas a 12 °C por 60 dias, houve um maior aumento na contagem de células de *L. paracasei*, no entanto, afetou as propriedades sensoriais do produto (VINDEROLA et al., 2009).

É essencial que o produto probiótico mantenha a viabilidade da cultura probiótica durante o armazenamento, para que na hora do consumo o produto possa oferecer os benefícios para a saúde do consumidor. Todas as formulações estavam de acordo com os critérios microbiológicos regulamentados na legislação vigente. De acordo com a legislação a contagem de bactérias lácticas totais deve ser de 10^7 UFC/g (BRASIL, 2007) e a contagem de bactérias probióticas deve ser de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto, ou 10^6 UFC/g (ANVISA, 2008).

5.2.4.2 Pós-acidificação e susceptibilidade à sinérese

Houve diferença significativa nos valores de sinérese, tanto entre as formulações, como durante o período de armazenamento. De forma geral, todas as formulações demonstraram uma diminuição dos valores de sinérese entre o 1º dia e o 7º dia, mantendo-se constante até o final do período de estocagem (Tabela 15).

Tabela 15 – Susceptibilidade a sinérese (%) das três formulações durante o período de armazenamento

Tempo (dias)	Formulação 1 100% Leite	Formulação 2 100% Leitelho	Formulação 3 Leite/Leitelho/Soro
1º dia	20,53 ^{aA}	17,87 ^{aB}	17,02 ^{aB}
7º dia	16,51 ^{bA}	10,84 ^{bB}	12,05 ^{bC}
14º dia	14,67 ^{cA}	11,90 ^{bB}	11,17 ^{bcC}
21º dia	14,32 ^{cA}	11,13 ^{bB}	10,61 ^{cB}
28º dia	15,61 ^{bcA}	11,95 ^{bB}	11,24 ^{bcB}

* Médias seguidas com letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferiram entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey. ** Médias seguidas com letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferiram entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Tamime e Robinson (1985), afirmam que durante as primeiras 24-48 horas de armazenamento refrigerado as características físicas do coágulo são aperfeiçoadas, principalmente devido à hidratação e/ou estabilização das micelas de caseína. Como a primeira análise foi realizada após 24 horas de armazenamento é possível que o coágulo estivesse menos estável se comparado ao 7º dia.

No Gráfico 8, pode-se observar uma diferença de sinérese entre as formulações testadas. A Formulação 1 (100% leite), apresentou maiores valores de sinérese em todo o período de estocagem. As Formulações 2 (100% leite) e 3 (33% leite, 33% leite, 33% soro de leite) apresentaram comportamento semelhante, não diferindo significativamente ($p > 0,05$) nos valores inicial (1º dia) e final (28º dia). Ocorreu diferença significativa apenas nos dias 7 e 14.

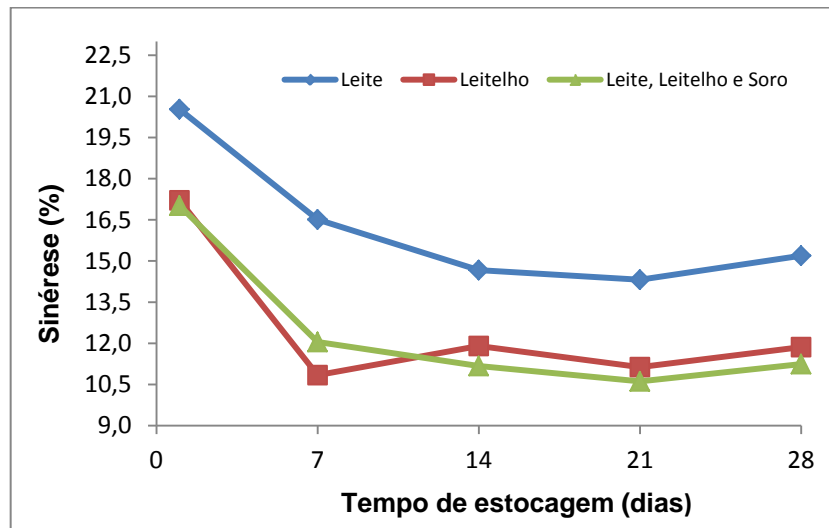


Gráfico 8 – Susceptibilidade a sinérese das três formulações durante o período de estocagem refrigerado.

Torre et al. (2003), também observaram redução dos valores de sinérese durante o armazenamento de 20 dias a 5 °C. Os autores observaram essa redução de sinérese em todas as formulações de leite fermentado com blends comerciais de culturas probióticas e culturas starter do iogurte.

A Formulação 1 foi a que apresentou maior susceptibilidade à sinérese, e também é a única que não contém leite na formulação. O leite pode ter influenciado na sinérese das amostras devido a sua composição, que consiste na presença de componentes anfífilos. De acordo com Vanderghem et al. (2010), as proteínas da MGGL e os fosfolípidios são considerados agentes

emulsificantes naturais, devido a sua natureza anfifílica. Sodini et al. (2006), afirmam que a adição do leite melhora a textura do queijo devido à alta capacidade de aprisionamento de água pelos fosfolipídios.

Em uma comparação entre a susceptibilidade à sinérese da bebida formulada apenas com a culturas tradicional YF-L904 (Item 5.2.2) e a bebida formulada (Formulação 2) com a cultura YF-L904 e o *L. paracasei*, pode-se perceber uma diferença entre os valores. No primeiro caso a formulação consistiu de 12% de leite e 8% de açúcar. No segundo caso, a Formulação 2 consistiu de 14% de leite e 10% de açúcar, um aumento na concentração de sólidos. Além do aumento do extrato seco total a bactéria *L. paracasei* também é produtora de EPS.

Segundo Badel et al. (2011), o melhor rendimento na produção de EPS é atribuído ao microrganismo probiótico *L. rhamnosus*, que pode sintetizar aproximadamente 2,7g/L de polissacarídeo. No caso do *L. paracasei* sua produção é de cerca de 80mg/L. As bactérias starter do iogurte também são produtoras de EPS. Sua produção varia de 30 a 890 mg/L para o *S. thermophilus* e de 60 a 150 mg/L para o *L. bulgaricus*.

Pelo fato da acidez inicial das formulações não serem iguais foi realizado o cálculo de diferença, como forma de obter a acidez desenvolvida a cada análise, ou seja, a cada 7 dias em um período de 28 dias. Pode-se observar que as formulações apresentaram comportamentos diferentes em relação à produção de ácido láctico durante o armazenamento. Porém, no 28º dia os valores não diferiram significativamente ($p > 0,05$) (Tabela 16 e Gráfico 9).

Tabela 16 – Desenvolvimento da acidez, em % ácido láctico, durante o período de armazenamento a 5 °C.

Δ Acidez (%)	Formulação 1 100% Leite	Formulação 2 100% Leiteiro	Formulação 3 Leite/Leiteiro/Soro
Acidez (7º dia) – Acidez (1º dia)	0,063 ^{aA}	0,023 ^{aB}	0,070 ^{aA}
Acidez (14º dia) – Acidez (1º dia)	0,100 ^{bA}	0,107 ^{bA}	0,107 ^{bA}
Acidez (21º dia) – Acidez (1º dia)	0,117 ^{bA}	0,143 ^{cB}	0,127 ^{cA}
Acidez (28º dia) – Acidez (1º dia)	0,140 ^{cA}	0,140 ^{cA}	0,127 ^{cA}

* Médias seguidas com letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferiram entre si ($p \leq 0,05$) e médias seguidas com letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferiram entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

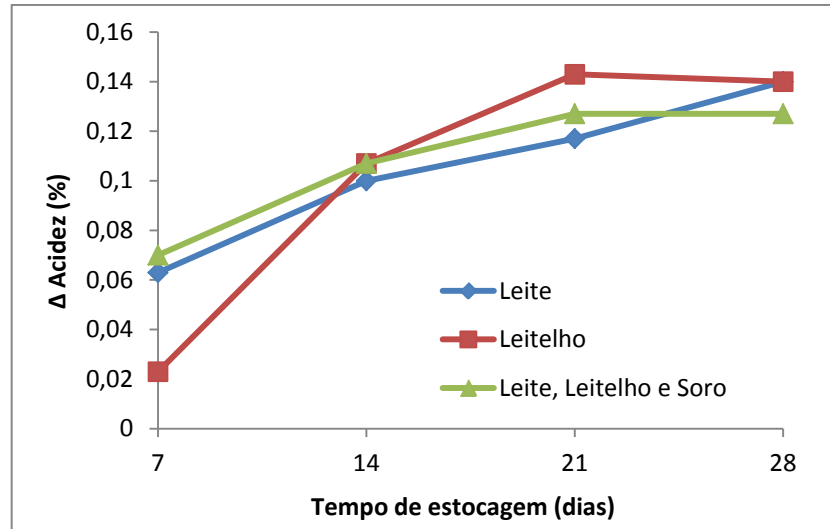


Gráfico 9 - Desenvolvimento da acidez, em % ácido láctico, durante o período de armazenamento à 5 °C.

5.2.4.3 Extrato seco total e extrato seco desengordurado

A porcentagem de sólidos não gordurosos (lactose, proteína e minerais) no leite para a fabricação do iogurte é definida por padrões legais (legislação) do país ou indiretamente pelo produtor que busca um produto final com certas propriedades físicas e de sabor (TAMIME e ROBINSON, 1985).

A legislação brasileira não informa os valores de extrato seco total ou extrato seco desengordurado que a formulação de iogurtes e leites fermentados devem conter. Porém, impõe como requisito o mínimo de 2,9% de proteínas lácteas no produto (BRASIL, 2007). Todas as formulações estão de acordo com este parâmetro proteico mínimo.

As análises de extrato seco total (EST) e extrato seco desengordurado (ESD) foram realizadas no 1º dia e no 28º dia de armazenagem a 5 °C. As médias dos resultados de EST foram de 18,83% (Formulação 1), 18,78% (Formulação 2) e 18,88% (Formulação 3), sendo que os valores não diferiram significativamente ($p > 0,05$) durante o armazenamento. As médias dos resultados de ESD foram de 10,96% (Formulação 1), 10,91% (Formulação 2), 11,01 (Formulação 3), sendo que esses valores também não diferiram significativamente durante o armazenamento.

Tamime e Robinson (1985), afirmam que para a obtenção de melhor qualidade de textura/consistência em iogurtes, uma quantidade de 15-16% de

sólidos totais seria necessária. Os autores afirmam que a adição de leite em pó é uma opção viável para o aumento da quantidade de sólidos totais em iogurte. Por ser um produto com baixo teor de lipídios e devido à presença de altos níveis de fosfolipídios, possui considerável capacidade emulsificante.

5.3 ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial pode ser definida como um método científico utilizado para evocar, medir, analisar e interpretar reações às características dos alimentos percebidas pelos sentidos da visão, olfato, paladar, tato e audição (LAWLESS e HEYMANN, 1998).

Na década de 70 a qualidade sensorial passou a ser entendida como a interação entre as características químicas, físicas e estruturais dos alimentos e as condições fisiológicas, psicológicas, antropológicas, sociológicas e étnicas do homem. Assim, não apenas o alimento, mas também o homem e o contexto são preponderantes na percepção dos atributos sensoriais do produto (ARAÚJO et al., 2009).

De acordo com Stone e Sidel (1993), a análise da aceitação sensorial do produto não garante que o mesmo tenha sucesso no mercado, pois fatores como, embalagem, preço, propaganda, segmentação do mercado, entre outros, podem ser significativos. Porém, apesar destes fatores, a análise sensorial pode fornecer uma boa indicação do potencial do produto.

5.3.1 Parâmetros Microbiológicos

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo 'Padrão de Identidade e Qualidade para Leites Fermentados' (BRASIL, 2007). A legislação estabelece limites para contagem de coliformes totais (ou coliformes a 30 °C), coliformes termotolerantes (ou coliformes a 45 °C) e bolores e leveduras. Todas as formulações produzidas estavam de acordo com os padrões da legislação, estando aptas para a posterior análise sensorial (Figura 12).



Figura 12 – Fotos dos frascos contendo a Formulação 1 (100% leite), Formulação 2 (100% leiteiro) e Formulação 3 (33% leite, 33% leiteiro, 33% soro de leite).

5.3.2 Teste de aceitação

Para a avaliação da aceitação das diferentes formulações de bebidas fermentadas, foram utilizados 60 provadores não treinados, sendo 52% do sexo feminino e 48% do sexo masculino. Destes, 67% apresentaram idade entre 17 e 25 anos, 28% entre 26 e 35 anos, 3% entre 36 e 50 anos e 2% acima de 50 anos.

Todos os provadores afirmaram gostar de produtos lácteos fermentados, sendo que 68% costumam consumir frequentemente, 28% moderadamente e 4% ocasionalmente. Dentre os que consomem frequentemente, a frequência de consumo variou entre 2 a 7 vezes por semana. Já os que consomem moderadamente a frequência de consumo variou entre 1 a 10 vezes no mês.

Foi utilizada a escala hedônica estruturada de 7 pontos, e os atributos avaliados, foram sabor, textura, aroma e avaliação global das três formulações (Gráfico 10).

A escala hedônica possui a função de avaliar a aceitação de um produto a partir de um julgamento feito em uma escala de 9 pontos ancorados por advérbios que representam psicologicamente passos e mudanças simétricas no julgamento hedônico. A redução da escala de 9 pontos para uma escala de 7 pontos pode ser considerada quando se pressupõe que o consumidor não irá expressar reações extremas ao produto (LAWLESS e HEYMANN, 1998; ARAÚJO et al., 2009).

As médias das notas para o atributo sabor foram de 5,37, 3,78 e 5,43, para as Formulações 1, 2 e 3, respectivamente. A Formulação 1 e a Formulação 3 não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) e a Formulação 2 foi

a que apresentou menor média. Alguns provadores comentaram na ficha sensorial que a Formulação 2 (100% de leite) apresentou sabor de queijo, sabor que lembra manteiga e sabor residual de ranço, sendo um aspecto negativo para esta formulação.

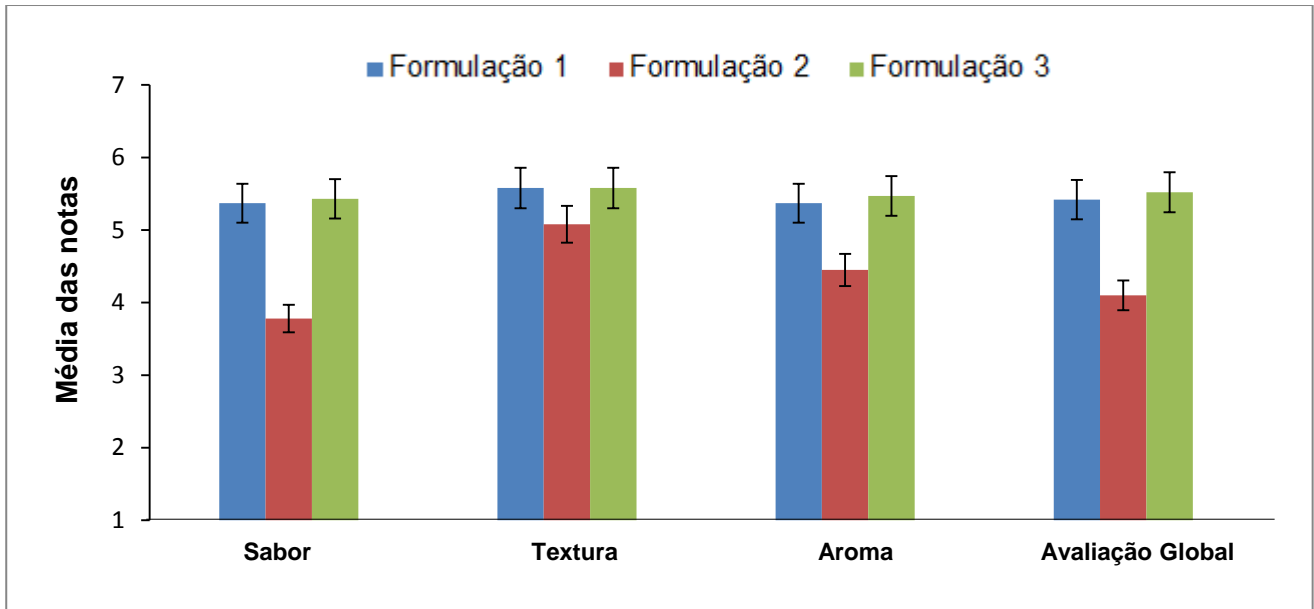


Gráfico 10 – Média das notas atribuídas pelos provadores para os atributos de sabor, textura, aroma e avaliação global, das diferentes formulações. Sendo Formulação 1, 100% de leite, Formulação 2, 100% de leite e Formulação 3, 33% de leite, 33% de leite e 33% de soro.

Quanto ao atributo textura, não houve diferença significativa entre as formulações ($p > 0,05$). No entanto, alguns provadores demonstraram insatisfação quanto à viscosidade/espessura das amostras, preferindo uma maior fluidez das bebidas fermentadas. Essa alta viscosidade do produto pode ser explicada pelo processo de produção, onde as condições e equipamentos utilizados são diferentes da produção industrial. Outros provadores comentaram sobre a gomosidade das amostras, possivelmente devido à produção de exopolissacarídeos das bactérias lácticas.

Badel et al. (2011), a presença de EPS não confere sabor ao produto final, no entanto melhora a percepção da textura pelos consumidores. A utilização de culturas produtoras de EPS pode ser uma grande vantagem para a indústria, pois ao proporcionar a diminuição da sinérese, aumento de viscosidade e textura o uso de estabilizantes comerciais pode ser reduzido na produção. Em

alguns países, principalmente na Europa o uso de estabilizantes é proibido (BROADBENT et al., 2003; BADEL et al., 2011).

Além das qualidades tecnológicas, o EPS pode afetar positivamente a saúde humana (DUBOC e MOLLET, 2001). Além de suas propriedades como prebiótico, que beneficiam a microflora intestinal, o EPS pode reduzir o colesterol sanguíneo, imunomodulador, agente antitumoral e antiulcera (KHURANA e KANAWJIA, 2007; BADEL et al., 2011).

Os valores médios obtidos para o atributo aroma foram de 5,37, 4,45 e 5,47, para as Formulações 1, 2 e 3, respectivamente. Os valores médios das Formulações 1 e 3 não diferiram significativamente ($p>0,05$) e a Formulação 2 foi a que apresentou menor média.

Jinjarak et al. (2006), caracterizaram os atributos sensoriais de 4 diferentes tipos de leite (leite doce experimental, leite de soro experimental, 2 leites doces comerciais) tanto na forma fresca como reconstituída. Os resultados demonstraram que a forma reconstituída do leite doce e leite de soro experimentais apresentaram maior odor de papelão que as outras amostras. Esse odor de papelão é geralmente associado à oxidação, e pode ser atribuído à presença de diversos componentes. Segundo os autores as diferenças no odor de papelão entre a forma fresca e a reconstituída podem indicar o impacto do processamento nas amostras. Este odor apresentado pode ser resultado da alta temperatura empregada no processo de spray-drying.

Na avaliação global das bebidas fermentadas apresentadas, as médias obtidas foram de 5,42 para a Formulação 1, 4,1 para a Formulação 2 e 5,52 para a Formulação 3. As médias das notas das Formulações 1 e 3 não diferiram significativamente ($p>0,05$) e obtiveram valores maiores que 5 (5=Gostei ligeiramente). Estes resultados indicam que uma bebida láctea fermentada e formulada somente com o leite em pó não é uma alternativa viável, devido principalmente ao sabor que o leite acrescenta à bebida. No entanto, bebidas fermentadas já existentes no mercado que adicionam o leite juntamente com outros ingredientes lácteos, como leite desnatado, permeado de leite, etc (ver Tabela 4), indicam que é possível a adição de leite neste tipo de produto. A Formulação 3, que consistiu na adição de 1/3 de leite, 1/3 de leite e 1/3 de soro de leite apresentou resultados positivos e estatisticamente iguais à Formulação 1

(100% de leite, formulação controle). A Formulação 3 apresentou aceitação de 78% dos provadores.

Trachoo e Mistry (1998), realizaram um estudo para avaliar os efeitos da adição de leiteultrafiltrado, leiteultrafiltrado em pó e leite desnatado em pó nas propriedades sensoriais de iogurtes desnatados. Os autores observaram que o iogurte adicionado do leiteultrafiltrado e o iogurte adicionado do leiteultrafiltrado em pó foram similares nos atributos sabor, aparência, textura, aroma, suavidade e acidez se comparado com o iogurte adicionado de leite desnatado em pó (iogurte controle). A aceitabilidade global do iogurte adicionado de leiteultrafiltrado em pó foi a maior.

Trachoo e Mistry (1998), ainda observaram que a adição de até 4,8% de leiteultrafiltrado em pó em iogurte de baixo teor de gordura obteve-se um produto mais suave e liso, que o controle. Na Formulação 3, do presente estudo, a adição de leiteultrafiltrado em pó foi de 4,7%.

Govindasamy-Lucey et al. (2006), observaram que a adição de 6% de leiteultrafiltrado condensado como ingrediente para a produção de queijo, pode afetar de forma desfavorável a textura, fusão e propriedades sensoriais. No entanto, em concentração de 2% a adição do condensado de leiteultrafiltrado melhora o rendimento do queijo sem afetar negativamente a sua composição e propriedades reológicas e sensoriais.

Segundo Vanderghem et al. (2010), estudos tem demonstrado que a incorporação do leiteultrafiltrado e de isolados da MGGL em certos alimentos podem melhorar suas características com sucesso. No entanto, as quantidades de leiteultrafiltrado utilizadas como um ingrediente alimentar devem ser estudadas, de forma a evitar a alteração das propriedades sensoriais e funcionais dos produtos finais. Altas concentrações podem afetar negativamente essas propriedades e resultar no desenvolvimento de *off-flavors*.

5.3.3 Intenção de compra

Os provadores também foram consultados quanto à intenção de compra de sua amostra preferida, dentre as três formulações apresentadas. De acordo com os resultados obtidos, 50% dos provadores assinalaram a Formulação 3 (33% de leite, 33% de leiteultrafiltrado e 33% de soro de leite) como preferida, 42%

assinalaram a Formulação 1 (100% de leite) e 8% assinalaram a Formulação 2 (100% de leiteiro).

Dentre os provadores que preferiram a Formulação 3, 30% afirmaram que certamente comprariam e 43% afirmaram que provavelmente comprariam a bebida fermentada. A Formulação 3 foi formulada com uma mistura proporcional de leite, leiteiro e soro de leite, indicando que a adição de uma quantidade estudada de leiteiro, não influencia a aceitação de uma bebida láctea fermentada. A Formulação 1 obteve também grande índice de preferência, porém esta amostra foi formulada apenas como controle, possuindo em sua composição apenas leite integral.

6 CONCLUSÕES

- A composição centesimal do leiteiro utilizado no estudo está dentro da faixa de valores encontrados na literatura internacional. Sendo que o teor de lipídios foi o parâmetro com maior variabilidade, dentre os lotes analisados;
- O leiteiro possui uma composição única, apresentando em seu perfil de proteico as caseínas, presentes em maior quantidade, as proteínas do soro, em quantidade intermediária e as proteínas da membrana do glóbulo de gordura do leite, em menor quantidade;
- As características da composição do leiteiro o tornam uma interessante fonte de ingredientes com propriedades funcionais únicas que outros produtos derivados do leite não possuem;
- O leiteiro apresentou altos valores de DQO e DBO, se comparado com outros subprodutos da indústria láctea. Portanto, é um subproduto com alta carga poluente para o meio ambiente, sendo interessante o seu reaproveitamento como ingrediente funcional em alimentos;
- O leiteiro em pó é susceptível a oxidação durante o armazenamento a 25°C, porém só foi verificado um grande aumento nos valores de oxidação a partir do 8º mês.
- O leiteiro em pó reconstituído pode ser empregado como meio de crescimento de microrganismos. O microrganismo *L. paracasei* apresentou comportamento semelhante no meio contendo apenas leiteiro e no meio contendo apenas leite desnatado;
- Durante o período de armazenamento todas as formulações mantiveram as contagens de bactérias lácticas e *L. paracasei* dentro dos parâmetros estabelecidos na legislação. Neste período as Formulações 2 e 3 apresentaram menor

susceptibilidade à sinérese e a pós-acidificação não diferiu significativamente entre as formulações;

- A análise sensorial demonstrou que o leite em pó pode ser aplicado na formulação de bebidas lácteas fermentadas, em quantidade pré-estabelecida, de forma a não alterar as características do produto final;
- A incorporação do leite em pó em bebidas lácteas fermentadas pode reduzir a adição de ingredientes como leite integral, leite desnatado, soro de leite, e assim, agregar uma redução de custo ao produto final.

7 PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliar o efeito que diferentes concentrações de leite em pó geram nas propriedades físico-químicas e reológicas de leites fermentados.

Realizar trabalho de conscientização nos laticínios que produzem o subproduto leite em pó, como forma de não desperdiçar este valioso ingrediente alimentar.

Explorar outras aplicações para o leite em pó em produtos alimentícios, como, sorvetes, produtos de panificação, molhos, misturas secas, queijos, chocolates, massas, sopas, sucos, entre outros.

REFERÊNCIAS

ABREU, L.E.V.; TERRA, N.N.; MELLER, A.C.; MUSSOI, E.; BRUM, M.R.; ALMEIDA, J.P. Leiteiro, matéria-prima para a obtenção de levedura comestível. **Revista Centro Ciências Rurais**, v.6, n.3, p.275-280, 1976.

ALLEN, J.C.; HAMILTON, R.J. **Rancidity in foods**. 3.ed. London, UK: Chapman & Hall, 1994.

AMIOT, J. **Ciencia y tecnologia de la leche**. Zaragoza: Acribia, 1991.

AMRANE, A. Batch cultures of supplemented whey permeate using *Lactobacillus helveticus*: unstructured model for biomass formation, substrate consumption and lactic acid production. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p.827-834, 2001.

ANTUNES, A.E.C. **Influência do concentrado protéico do soro de leite e de culturas probióticas nas propriedades de iogurtes naturais desnatados**. Dissertação (Título de doutor em alimentos e nutrição). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21 ed. Washington: APHA/AWWA, 2005.

ARAÚJO, W.M.; MONTEBELLO, N.P.; BOTELHO, R.B.A.; BORGIO, L.A. **Alquimia dos alimentos**. Brasília: Editora Senac, 2009.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 16.ed. Washington, 1995.

ASTAIRE, J.C.; WARD, R.; GERMAN, J.B.; JIMÉNEZ-FLORES, R. Concentration of polar MFGM lipids of buttermilk by microfiltration and supercritical fluid extraction. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.2297-2307, 2003.

AZEREDO, H.M.C. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004.

BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v.29, p.54-66, 2011.

BAUMAN, D.E.; MATHER, I.H.; WALL, R.J.; LOCK, A.L. Major advances associated with the biosynthesis of milk. **Journal of Dairy Science**, v.89, n.4, p.1235–1243, 2006.

BEAL, C.; SKOKANOVA, J.; LATRILLE, E.; MARTIN, N.; CORRIEU, G. Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.673-681, 1999.

BEHMER, M.L.A. **Tecnologia do leite**. 7.ed. São Paulo: Nobel, 1982.

BELITZ, H.D. GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 4.ed. Germany: Springer, 2009.

BELLENGIER, P.; RICHARD, J.; FOUCAUD, C. Associative growth of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* strains in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1520–1527, 1997.

BIROLLO, G.A.; REINHEIMER, J.A.; VINDEROLA, C.G. Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. **Food Research International**, v.33, p.799-805, 2000.

BOTELHO, L. **Isolamento e identificação de lactobacilos e bifidobacterias em alimentos probióticos disponíveis no mercado brasileiro**. 2005. Tese (Doutorado em alimentos e nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BRAILE, P.M.; CAVALCANTI, J.E.W.A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais**. São Paulo: CETESB, 1979.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Anexo: Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Manteiga. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 mar.1996, p. 3977, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº20, de 21 de julho de 1999. Oficializa os Métodos Analíticos Físico-Químicos, para Controle de Produtos Carneos e seus Ingredientes. **Diário Oficial da União**, Brasília, 27 ago. 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 set. 2003, p. 14.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 dez. 2006, p. 8.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Adotar o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 out. 2007, p. 5.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. 2008. Lista das alegações aprovadas. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 24 ago. 2010.

BRITTEN, M.; LAMOTHE, S.; ROBITAILLE, G. Effect of cream treatment on phospholipids and protein recovery in butter-making process. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, p.651–657, 2008.

BROADBENT, J.R.; MCMAHON, D.J.; WELKER, D.L.; OBERG, C.J.; MOINEAU, S. Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.407-423, 2003.

BURNS, P.; VINDEROLA, G.; MOLINARI, F.; REINHEIMER, J. Suitability of whey and buttermilk for the growth and frozen storage of probiotic lactobacilli. **International Journal of Dairy Technology**, v.61, n.2, p.156-164, 2008.

CHARALAMPOPOULOS, D.; RASTALL, R.A. **Prebiotics and Probiotics Science and Technology**. Berlin: Springer, 2009.

CORREDIG, M.; DALGLEISH, D.G. Isolates from industrial buttermilk: emulsifying properties of material derived from the milk fat globules membrane. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.45, p.4595-4600, 1997.

CORREDIG, M.; ROESCH, R.R.; DALGLEISH, D.G. Production of a novel ingredient from buttermilk. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.2744-2750, 2003.

COSTA, M.R. **Obtenção de ingrediente lácteo enriquecido em lipídeos polares a partir de leite de soro**. 2008. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

COSTA, M.R.; JIMÉNEZ-FLORES, R.; GIGANTE, M.L. Propriedades da membrana do glóbulo de gordura do leite. **Revista Alimentos e Nutrição**, v.20, n.3, p.507-514, 2009.

CRACKEL, R.L.; GRAY, J.I.; PEARSON, A.M.; BOOREN, A.M.; BUCKLEY, D.J. Some further observations on the TBA test as an index of lipid oxidation in meats. **Food Chemistry**, v. 28, n.3, p.187-196, 1988.

CREMONESI, P.; VANONI, L.; MORANDI, S.; SILVETTI, T.; CASTIGLIONI, B.; BRASCA, M. Development of a pentaplex PCR assay for the simultaneous detection of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. elbrueckii subsp. lactis*, *L. helveticus*, *L. fermentum* in whey starter for Grana Padano cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.146, p.207–211, 2011.

CZERNIAK, A.S.; SZYK, E. Spectrophotometric determination of total phosphorus in rape seeds and oils at various stages of technological process: calculation of phospholipids and non-hydratable phospholipids contents in rapeseed oil. **Food Chemistry**, v.81, p.613-619, 2003.

DAIRY MANAGEMENT INC. Disponível em: www.dairyinfo.com. Acesso em: 25 maio, 2011.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *acidophilus*, and Bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p.1524-1536, 1996.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Effect of Cysteine on the Viability of Yoghurt and Probiotic Bacteria in Yoghurts Made with Commercial Starter Cultures. **Internacional Dairy Journal**, v.7, p.537-545, 1997.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Ingredient Supplementation Effects on Viability of Probiotic Bacteria in Yogurt. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.2804-2816, 1998.

DE VUYST, L.; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.23, p.153-177, 1999.

DEWETTINCK, K.; ROMBAUTA, R.; THIENPONTA, N.; LEA, T.T.; MESSENSB, K.; CAMPC, J.V. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material (Review). **International Dairy Journal**, v.18, p. 436-457, 2008.

DUBOC, P.; MOLLET, B. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. **International Dairy Journal**, v.11, p.759-768, 2001.

Food and Agriculture Organization (FAO). **FAOSTAT database**, 2009. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 20 set, 2011.

FOX, P.F. **Advanced Dairy Chemistry: Lipids**. 2.ed. London: Chapman & Hall, 1995.

FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H. **Advanced Dairy Chemistry: Lipids**. 3.ed. v.2. Birkhäuser, 2006

GASSI, J-Y.; FAMELART, M-H.; LOPEZ, C. Heat treatment of cream affects the physicochemical properties of sweet buttermilk. **Dairy Science and Technology**, 2008.

GONZALEZ, S.L.; BEZERRA, J.R.M.V.; RIGO, M.; RAYMUNDO, M.S. Elaboração de pães com adição de soro de manteiga. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v.5, n.3, 2009.

GOVINDASAMY-LUCEY, S.; LIN, T.; JAEGGI, J.J.; JOHNSON, M.E.; LUCEY, J.A. Influence of condensed sweet cream buttermilk on the manufacture, yield and functionality of pizza cheese. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.454-467, 2006.

GOVINDASAMY-LUCEY, S.; LIN, T.; JAEGGI, J.J.; MARTINELLI, C.J.; JOHNSON, M.E.; LUCEY, J.A. Effect of type of concentrated sweet cream buttermilk on the manufacture, yield and functionality of pizza cheese. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.2675-2688, 2007.

GUNSTONE, F.D.; PADLEY, F.B. **Lipid Technologies and Applications**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997.

HALL, C.W.; HEDRICK, T.I. **Drying of milk and milk products**. 2.ed. Westport, Connecticut: The Avi Publishing Company Inc., 1971.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos químicos e físicos para a análise de alimentos. 4.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JINJARAK, S.; OLABI, A.; JIMÉNEZ-FLORES, R.; SODINI, I.; WALKER, J.H. Sensory Evaluation of Whey and Sweet Cream Buttermilk. **Journal of Dairy Science**, v.89, n.7, p. 2441–2450, 2006.

KEENAN, T.W., PATTON, S. **Handbook of milk composition**. San Diego: Academic Press, 1995.

KRISTO, E.; BILIADERIS, C.G.; TZANETAKIS, N. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. **International Dairy Journal**, v.13, p.517–528, 2003.

KHURANA, H.K.; KANAWJIA, S.K. Recent Trends in Development of Fermented Milks. **Current Nutrition & Food Science**, v.3, p.91-108, 2007.

KOSIKOWSKI, F.V. **Cheese and fermented milk food**. 2.ed. New York: P.O. Box, 1978.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, p.680-685, 1970.

LANARA. Laboratório Nacional de Referencia Animal. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1981.

LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. **Sensory evaluation of food: principles and practices**. USA: Chapman & Hall, 1998.

LIBUDZISZ, Z.; STEPANIAK, L. **Buttermilk. Fermented Milks**. Encyclopedia of Dairy Sciences. Wyd. Academic Press, 2002.

LOPEZ, C.; BRIARD-BION, V.; MENARD, O.; ROUSSEAU, F.; PRADEL, P.; BESLE, J-M. Phospholipid, Sphingolipid, and Fatty Acid Compositions of the Milk Fat Globule Membrane are Modified by Diet. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.56, n.13, p.5226–5236, 2008.

LOYD, M.A.; DRAKE, M.A.; GERARD, P.D. Flavor Variability and Flavor Stability of U.S.-Produced Whole Milk Powder. **Journal of Food Science**, v.74, n.7, p.334-343, 2009.

MACHADO, R. M. G.; SILVA, P.C.; CASSEB, M.M.S.; PRINCE, A.A.; FREIRE, V.H. **Sistemas de tratamento utilizados para efluentes líquidos de laticínios 1999**. 20° Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental 1999. Disponível em: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=REPIDISCA>. Acesso em: 3 jun, 2011.

MAGENIS, R.B.; PRUDÊNCIO, E.S.; AMBONI, R.D.M.C.; JUNIOR, N.G.C.; OLIVEIRA, R.V.B.; SOLDI, V.; BENEDET, H.D. Compositional and physical properties of yogurts manufactured from milk and whey cheese concentrated by ultrafiltration. **International Journal of Food Science and Technology**, v.41, p.560–568, 2006.

MALIN, E.L.; BASCH, J.J.; SHIEH, J.J.; SULLIVAN, B.C.; HOLSINGER, V.H. Detection of Adulteration of Buttermilk Powder by Gel Electrophoresis. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.2199-2206, 1994.

MARTH, E.H.; STEELE, J.L. **Applied dairy microbiology**. 2.ed. New York: Marcel Dekker Inc., 2001.

MATHER, I.H. A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk fat globule membrane. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.203-247, 2000.

MATOS, A. T. **Tratamento de Resíduos Agroindustriais**, Curso sobre tratamento de resíduos agroindustriais. Universidade Federal de Viçosa. Maio 2005. Disponível em: <http://www.ufv.br/dec/simea/apresentacoes/CursoMatosFEAM2005.pdf>. Acesso em: 1 jun, 2011.

MCCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Lipídeos. Inc: DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap. 4, p.132-176.

MODLER, H.W.; KALAB, M. Microstructure of yogurt stabilized with milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v.66, p.430-437, 1983.

MORIN, P.; POULIOT, Y.; JIMÉNEZ-FLORES, R. A comparative study of the fractionation of regular buttermilk and whey buttermilk by microfiltration. **Journal of Food Engineering**, 2005.

MORIN, P.; BRITTEN, M.; JIMÉNEZ-FLORES, R.; Y. POULIOT, Y. Microfiltration of buttermilk and washed cream buttermilk for concentration of milk fat globule membrane components. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.5 , p.2132–2140, 2007.

MORIN, P.; POULIOT, Y.; BRITTEN, M. Effect of buttermilk made from creams with different heat treatment histories on properties of rennet gels and model cheeses. *Journal of Dairy Science*, v.91, p.871-882, 2008.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3.ed. Worth Publishers: New York, 2000.

NIKOLAOU, A.; SAXAMI, G.; KOURKOUTAS, Y.; GALANIS, A. A new methodology for rapid detection of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* based on multiplex PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v.84, p.362–364, 2011.

NOH, S.K.; KOO, S.I. Milk sphingomyelin is more effective than egg sphingomyelin in inhibiting intestinal absorption of cholesterol and fat in rats. **Journal of Nutrition**, v.134, p.2611–2616, 2004.

OLIVEIRA, R.P.S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, M.N. Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co-culture with *Streptococcus thermophilus*: The effect of inulin. **Food Science and Technology**, v.42, p.1015–1021, 2009.

PEREDA, J.A.O.; RODRIGUEZ, M.I.C.; ÁLVAREZ, L.F.; SANZ, M.L.G.; MINGUILLÓN, G.D.G.F.; PERALES, L.H.; CORTECERO, M.D.S. **Tecnología de alimentos: alimentos de origem animal**. v.2. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PIVARO, J. Um favor ao meio ambiente. **Revista Leite & Derivados**. n.108, set/out, 2008.

QUEIROZ, A.A.M. **Caracterização molecular de bactérias ácido lácticas com potencial tecnológico para produção de queijo de coalho no Ceará**. 2008. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

QUEJI, M.F.D.; STETS, M.I.; PRESTES, R.C.; SCHAMNE, C.; DEMIATE, I.M.; BARANA, A.C. **Obtenção de um produto tipo doce de leite utilizando subproduto da indústria de laticínios**. IX ERSCTA – IX Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Curitiba, 2007.

RICCIO, P. The proteins of the milk fat globule membrane in the balance. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, n.9, p.458–461, 2004.

RIGUEIRA, J.C.S. **Desenvolvimento de metodologia analítica para detecção de adulteração pela adição de leite em pó e leite fluido**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

ROBINSON, R.K. **Modern dairy technology: advances in milk processing**. v.1. England: Elsevier Applied Science Publishing, 1986.

ROMBAUT, R.; DEWETTINCK, K. Properties, analysis and purification of milk polar lipids (Review). **International Dairy Journal**, v.16, p.1362–1373, 2006.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MATTO, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Review article - Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v.84, p.97–215, 2000.

SÁNCHEZ-JUANES, F.; ALONSO, J.M.; ZANCADA, L.; HUESO, P. Distribution and fatty acid content of phospholipids from bovine milk and bovine milk fat globule membranes. **International Dairy Journal**, v.19, p.273-278, 2009.

SANTOS, J.F. **Avaliação da partida de leitos cultivados no tratamento de água residuária do processamento de doce de banana**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SEIXAS, A.C.M. **Produção e utilização de protease de *Bacillus subtilis* em tratamento de efluentes líquidos**. 2006. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SERRA, M.; TRUJILLO, A.J.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V. Evaluation of physical properties during storage of set and stirred yogurts made from ultra-high pressure homogenization-treated milk. **Food Hydrocolloids**, v.23, p.82–91, 2009.

SHAIKH, M.F.B.; RATHI, S.D. Utilization of buttermilk for the preparation of carbonated fruit-flavoured beverages. **International Journal of Dairy Technology**, v.62, n.4, p. 564-570, 2009.

SILVA, F.A.M; BORGES, F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Revista Química Nova**, v.22, n.1, p.94-103, 1999.

SILVA, D.J.P.; PEREIRA, V.F.; BARROS, F.A.R.; MOTTA, F.B.; ARAÚJO, M.A.; PASSOS, F.J.V. Gerenciamento de resíduos em uma indústria de produtos lácteos. **Revista Leite & Derivados**. n. 91. maio/jun, 2006.

SILVA, S.V. **Desenvolvimento de iogurte probiótico com prebiótico**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, RS.

SINGH, H. The milk fat globule membrane: A biophysical system for food applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.11, p. 154-163, 2006.

SINGH, M; BYARS, J.A. Starch-lipid composites in plain set yogurt. **International Journal of Food Science and Technology**, v.44, p.106–110, 2009.

SODINI, I.; MORIN, P.; OLABI, A.; JIMÉNEZ-FLORES, R. Compositional and Functional Properties of Buttermilk: A Comparison Between Sweet, Sour, and Whey Buttermilk. **Journal of Dairy Science**, v.89, n.2, p. 525–536, 2006.

SPENCE, A.J.; JIMÉNEZ-FLORES, R.; QIAN, M.; GODDIK, L. Phospholipid enrichment in sweet and whey cream buttermilk powders using supercritical fluid extraction. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.2373-2381, 2009.

SPITSBERG, V.L. Invited Review: Bovine Milk Fat Globule Membrane as a Potential Nutraceutical. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.7, p.2289–2294, 2005.

SPREER, E. **Lactologia industrial**. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1991.

STONE, H.; SIDEL, J.L. **Sensory evaluation practices**. 2.ed. USA: Academic Press, Inc., 1993.

TABASCO, R.; PAARUP, T.; JANER, C.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei subsp. paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. **International Dairy Journal**, v.17, p.1107–1114, 2007.

TALWALKAR, A.; KAILASAPATHY, K. Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus casei* complex from commercial yoghurts. **International Dairy Journal**, v.14, p.143–149, 2004.

TAMIME, A.Y.; ROBINSON, R.K. **Yoghurt: Science and Technology**. Oxford: Pergamon Press, 1985.

TAMIME, A.Y. **Dairy fats and related products**. Westmorland, UK: Wiley-Blackwell, 2009.

TORRE, L.L.; TAMIME, A.Y.; MUIR, D.D. Rheology and sensory profiling of set-type fermented milks made with different commercial probiotic and yoghurt starter cultures. **Internacional Journal of Dairy Technology**, v.56, n.3, p.163-170, 2003.

TRACHOO, N.; MISTRY, V.V. Application of ultrafiltered sweet buttermilk and sweet buttermilk powder in the manufacture of nonfat and low fat yogurts. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.12, p.3163–3171, 1998.

VALDUGA, E.; PAVIANI, L.C.; MAZUR, S.P.; FINZER, J.R.D. Aplicação do soro de leite em pó na panificação. **Revista Alimentação e Nutrição**, v.17, n.4, p.393-400, 2006.

VANDERGHEM, C.; BODSON, P.; DANTHINE, S.; PAQUOT, M.; DEROANNE, C.; BLECKER, C. Milk fat globule membrane and buttermilks: from composition to valorization. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v.14, n.3, p.485-500, 2010.

VIGLIENGO, E.; REINHEIMER, J. Use of whey and buttermilk based media to obtain biomass of thermophilic LAB. **International Journal of Dairy Technology**, v.62, n.3, p.431-437, 2009.

VINDEROLA, G.; PROSELLO, W.; MOLINARI, F.; GHIBERTO, D.; REINHEIMER, J. Growth of *Lactobacillus paracasei* A13 in Argentinian probiotic cheese and its impact on the characteristics of the product. **International Journal of Food Microbiology**, v.135, p.171–174, 2009.

WALSTRA, P.; GEURTS, T.J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; VAN BOEKEL, M.A.J.S. **Dairy Technology**: principles of milk properties and processes. New York: Marcel Dekker Inc., 1999.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. **Dairy science and technology**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2006.

WEBB, B.H.; WHITTIER, E.O. **Byproducts from milk**. 2.ed. The Avi Publishing Company: Westport, Connecticut, 1970.

WONG, P.Y.Y.; KITTS, D.D. An iron binding assay to measure activity of known food sequestering agents: studies with buttermilk solids. **Food Chemistry**, v.72, p.245-254, 2001.

WONG, P.Y.Y.; KITTS, D.D. A Comparison of the buttermilk solids functional properties to nonfat dried milk, soy protein isolate, dried egg white, and egg yolk powders. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.746-754, 2003a.

WONG, P.Y.Y.; KITTS, D.D. Chemistry of buttermilk solid antioxidant activity. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.1541-1547, 2003b.

ZACARCHENCO, P.B. **Leites fermentados por *Streptococcus thermophilus* adicionados de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum*: Isolamento diferencial dos microrganismos, multiplicação em diferentes condições e efeitos nas características sensoriais dos leites fermentados naturais ou modificados**. 2003. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ZHANG, H.; HAO, Y.; ZHANG, D.; LUO, Y. Characterization of the cryptic plasmid pTXW from *Lactobacillus paracasei* TXW. **Plasmid**, v.65, p.1-7, 2011.

APÊNDICE

FICHA DA ANÁLISE SENSORIAL

Por favor, avalie as 3 amostras de bebida fermentada e utilizando a escala abaixo descreva o quanto você gostou ou desgostou.

- 7 ⇒ Gostei muito
- 6 ⇒ Gostei moderadamente
- 5 ⇒ Gostei ligeiramente
- 4 ⇒ Indiferente
- 3 ⇒ Desgostei ligeiramente
- 2 ⇒ Desgostei moderadamente
- 1 ⇒ Desgostei muito

n° Amostra	Sabor	Textura	Aroma	Avaliação global

Quanto a sua amostra preferida (amostra n° _____) sua intenção de compra, seria:

- () Certamente compraria
- () Provavelmente compraria
- () Tenho dúvidas se compraria
- () Provavelmente não compraria
- () Certamente não compraria

Comentários: _____

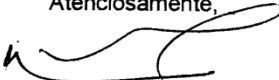
Muito obrigada, sua opinião é muito importante!

ANEXOS

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
 Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná
 Registro CONEP 268

Parecer PF Nº. 220/09 CAAE Nº. 0165.0.268.000-09 FOLHA DE ROSTO Nº. 286364	Londrina, 20 de abril de 2010.
PESQUISADORA: LUCIA HELENA DA SILVA MIGLIORANZA CCA/DCTA	
<p>Prezada Senhora:</p> <p>O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:</p> <p align="center">“DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA À BASE DE LEITELHO”</p>	
<p>Situação do Projeto: APROVADO</p> <p>Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.</p>	
<p align="center">Atenciosamente,</p>  <p align="center">Prof.ª. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel</p> <p align="center">Coordenadora Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UEL</p>	

ANEXO 2 – FICHA DE RECRUTAMENTO DE PROVADORES PARA TESTE DE ACEITAÇÃO E TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**QUESTIONÁRIO PARA RECRUTAMENTO DE PROVADORES (Teste de Aceitação)**

Desejamos formar uma equipe de provadores para avaliar a aceitação de uma bebida à base de leite. O leite é um subproduto da fabricação da manteiga, amplamente consumido em locais como a Europa e Estados Unidos, além de possuir excelente valor nutricional. Ser um provador não tomará muito seu tempo e não envolverá nenhuma tarefa difícil. A prova será realizada no Laboratório de Análise Sensorial do DCTA, leva em torno de 15 minutos e você poderá fazê-la no horário em que tiver maior disponibilidade.

Se você deseja participar do teste, por favor, preencha este formulário.

Se você tiver alguma dúvida, ou necessitar de informações adicionais, não hesite em entrar em contato com Juliana (tel: 9919-9680, e-mail: julianamfreixo@hotmail.com) ou Profa. Lúcia Miglioranza (tel: 3371-4080, e-mail: luciah@uel.br).

Dados Pessoais:

Nome _____

Tel. Residencial: _____ Email: _____

1. Faixa etária:

- 17-25
- 25-35
- 35-50
- acima de 50 anos

2. Sexo:

- masculino
- feminino

3. Ocupação:

- aluno
- funcionário
- professor
- outro

4. Escolaridade:

- 1º grau
- 2º grau
- 3º grau
- outro

5. Portador de doença coronariana, diabete ou possui algum histórico de alergia alimentar?

- Sim
- Não

6. Gosta de produtos lácteos?

() Sim () Não

7. Frequência de consumo de produtos lácteos

() Nunca

() Ocasionalmente - _____ vezes por ano

() Moderadamente - _____ vezes por mês

() Frequentemente - _____ vezes por semana

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Teste de Aceitação)

Eu, _____, declaro que fui satisfatoriamente esclarecido pelo pesquisador, em relação à minha participação no projeto de pesquisa “Desenvolvimento de Bebida à Base de Leiteiro”, na qualidade de provador ou julgador do produto. Sei que a função do provador para o teste de aceitação é avaliar o quanto gostou das amostras da bebida fornecidas durante a sessão de avaliação previamente agendada. Fui informado que o leiteiro é um subproduto da fabricação da manteiga, amplamente consumido em locais como a Europa e Estados Unidos e possui excelente valor nutricional. Tenho consciência que a ingestão de tal produto não trará nenhum risco à minha saúde por se tratar de um alimento seguro. Estou ciente que minha participação no teste irá requerer 15 minutos conforme descrito no **Questionário para Recrutamento de Provadores**, que respondi por desejar participar desta equipe sensorial. Entendo que poderei, a qualquer momento, entrar em contato com o pesquisador responsável (tel. trab.: 3371-4080, tel: 3327 5112 cel.: 9936 0507) e/ou com o Comitê de Ética (tel: 3371-2490), caso haja algum efeito inesperado. Entendo também que poderei deixar de participar da pesquisa em qualquer fase, que minha participação não envolverá quaisquer custos e que, ao participar, estarei colaborando para o desenvolvimento de uma dissertação de mestrado e o aperfeiçoamento de um profissional. Além disso, não coloco qualquer objeção quanto ao uso dos dados originados neste projeto para fins didáticos e de divulgação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras. Desta forma, sem ter sido submetido a qualquer tipo de pressão ou coação, concordo voluntariamente e expresso meu total consentimento em participar do projeto.

Londrina, _____ de _____ de 20__.

Assinatura do Pesquisador Responsável
(Profa. Dra Lúcia Helena Miglioranza)
tel/e-mail: 3371-4080/luciah@uel.br
Lab. Análise Sensorial do DCTA/CCA/UEL

Telefone/e-mail

Assinatura do Participante

ANEXO 3 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE DBO E DQO (LABORATÓRIO SÃO CAMILO, DIVISÃO ALIMENTOS E ÁGUA)



Ciência em Benefício da Vida

 divisão
Alimentos e Água

Laboratório credenciado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA - desde 2003.
 Portaria da SDA nº 120 de 1 de setembro de 2008 para análises microbiológicas de POA e Água.
 Portaria da SDA nº 188 de 14 de novembro de 2008 para análises Físico-Químicas de POA e Água.
 Laboratório habilitado pela Agência Nacional e Vigilância Sanitária - ANVISA/REBLAS desde 2007.
 Escopo publicado no site: www.anvisa.gov.br/reblas/bio/anal/analitico_093.htm
 Habilitado em: Físico-Química / Microbiologia / Microscopia

LABORATÓRIO - ALIMENTOS E ÁGUA: (44) 3221-4100 - R. Pion. Miguel Jordão Martinez, 349 - Maringá-PR
 TOLEDO-PR: (45) 8403-4393 - CURITIBA-PR: (41) 8416-4524 - MARÍLIA-SP: (14) 9774-5759
 FLORIANÓPOLIS-SC: (48) 9632-2664
www.saocamilosalimentos.com.br - recepcao@lsaalimentos.com.br

RELATÓRIO DE ENSAIO DO PROTOCOLO Nº.: 00095667


SOLICITANTE: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
**ENDEREÇO: ROD. CELSO GARCIA CID, KM 380 - JD.PORTAL DE VERSALHES
 Londrina - PR - CEP: 86051-990 - .**
RESPONSÁVEL: JULIANA M. FREIXO

DATA E HORA DO RECEB. DA AMOSTRA: 14/09/2010 16:30	DATA DO RESULTADO: 23/09/2010
PRODUTO: LEITELHO EM PÓ RECONSTITUÍDO	SOLICITAÇÃO: N.I.
MARCA/FORNECEDOR: CONFEPAR	VALIDADE: N.I.
LOCAL DA COLETA: CONFEPAR	LOTE: N.I.
DATA FABRICAÇÃO DO PRODUTO: 03/08/2010	LACRE: N.I.
COLETOR: Solicitante	DOCUMENTO DE REFERÊNCIA: N.I.
NÚMERO DE REGISTRO: N.I.	DATA E HORA DA COLETA: 03/08/2010 N.I.
TEMP. NA COLETA: N.I. °C	TEMP. NO RECEBIMENTO: 3.1°C

OBSERVAÇÃO: O LEITELHO (SORO DA MANTEIGA) EM PÓ FOI PREVIAMENTE RECONSTITUÍDO EM ÁGUA DESTILADA.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS	RESULTADO / UNIDADE	
Demanda Bioquímica de Oxigênio (em O ₂)	80.450,00	mg/L
Demanda Química de Oxigênio (em O ₂)	120.900,00	mg/L
N.I.: Dado(s) não informado(s) pelo Solicitante UFC - Unidade Formadora de Colônia N.D. - Não Detectável Est. - Estimado		

Referência do Método:

APHA) Standard Methods for examination of Water and Wastewater 21ª ed. 2005.

Maringá, 24/09/2010

André A. Machado
 QUÍMICO-TECNÓLOGO
 CRQ IX 9201833

Página: 1 de 1

 Amostra coletada e enviada pelo solicitante
 Este documento só poderá ser reproduzido por inteiro.

 Estes resultados têm validade apenas para a amostra analisada nas condições acima, não sendo extensivo a outros lotes.
 Os valores de referência estão disponíveis no site www.saocamilosalimentos.com.br