



**Universidade Norte do Paraná**

---

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE

CARLA SALETE JADÃO ALVES

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA LÁCTEA CARBONATADA  
ADICIONADA DE PROBIÓTICO**

---

Londrina  
2013

CARLA SALETE JADÃO ALVES

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA LÁCTEA CARBONATADA  
ADICIONADA DE PROBIÓTICO**

Dissertação de Mestrado, apresentada à  
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR,  
como requisito para a obtenção do título de  
Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Giselle A. Nobre Costa.  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Priscila C. B. Vianna.

Londrina  
2013

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

**Dados Internacionais de catalogação-na-publicação  
Universidade Norte do Paraná  
Biblioteca Central  
Setor de Tratamento da Informação**

A478d      Alves, Carla Salete Jadão  
Desenvolvimento de bebida láctea carbonada adicionada de probiótico / Carla Salete  
Jadão Alves. Londrina: [s.n], 2013.  
viii; 42f.

Dissertação (Mestrado). Ciência e Tecnologia do Leite – Fabricação de Derivados.  
Universidade Norte do Paraná.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Giselle A. Nobre Costa

1- Tecnologia do leite- dissertação de mestrado – UNOPAR    2- Bebida láctea 3-  
Dióxido de carbono 4- Probiótico I- Costa, Giselle A. Nobre, orient. II- Universidade  
Norte do Paraná.

CDU 637.1

CARLA SALETE JADÃO ALVES

## DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA LÁCTEA CARBONATADA ADICIONADA DE PROBIÓTICO

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Norte do Paraná - UNOPAR, no Centro de Ciências Agrárias, como requisito para a obtenção do título de Mestre, com nota final igual a \_\_\_\_\_, conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:



---

Profª Drª Giselle A. Nobre Costa  
Universidade Norte do Paraná

---

Profª Drª Cíntia Hoch Batista de Souza  
Universidade Norte do Paraná

---

Profª Drª Larissa Canhadas Bertan  
Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS

---

Profª Drª Lina Casale Aragon-Alegro (Suplente)  
Universidade Norte do Paraná- UNOPAR

Londrina, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força e coragem para chegar até aqui e nunca desistir.

Aos meus pais, grandes exemplos na minha vida, pelo carinho, atenção, confiança, amor e compreensão que tiveram por mim nessa fase tão importante.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Giselle A. Nobre Costa, minha orientadora, pela paciência, dedicação, atenção e apoio comigo sempre.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Priscila Cristina Bizam Vianna, co-orientadora pelo apoio e por ter me concedido parte de seus conhecimentos.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cíntia Hoch, pelas correções e sugestões tanto no exame de qualificação quanto na banca de defesa.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Larissa C. Bertan pelas correções e sugestões.

À aluna de iniciação científica Simone Andreotti, pelo apoio na execução das análises.

Ao Jorge M. Donato, técnico do Laboratório Mestrado em Tecnologia do Leite e Derivados, pela atenção, disponibilidade e companhia durante esses meses no laboratório.

ALVES, Carla Salete Jadão. **Desenvolvimento de bebida láctea carbonatada adicionada de probiótico**. 2013. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2013.

## RESUMO

No Brasil, o mercado de produtos lácteos é tradicional e bem estabelecido; inovar neste setor é sempre um desafio. Esse trabalho teve como objetivo, desenvolver uma bebida láctea carbonatada sabor maracujá, adicionada do probiótico *Lactobacillus casei*. O produto é inédito no mercado brasileiro, para tanto, foi elaborada uma bebida láctea carbonatada não fermentada, à base de soro de leite e leite bovino acrescentado de açúcar e polpa de maracujá. Foram elaboradas quatro diferentes formulações de bebidas (bebida sem probiótico e sem adição de CO<sub>2</sub>, bebida sem CO<sub>2</sub> e com o probiótico *L. casei* (2%), bebida adicionada de CO<sub>2</sub> e sem *L. casei* e bebida adicionada de CO<sub>2</sub> e de *L. casei* (2%)), para comparação do efeito da carbonatação sobre o desenvolvimento e manutenção do probiótico ao longo da estocagem refrigerada. Os produtos foram avaliados quanto às características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. A composição físico-química e contagens microbianas foram avaliadas após 1 dia de fabricação. O pH, acidez e contagem de microrganismos mesófilos, psicrotróficos e *L. casei* foram avaliados após 1, 7, 15 e 30 dias de armazenamento refrigerado. Os resultados foram avaliados por ANOVA e teste de médias de Tukey a 5% de significância. Os dados obtidos demonstraram que a composição físico-química das bebidas não foi influenciada pelos diferentes tratamentos, com exceção do pH e acidez nas bebidas carbonatadas, como esperado em consequência da adição do CO<sub>2</sub>. Os tratamentos não apresentaram um efeito evidente sobre o comportamento dos microrganismos mesófilos durante o tempo de armazenamento, entretanto, esta contagem diminuiu ao longo do tempo nas bebidas adicionadas do probiótico. A contagem de psicrotróficos foi maior nas bebidas sem adição de CO<sub>2</sub>, evidenciando a eficiência de inibição do CO<sub>2</sub> sobre estes microrganismos. A contagem de *L. casei* nas bebidas que sofreram sua adição permaneceu constante durante os 30 dias de armazenamento refrigerado e na ordem de 10<sup>7</sup> ufc/mL, portanto, as bebidas podem ser consideradas probióticas de acordo com a legislação Brasileira vigente. Independente dos tratamentos todas as bebidas apresentaram boa aceitação sensorial e intenção de compra, na faixa de 57% a 60%, por parte dos provadores. A partir dos dados obtidos neste estudo, pode-se concluir que produção de uma bebida láctea carbonatada e adicionada de probiótico é viável em escala industrial, principalmente por se tratar de um produto inovador no mercado brasileiro.

**Palavras-chave:** Bebida láctea. Dióxido de carbono. Probiótico.

ALVES, Carla Salete Jadão. **Developing carbonated milk drink with added probiotic**. 2013. 42 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2013.

## ABSTRACT

In Brazil, the dairy market is traditional and well established; innovate in this sector is always a challenge. This study aimed to develop a milk drink carbonated with passion fruit flavor and added the probiotic *Lactobacillus casei*. The product is new in the Brazilian market, therefore, we created a carbonated milk drink unfermented whey-based milk, cow milk, added with sugar and fruit pulp. Four different formulations were prepared (Drink without probiotic and without added CO<sub>2</sub>, drink without CO<sub>2</sub> and containing the probiotic *L. casei* (2%), drink with added CO<sub>2</sub> and without *L. casei* and drink with added CO<sub>2</sub> and with *L. casei* (2%), aiming to compare the effect of carbonation on the development and maintenance of probiotic during the refrigerated storage. The products were evaluated for physico-chemical, microbiological and sensory. The physico-chemical composition and microbial counts were evaluated after 1 day of manufacture. The pH, acidity and counts of mesophilic, psychrotrophic and *L. casei* were evaluated after 1, 7, 15 and 30 days of refrigerated storage. Results were evaluated by ANOVA and Tukey test at 5% significance. The data showed that the physico-chemical composition of the drinks was not influenced by the different treatments, with the exception of pH and acidity in carbonated beverages, as expected as a result of the addition of CO<sub>2</sub>. The treatments did not show a clear effect on the behavior of mesophilic microorganisms during the shelf life. However, this microbial count decreases in beverages of the probiotic added. Psychrotrophic count was greater in the beverage without addition of CO<sub>2</sub>, showing the effectiveness of inhibition of CO<sub>2</sub> on these microorganisms. The count of *L. casei* in beverages, remained constant during the 30 days of refrigerated storage in the order of 10<sup>7</sup> CFU/mL, so, can be considered as probiotic according the Brazilian Law's to probiotic foods. Regardless of treatments, the sensory panelists considered that all drinks were good acceptability and high purchase intent around to 57% to 60%. The data obtained in this study can be concluded that production of a milk drink carbonated and added probiotic, is viable on an industrial scale. This product is an innovative product and without similar in the Brazilian market.

**Key-words:** Milk beverage. Carbon dioxide. Probiotic.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Valores de pH durante o tempo de armazenamento.....	26
Figura 2 - Valores médios de acidez das bebidas lácteas submetidas aos diferentes tratamentos (Bebida 1 – Sem CO <sub>2</sub> e sem <i>L. casei</i> ; Bebida 2 – Sem CO <sub>2</sub> e com <i>L. casei</i> ; Bebida 3 – Com CO <sub>2</sub> e sem <i>L. casei</i> ; Bebida 4 – Com CO <sub>2</sub> e com <i>L. casei</i> ).....	27
Figura 3 - Valores de acidez das bebidas lácteas ao longo do tempo (Bebida 1 – Sem CO <sub>2</sub> e sem <i>L. casei</i> ; Bebida 2 – Sem CO <sub>2</sub> e com <i>L. casei</i> ; Bebida 3 – Com CO <sub>2</sub> e sem <i>L. casei</i> ; Bebida 4 – Com CO <sub>2</sub> e com <i>L. casei</i> ).....	28
Figura 4 - Populações de microrganismos mesófilos durante o tempo de armazenamento. (Bebida 1 – Sem CO <sub>2</sub> e sem <i>L. casei</i> ; Bebida 2 – Sem CO <sub>2</sub> e com <i>L. casei</i> ; Bebida 3 – Com CO <sub>2</sub> e sem <i>L. casei</i> ; Bebida 4 – Com CO <sub>2</sub> e com <i>L. casei</i> ).....	29
Figura 5 - Populações de microrganismos psicrotróficos durante o tempo de armazenamento. (Bebida 1 – Sem CO <sub>2</sub> e sem <i>L. casei</i> ; Bebida 2 – Sem CO <sub>2</sub> e com <i>L. casei</i> ; Bebida 3 – Com CO <sub>2</sub> e sem <i>L. casei</i> ; Bebida 4 – Com CO <sub>2</sub> e com <i>L. casei</i> ).....	31
Figura 6 - Populações observadas para <i>L. casei</i> durante o armazenamento. (Bebida 2 – Sem CO <sub>2</sub> e com <i>L. casei</i> ; Bebida 4 – Com CO <sub>2</sub> e com <i>L. casei</i> ).....	32
Figura 7 - Intenção de compra das bebidas lácteas com diferentes tratamentos.....	34



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>10</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	10
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>11</b>
3.1	ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	12
3.2	EFEITOS BIOLÓGICOS DOS PROBIÓTICOS .....	13
3.3	UTILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS EM PRODUTOS LÁCTEOS .....	14
3.4	BEBIDAS LÁCTEAS.....	16
3.5	UTILIZAÇÃO DO DIÓXIDO DE CARBONO EM LEITE E PRODUTOS LÁCTEOS .....	18
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>20</b>
4.1	PREPARO DAS BEBIDAS LÁCTEAS.....	20
4.2	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS.....	21
4.3	AVALIAÇÃO SENSORIAL.....	21
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	22
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
5.1	COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DAS BEBIDAS LÁCTEAS.....	23
5.2	EFEITO DO TEMPO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO- QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DAS BEBIDAS.....	25
5.3	AVALIAÇÃO SENSORIAL.....	32
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>35</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>36</b>

<b>ANEXOS .....</b>	<b>41</b>
Anexo 1 - Modelo de ficha utilizada para avaliação sensorial .....	42

## 1 INTRODUÇÃO

O uso dos alimentos como promotores do bem-estar e saúde tem incentivado as pesquisas e o desenvolvimento de novos ingredientes, possibilitando a inovação em produtos alimentícios e a criação de novos nichos de mercado. Desta forma, os alimentos funcionais, atualmente, têm sido pesquisados, e suas propriedades e efeitos de saúde no consumidor, amplamente avaliados.

Entre os alimentos funcionais, os probióticos têm atraído especial atenção de pesquisadores e indústrias de alimentos. Os alimentos probióticos são suplementados com microrganismos vivos e que quando consumidos regularmente em quantidades suficientes, podem produzir efeitos benéficos ao hospedeiro.

Além da importância dos probióticos à saúde, atualmente, novas tecnologias de processamento e acondicionamento de alimentos, como adição de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) têm sido pesquisadas. O CO<sub>2</sub> tem sido utilizado para a conservação de leite cru, devido a seu efeito bacteriostático sobre microrganismos gram-negativos, principalmente os psicotróficos que são responsáveis por diversos defeitos de qualidade em leite e produtos lácteos processados. Além disso, o CO<sub>2</sub> pode também ser utilizado na produção de bebidas carbonatadas, e tratando-se de bebidas lácteas, não existem produtos carbonatados disponíveis no mercado brasileiro. No caso da fabricação de bebidas lácteas carbonatadas, o CO<sub>2</sub> pode ter função sensorial onde a carbonatação promove a sensação de frescor, além do prolongamento da vida de prateleira do produto refrigerado, devido à inibição do desenvolvimento de alguns microrganismos.

Assim, essa dissertação teve como objetivo desenvolver uma bebida láctea carbonatada, adicionada do probiótico *Lactobacillus casei*, e foi observado o comportamento deste microrganismo na presença do CO<sub>2</sub>. Adicionalmente, o produto foi caracterizado físico-química e microbiologicamente e foi avaliado por provadores quanto à aceitação sensorial e intenção de compra.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma bebida láctea carbonatada adicionada de probiótico.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar as características físico-químicas e microbiológicas das bebidas lácteas produzidas;

Avaliar o comportamento do microrganismo *L. casei* frente ao CO<sub>2</sub>;

Avaliar a aceitação sensorial e intenção de compra do produto desenvolvido.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O Brasil se destaca em diversas cadeias produtivas do agronegócio, inclusive a do leite, cuja dinâmica de produção e consumo vem se intensificando há mais de uma década. No ano de 2011, o país alcançou uma produção de 11,429 mil toneladas, ficando atrás respectivamente dos Estados Unidos, da Rússia e China (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2011).

Em franca expansão, o mercado mundial de alimentação funcional movimentou US\$ 154 bilhões em 2011 segundo dados da Consultoria Euromonitor International (BRAZIL TRADE SHOWS, 2013). A previsão é que, em dez anos, os alimentos funcionais detenham 40% do mercado de alimentos, e este mercado continua em expansão (RAUD, 2008).

Estima-se que a taxa de crescimento anual de vendas de bebidas probióticas e iogurtes seja de 5% entre 2006 e 2011 (ÖZER; KIRMACI, 2010). O Brasil, já é responsável por contabilizar 10 bilhões de dólares, das vendas de alimentos funcionais, o que representa 35% do total deste negócio na América Latina (BRAZIL TRADE SHOWS, 2013). No Brasil, a venda de alimentos funcionais em 2007 atingiu 500 mil dólares, correspondendo quase a 1% do total de vendas de alimentos. Além disso, cerca de 65% do total desses produtos, são de alimentos que contém probióticos (CRUZ; FARIA; VAN DENDER, 2007).

O interesse por produtos alimentícios saudáveis, nutritivos e de grande aproveitamento tem crescido mundialmente, o que resulta em diversos estudos na área de produtos lácteos. Alguns desses estudos têm dado ênfase ao valor nutricional dos ingredientes lácteos, assim como à importância de uma dieta baseada nestes em produtos (THAMER; PENNA, 2005).

O mercado global de probióticos aumentou de 14,9 bilhões de dólares em 2007 para um valor de 15,9 bilhões de dólares em 2008, e deve atingir 19,6 bilhões dólares em 2013. O Japão representou a maior fatia das vendas totais em 2007, com 39,5%, impulsionado principalmente pelo grande e bem desenvolvido segmento de alimentos probióticos do país (AGHEYISI, 2008).

Com esse crescimento no consumo de produtos lácteos, o uso desses alimentos como veículo de promoção do bem-estar e saúde e, ao mesmo tempo, como redutor dos riscos de algumas doenças, tem incentivado as pesquisas de novos componentes naturais e o desenvolvimento de novos ingredientes,

possibilitando a inovação em produtos alimentícios e a criação de novos nichos de mercado (MATSUBARA, 2001).

Segundo Komatsu, Buriti, Saad, (2008) o desenvolvimento de novos produtos alimentícios torna-se cada vez mais desafiador, à medida que procura atender à demanda dos consumidores por produtos que, simultaneamente, sejam atrativos, saborosos e saudáveis. Logo, a alimentação de indivíduos com estilo de vida saudável tende a ser um ato prazeroso e que ao mesmo tempo visa à saúde e o bem estar.

### 3.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Inúmeros fatores afetam a qualidade da vida moderna, de forma que a população deve conscientizar-se da importância de alimentos contendo substâncias que auxiliam a promoção da saúde, trazendo com isso uma melhora no estado nutricional. A incidência de morte devido a acidentes cardiovasculares, câncer, acidente vascular cerebral, arteriosclerose, enfermidades hepáticas, dentre outros, pode ser minimizada através de bons hábitos alimentares. Para ajudar essa promoção da saúde, os alimentos funcionais devem ser consumidos como parte da dieta (MORAES; COLLA, 2006).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) alimentos funcionais são alimentos ou ingredientes que alegarem propriedades funcionais ou de saúde, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzirem efeitos metabólicos e ou fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica (BRASIL, 1999). Os alimentos funcionais são também conhecidos como nutracêuticos, alimentos medicinais, alimentos terapêuticos, super alimentos, “designer foods”, “foodiceuticals” e “medifoods” (SHAH, 2007).

Um alimento pode ser considerado funcional se for demonstrado que o mesmo pode afetar beneficemente uma ou mais funções alvo no corpo, além de possuir os adequados efeitos nutricionais, de maneira que seja tanto relevante para o bem-estar e a saúde quanto para a redução do risco de uma doença (ROBERFROID, 2002). Em geral, os alimentos e ingredientes funcionais são classificados quanto à fonte, de origem vegetal ou animal, ou quanto aos benefícios que oferecem, atuando em áreas do organismo como no sistema gastrointestinal, no

sistema cardiovascular, no metabolismo de substratos, no crescimento, no desenvolvimento e diferenciação celular e no comportamento das funções fisiológicas e como antioxidantes (SOUZA; SOUZA NETO; MAIA, 2003).

Um importante grupo de alimentos funcionais é o dos probióticos, definidos como suplementos alimentares que contêm microrganismos vivos, que quando ingeridos em determinado número, apresentam efeito benéfico sobre a saúde e bem-estar do hospedeiro. Estes microrganismos são capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos positivos à saúde do indivíduo (FAO/WHO, 2001; SANDERS, 2003).

De acordo com a ANVISA (BRASIL, 2008), probióticos são microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo. Culturas probióticas podem ser encontradas em formulações farmacêuticas e em produtos alimentícios variados. A alegação mais comum para o efeito benéfico destes microrganismos está associada à contribuição para o equilíbrio da microbiota intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis.

### 3.2 EFEITOS BIOLÓGICOS DOS PROBIÓTICOS

São benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas: estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes; alívio da constipação; aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas. Além da diminuição do risco de câncer de cólon, doença cardiovascular e efeitos anti-hipertensivos (TUOHY et al., 2003).

Os probióticos possuem efeitos benéficos, seus mecanismos de ação envolvidos são diversos e dentre eles o incremento do efeito barreira no intestino, impedindo, assim, a colonização do epitélio intestinal por bactérias patogênicas, isso é dito efeito barreira e é dado pela competição que ocorre no intestino favorecendo as bactérias probióticas. Também ocorre estímulo do sistema imunológico facilitando a defesa do organismo e significativa redução dos níveis de colesterol total com diminuição do colesterol LDL (VARAVALLO; THOMÉ; TESHIMA, 2008).

Oelschlaeger (2010) relatou que os efeitos dos probióticos podem

ser classificados em três modos de ação:

- Podem ser capazes de modular as defesas do hospedeiro, bem como o sistema imune. Este modo de ação é importante para a prevenção e tratamento de doenças infecciosas, mas também para o tratamento de inflamação do trato digestivo.

- Podem também ter um efeito direto sobre microrganismos ou agentes patogênicos. Este princípio é em muitos casos importante para a prevenção e tratamento de infecções e de restauração do equilíbrio microbiano no intestino.

- Podem ser baseadas em ações microbianas que podem resultar na inativação de toxinas e desintoxicação de componentes no intestino.

### 3.3 UTILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS EM PRODUTOS LÁCTEOS

A indústria de laticínios, em particular, encontrou nas culturas probióticas uma ferramenta para o desenvolvimento de novos produtos (CHAMPAGNE; GARDNER; ROY, 2005). Consequentemente, inúmeros produtos lácteos probióticos estão disponíveis comercialmente e a variedade desses produtos continua em expansão (STANTON et al, 2003, RAUD, 2008).

Segundo Jousse (2008), o desenvolvimento de novos produtos, é um constante desafio para a investigação tanto científica, quanto aplicada, e têm sido observado que o consumo de alimentos é essencialmente uma forma de otimização dos ingredientes essenciais, para gerar uma melhor formulação. Neste contexto, o desenvolvimento de novos produtos funcionais, torna-se cada vez mais desafiador, já que devem atender as expectativas do consumidor que deseja produtos simultaneamente saborosos e saudáveis (SHAH, 2007).

Atualmente, alimentos probióticos nos quais o microrganismo seja mantido na forma viável, têm sido amplamente utilizados em produtos lácteos, e têm fácil aceitação pelo consumidor. Os produtos mais comumente acrescidos de probióticos são iogurtes, leites fermentados, bebidas lácteas e queijos, por ocuparem grande fatia do mercado e oferecem muitas possibilidades para serem utilizados como adjunto dietético (GUGLIELMOTTI et al., 2007).

As características mais importantes de uma espécie probiótica, é que não deve ser patogênico, não tóxico e não carcinogênico, sendo assim



considerado como seguro (GRAS - Generally Regarded As Safe). Os probióticos também devem apresentar manutenção da viabilidade durante o processamento e armazenamento dos alimentos, facilidade de aplicação em produtos e resistência à transformação físico-química do alimento (PRADO et al., 2008). Além disso, deve sobreviver e se manter no trato gastrointestinal, isso está relacionada à resistência a valores baixos de pH, aos sais biliares e aos fatores antimicrobianos neste ambiente. Além disso, devem aderir à mucosa intestinal (SANDERS; KLAENHAMMER, 2001).

A aderência de microrganismos probióticos às células epiteliais do intestino e a subsequente colonização da mucosa são de fundamental importância para a ocorrência dos efeitos benéficos à saúde humana (FORESTIER et al., 2001).

Dentre os microrganismos probióticos mais utilizados em alimentos ou fármacos, destacam-se várias cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. De acordo com Shah (2007), 56 espécies probióticas são reconhecidas como pertencentes ao gênero *Lactobacillus* e 29 espécies classificadas como *Bifidobacterium*. Além disso, algumas espécies de *Bacillus* e leveduras também possuem tal característica.

Dentre as bactérias lácticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, destacam-se *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. casei* - subsp. *paracasei* e subsp. *tolerans*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius* (SANDERS; KLAENHAMMER, 2001).

As espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* fazem parte do chamado “Grupo *Lactobacillus casei*” e possuem importante valor comercial para a indústria alimentícia, devido ao seu emprego na produção de leites fermentados e como culturas iniciadoras de fermentação na fabricação de queijos para a melhoria de sua qualidade (VÁSQUEZ et al., 2005).

Dentre as várias características associadas às bactérias lácticas, o grupo *Lactobacillus casei*, destaca-se, também, o fato delas possuírem atividade antimicrobiana contra microrganismos patógenos, contaminantes e deteriorantes em alimentos (SCHWENNINGER et al., 2005).

A quantidade mínima viável para um alimento ser considerado probiótico deve estar situada na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC), na recomendação diária do produto pronto para o consumo. Valores

menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia. A documentação referente à comprovação de eficácia, deve incluir: laudo de análise do produto que comprove a quantidade mínima viável do microrganismo até o final do prazo de validade e teste de resistência da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e aos sais biliares (BRASIL, 2008).

Houve um aumento do número de produtos probióticos disponíveis no mercado brasileiro. Dessa forma, é fundamental considerar a somatória dos microrganismos viáveis ingeridos nos diversos produtos probióticos consumidos ao longo do dia. Entretanto, é importante, ainda, ressaltar que a maior disponibilidade de dados sobre as concentrações bacterianas efetivas indica, claramente, que a concentração probiótica necessária varia em função da cepa e do efeito desejado sobre a saúde (CHAMPAGNE; GARDNER; ROY, 2005).

### 3.4 BEBIDAS LÁCTEAS

Segundo a Instrução Normativa nº 16 de 23/08/2005, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, bebida láctea é o produto lácteo resultante da mistura do leite (*in natura*, pasteurizado, esterilizado, UHT, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado e em pó) adicionado ou não de produto(s) ou substância(s) alimentícia(s), gordura vegetal, leite(s) fermentado(s), fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos. A base láctea representa pelo menos 51% (cinquenta e um por cento) massa/ massa (m/m) do total de ingredientes do produto. Essas bebidas apresentam consistência líquida, de diferentes graus de viscosidade, de acordo com a sua composição (SÃO PAULO, 2005).

A tecnologia de fabricação de bebidas lácteas baseia-se na mistura de iogurte e soro de queijo em proporções adequadas, seguida da adição de ingredientes como aromatizantes, corantes, edulcorantes, polpa de frutas e outros, de acordo com a formulação proposta (SIVIERI; OLIVEIRA, 2002). As bebidas lácteas podem conter em sua formulação, além do soro de queijo, do leite e dos cultivos de bactérias lácticas, acidulantes, aromatizantes, reguladores de acidez, estabilizantes, espessantes, emulsificantes, corantes, conservantes, frutas (pedaços, polpa ou sucos) e mel (THAMER; PENNA, 2005).

O soro do queijo, uma vez descartados diretamente nos mananciais de água, representa o mais sério problema de poluição causado pelos laticínios (LOW et al., 2001). Apesar de ser poluente, o soro tem alto valor biológico, pois é constituído de água, minerais, açúcares e proteínas (20% das proteínas totais do leite). A concentração do soro gera produtos protéicos que, além de serem utilizados como ingredientes, melhorando as propriedades funcionais (viscosidade, solubilidade, gelificação, emulsificação, formação de espuma, estabilidade) dos alimentos, apresentam também potencial por possuírem componentes aos quais se atribuem algumas propriedades biológicas importantes (WALZEM; DILLAR; GERMAN, 2002).

Por outro lado, a produção de soro de leite em pó, que se torna inviável para laticínios de pequeno e médio porte, por necessitar de alto investimento para compra de equipamento e mão-de-obra especializada para a operação, é muito utilizado para a fabricação de bebidas lácteas. A elaboração de bebidas com soro líquido envolve equipamentos e acessórios comuns, encontrados na maioria dos laticínios (SIVIERI; OLIVEIRA, 2002).

As proteínas do soro do leite possuem um excelente perfil de aminoácidos, caracterizando-as como proteínas de alto valor biológico. Possuem peptídeos bioativos do soro, que conferem a essas proteínas diferentes propriedades funcionais. Os aminoácidos essenciais, com destaque para os de cadeia ramificada, favorecem o anabolismo, assim como a redução do catabolismo protéico, favorecendo o ganho de força muscular e reduzindo a perda de massa muscular durante a perda de peso. O cálcio favorece a redução da gordura corporal e melhoram o desempenho muscular, por elevarem as concentrações de glutathione, diminuindo, assim, a ação dos agentes oxidantes nos músculos esqueléticos. Também exercem papel importante no controle da pressão sanguínea e como agente redutor do risco cardíaco (HARAGUSHI; ABREU; PAULA, 2006).

Além disso, as proteínas do soro têm sido muito utilizadas pela indústria de alimentos, em diferentes áreas devido às suas excelentes propriedades nutritivas e fisiológicas e por apresentarem propriedades físico-químicas e funcionais muito apreciadas como ingredientes alimentícios (CHATTERTON et al., 2006). Ingredientes lácteos à base de soro podem substituir, com eficiência os sólidos do leite e dar origem a fórmulas alternativas para diversos alimentos (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2006).

O desenvolvimento de uma bebida láctea funcional adicionada de culturas probiótica, é utilizada para o aproveitamento do soro pelas indústrias lácteas, sem a necessidade de grandes investimentos ou de grandes mudanças na rotina de fabricação. Assim, as indústrias geram novos recursos e, principalmente, melhoram o valor nutritivo deste produto (THAMER; PENNA, 2005).

### 3.5 UTILIZAÇÃO DO DIÓXIDO DE CARBONO EM LEITE E PRODUTOS LÁCTEOS

No setor de produção de alimentos há uma tendência de substituição dos métodos de conservação que alterem química e fisicamente os alimentos, por métodos menos severos. Por isso, grande atenção tem sido dada a novas tecnologias de processamento e acondicionamento, tais como atmosfera modificada, embalagens ativas, adição de CO<sub>2</sub>, alimentos minimamente processados e alimentos irradiados, dentre outras. Assim, procura-se atender a uma crescente demanda dos consumidores por alimentos frescos e de boa qualidade, com maior vida útil, porém sem aditivos (CRUZ; SOARES, 2002).

A maioria das técnicas de preservação empregadas para prevenir ou retardar a multiplicação microbiana em produtos alimentícios, são redução de temperatura, redução do pH, redução da atividade de água e aplicação de calor. De acordo com Leistner (1995), essas técnicas convencionais podem ser usadas juntamente com tecnologias alternativas, ocasionando um sinergismo entre elas. Uma dessas técnicas alternativas é o uso do dióxido de carbono juntamente com a redução de temperatura.

A adição de CO<sub>2</sub> na atmosfera em torno de um produto reduz as populações de microrganismos patogênicos (DEVLIÉGHÈRE; DEBEVERE, 2000). A adição de CO<sub>2</sub> em leite cru refrigerado é um procedimento eficaz para inibir a proliferação de psicrotóxicos (RUAS-MADIEDO et al., 1996).

Existem 3 mecanismos propostos para a ação inibitória do CO<sub>2</sub> sobre microrganismos: substituição do oxigênio pelo CO<sub>2</sub>, diminuição do pH do meio devido à dissolução do CO<sub>2</sub> e formação de ácido carbônico e efeito direto no metabolismo. Desta forma, a ação do CO<sub>2</sub> prolonga a fase lag e aumenta o tempo de geração dos microrganismos retardando o seu desenvolvimento e estendendo a vida de prateleira dos produtos (HOTCHKISS; WERNER; LEE, 2006).

A adição de CO<sub>2</sub> altera o pH do leite e pode resultar na diminuição

do ponto de congelamento e em alterações organolépticas, entretanto essas mudanças são reversíveis após a degaseificação do produto. Componentes do leite como caseínas, proteínas do soro e vitaminas não são afetados pelo tratamento com CO<sub>2</sub> (RUAS-MADIEDO et al., 1996, 1998).

Vianna e Gigante (2010) avaliaram o efeito da adição de CO<sub>2</sub> e da temperatura de armazenamento, bem como da interação desses fatores sobre o desenvolvimento microbiano, proteólise e lipólise do leite cru refrigerado. Foi observado que a adição de CO<sub>2</sub> ao leite cru retardou o desenvolvimento de microrganismos mesófilos e psicotróficos, reduziu a proteólise e a lipólise durante o armazenamento e favoreceu a manutenção da qualidade microbiológica e físico-química tanto a 4°C como a 7°C. Shaikh et al. (2001) desenvolveram um processo para a preparação de uma bebida de soro carbonatada fermentada, na qual o processo de fermentação desenvolvido, produziu “flavor” de ácido láctico aceitável, eliminando o odor de soro natural. A carbonatação da bebida ajudou a melhorar a aceitabilidade. A formulação mais aceitável foi obtida com 12% de açúcar, 0,1% de aroma de abacaxi e 72,48 kg/cm<sup>2</sup> de carbonatação.

Lam e Petitfour (2000) patentearam uma bebida láctea carbonatada e seu processo de fabricação. A bebida consiste de 8-50% de um ingrediente lácteo, e foi carbonatada a uma pressão de 1,53 a 7,14 Kgf/cm<sup>2</sup> a 4°C e possui 0,3-0,5% de pectina com grau de esterificação de 60-75%.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 PREPARO DAS BEBIDAS LÁCTEAS

A bebida utilizada como base para as formulações (Quadro 1) foi produzida conforme Bassi et al. (2011) com exceção da etapa de fermentação. Foram feitos 3 processamentos independentes.

Utilizou-se leite UHT integral, 3% de gordura (Parmalat, São Paulo, SP), e soro de leite em pó (Confepar, Londrina, PR) na proporção de 70:30. O soro de leite em pó foi reconstituído a 14% de sólidos e misturado ao leite UHT integral. A mistura foi aquecida a 90°C/5 min e resfriada a 10°C e foram adicionados dos demais ingredientes: 5% de açúcar (União, Rio de Janeiro, RJ), 5% de polpa de maracujá (Redondo, Cambé, PR) e 0,2% de aromatizante artificial de maracujá (Duas Rodas Industrial, Jaraguá do Sul, SC). A polpa de maracujá e o açúcar foram misturados, aquecidos a 90°C/1 min e resfriados a temperatura ambiente (25°C ± 5) antes da adição às bebidas.

Quadro1 - Formulações das bebidas.

FORMULAÇÕES
1) bebida sem probióticos e sem adição de CO <sub>2</sub>
2) bebida sem CO <sub>2</sub> e com <i>Lactobacillus casei</i> (2%)
3) bebida adicionada de CO <sub>2</sub> e sem <i>Lactobacillus casei</i>
4) bebida adicionada de CO <sub>2</sub> e de <i>Lactobacillus casei</i> (2%)

Fonte: Da autora.

O CO<sub>2</sub> foi borbulhado diretamente nas amostras 3 e 4 refrigeradas a 4°C com o auxílio de uma mangueira devidamente higienizada. A concentração de CO<sub>2</sub> foi monitorada pelo abaixamento do pH (em 0,3 pontos na escala de pH), definida em testes preliminares.

O probiótico *Lactobacillus casei* (C. Hansen, Valinhos, Brasil), foi acrescentado na concentração de 2% na formulação 2 não carbonatada e na formulação 4 após a carbonatação. Para preparar a cultura, foram dissolvidos 24 g

de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, Brasil) em 200 ml de água e adicionada uma ponta de espátula da cultura liofilizada. Esta mistura foi incubada a 37°C até a coagulação (~3 horas) e depois foi adicionada às bebidas na proporção de 2% (v/v).

Após as produções, cada amostra foi envasada em garrafas PET (250 mL), hermeticamente fechadas e armazenadas a 4°C durante 30 dias para análises.

#### 4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS

As amostras foram avaliadas em triplicata, quanto ao pH, acidez, extrato seco total, nitrogênio total, lactose, cinzas (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1995), gordura (BRASIL, 1981) e contagens microbianas, 1 dia após o processamento e após 7, 15 e 30 dias de armazenamento refrigerado foram avaliados apenas o pH, acidez e contagens microbianas.

Foram realizadas as contagens de microrganismos mesófilos, coliformes fecais e totais, psicotróficos (APHA, 1992) e de *Lactobacillus casei*. Para enumeração do *Lactobacillus casei*, foi utilizado plaqueamento em profundidade com sobrecamada, utilizando Agar MRS (de Man Rogosa and Sharpe). As placas foram incubadas a 37°C/72 horas.

#### 4.3 AVALIAÇÃO SENSORIAL

As formulações foram submetidas à avaliação sensorial após 5 dias de armazenamento refrigerado. Foram recrutados 70 provadores não treinados e a avaliação foi realizada em cabines individuais, sob luz branca. As bebidas foram avaliadas quanto à aceitação geral, cor, sabor e aroma, utilizando escala hedônica de 9 pontos variando de “1 – desgostei muitíssimo” a “9 – gostei muitíssimo”. A intenção de compra também foi avaliada utilizando escala estruturada de cinco pontos, onde 1 = certamente não compraria e 5 = certamente compraria (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2006). As amostras foram codificadas e distribuídas de forma monádica aos provadores. O modelo de ficha utilizada para avaliação sensorial encontra-se em Anexo 1.

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os efeitos da adição de CO<sub>2</sub> sobre as características físico-químicas e sobre as contagens microbianas das bebidas lácteas e os resultados dos testes de aceitação sensorial foram avaliados por análise de variância e teste de médias de Tukey a 5% de significância. Os resultados do teste de intenção de compra foram transformados em porcentagem e analisados através de um histograma de frequências. O programa utilizado foi o Statistic 8.0 (Stat Soft, Inc).



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DAS BEBIDAS LÁCTEAS

A Tabela 1 apresenta a composição físico-química e microbiológica das bebidas um dia após o processamento.

Tabela 1 - Composição físico-química das bebidas lácteas (n=3).

	Bebida 1	Bebida 2	Bebida 3	Bebida 4	Valor de <i>p</i>
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
pH	5,69 ± 0,15 <sup>a</sup>	5,53 ± 0,04 <sup>b</sup>	5,43 ± 0,08 <sup>b</sup>	5,44 ± 0,05 <sup>b</sup>	< 0,0001
Acidez (°D)	41 ± 2 <sup>c</sup>	46 ± 5 <sup>b</sup>	54 ± 2 <sup>a</sup>	54 ± 3 <sup>a</sup>	< 0,0001
Gordura (%)	1,99 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,94 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,96 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,96 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,3569
EST (%)	14,2 ± 1,3 <sup>a</sup>	15,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	13,3 ± 2,4 <sup>a</sup>	13,3 ± 2,6 <sup>a</sup>	0,6379
Cinzas (%)	0,79 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,69 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,74 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,2664
Proteína Total (%)	2,44 ± 0,83 <sup>a</sup>	3,20 ± 1,4 <sup>a</sup>	3,07 ± 1,3 <sup>a</sup>	2,93 ± 1,63 <sup>a</sup>	0,6343
Mesófilos (UFC/mL)	1,20	4,74	2,32	4,79	< 0,0001
Psicrotróficos (UFC/mL)	1,41	1,39	1,32	1,07	0,5597
<i>L. casei</i> (UFC/mL)	---	7,20	---	7,71	0,1233
Coliformes a 45°C (NMP/mL)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	---

Bebida 1 – Sem CO<sub>2</sub> e sem *L. casei*; Bebida 2 – Sem CO<sub>2</sub> e com *L. casei*; Bebida 3 – Com CO<sub>2</sub> e sem *L. casei*; Bebida 4 – Com CO<sub>2</sub> e com *L. casei*.

<sup>a, b, c</sup> Médias com letras iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa (*p* > 0,05).

Fonte: Da autora.

As bebidas apresentaram composição físico-química (BRASIL, 2005) e microbiológica (BRASIL, 2001) dentro dos padrões exigidos pela legislação. Os tratamentos influenciaram significativamente apenas o pH, acidez e a contagem de microrganismos mesófilos.

Com relação aos valores de pH apenas a bebida 1 apresentou pH significativamente maior que as demais amostras, provavelmente devido a este produto não sofrer adição de CO<sub>2</sub> e nem da cultura probiótica que causariam a diminuição do pH. O pH das bebidas 3 e 4, adicionadas de CO<sub>2</sub> e a bebida 2 sem CO<sub>2</sub> e com *L. casei* foi significativamente menor e a acidez maior quando comparadas com a bebida 1 sem CO<sub>2</sub>. Este resultado está de acordo com o esperado já que a adição de dióxido de carbono ocasiona redução no pH e aumento

de acidez pela dissolução do gás e formação do ácido carbônico (HOTCHKISS; WERNER; LEE, 2006).

Ravindra et al. (2011) desenvolveram uma bebida flavorizada e carbonatada a base de leite. As bebidas carbonatadas e não carbonatadas foram avaliadas quanto às características físico-químicas ao longo de 30 dias de armazenamento refrigerado. Na bebida carbonatada, foi observado o decréscimo de pH e aumento dos valores de acidez durante o armazenamento, provavelmente devido a dissolução do gás resultando na formação de ácido carbônico. Este fator pode ter contribuído para a maior acidez da bebida em relação ao controle. O aumento da acidez provocado pelo CO<sub>2</sub>, entretanto, não afetou a estabilidade das amostras carbonatadas.

A contagem de psicotróficos não diferiu entre as amostras no primeiro dia de análise e apresentou-se abaixo do índice de normalidade para todas as bebidas. A adição de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) ao leite pasteurizado pode contribuir para a otimização do processo de fabricação e conservação de queijos, não só pelo abaixamento do pH do leite no início do processo de fabricação, como também por controlar a multiplicação de microrganismos psicotróficos (LOSS; HOTCHKISS, 2000).

Vianna e Gigante (2010), mostraram que a adição de CO<sub>2</sub> teve um efeito mais importante do que a temperatura de armazenamento no controle do desenvolvimento de psicotróficos em leite cru refrigerado.

A contagem de mesófilos foi significativamente maior nas bebidas 2 e 4 que sofreram a adição do *L. casei*. Esta diferença pode estar relacionada à presença do *L. casei* nas bebidas probióticas, o que aumenta a contagem de microrganismos totais nas bebidas que sofreram sua adição. Isso ocorre porque a temperatura utilizada para contagem total de mesófilos também inclui a contagem de probióticos. Adicionalmente, a ocorrência de mesófilos observada na formulação 1 e 3 podem ser atribuídos à contaminação durante os processos de produção e carbonatação das bebidas.

A contagem de microrganismos probióticos nas bebidas que sofreram sua adição foi da ordem de 10<sup>7</sup> UFC/mL para ambos os produtos. Após 1 dia de armazenamento, o efeito inibitório do CO<sub>2</sub> não influenciou a viabilidade do probiótico. A ANVISA afirma que para um alimento ser considerado probiótico e atuar no equilíbrio da microbiota intestinal, este deve apresentar quantidade mínima

viável na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  células viáveis por porção do produto (BRASIL, 2008). Portanto, o produto está adequado à exigência da legislação. Na literatura, diversos autores também recomendam que produtos com contagem de probióticos entre  $10^6$  e  $10^7$  UFC/ g ou mL podem ser considerados probióticos e apresentar o efeito benéfico à saúde (GRANATO et al., 2010; SAAD, 2006).

## 5.2 EFEITO DO TEMPO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DAS BEBIDAS

A Tabela 2 apresenta o efeito dos tratamentos, do tempo de armazenamento e da interação destes fatores sobre o pH, acidez e contagem de mesófilos, psicotróficos e *L. casei*.

Tabela 2 - Resultado da avaliação estatística para pH, acidez, contagem de mesófilos, psicotróficos e *L. casei* (n=3)

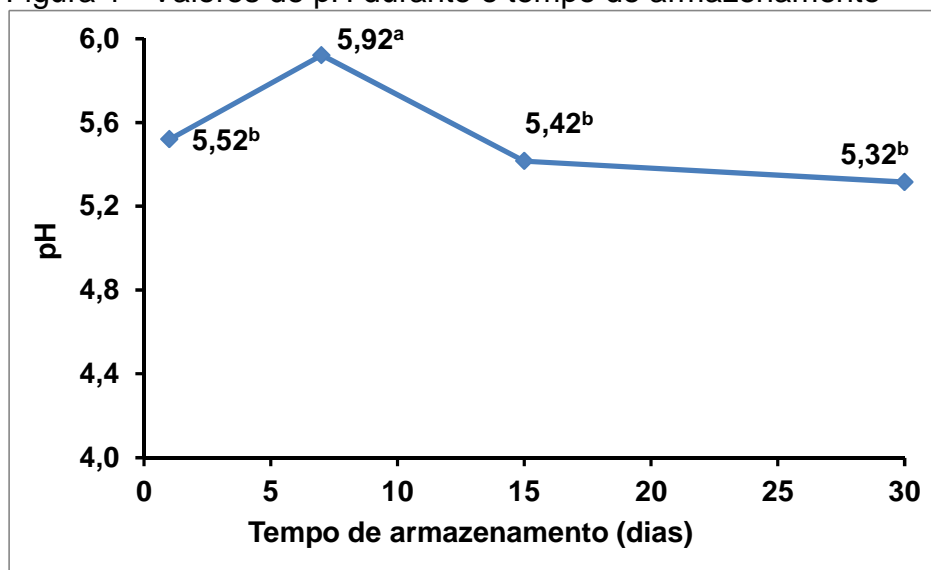
	Valor de $p^*$				
	pH	Acidez	Mesófilos	Psicotróficos	<i>L. casei</i>
Tratamento	0,1385	< 0,0001	0,4878	< 0,0001	0,3222
Tempo de armazenamento	< 0,0001	0,0852	0,3297	< 0,0001	0,1234
Tratamento x tempo	0,9734	0,0221	< 0,0001	< 0,0001	0,7868

\*  $p < 0,05$

Fonte:Da autora.

O pH foi influenciado apenas pelo tempo de armazenamento (Tabela 2). Independente do tratamento realizado o pH das bebidas sofreu um aumento após 7 dias de armazenamento e diminuiu significativamente após 15 dias, tornando-se constante até o final do período de análise (Figura 1). O aumento do pH no 7º dia, provavelmente está relacionado a algum erro de análise ou calibração do equipamento, pois esta variação pontual não é esperada já que a tendência é que o pH das bebidas lácteas em geral se mantenha ou diminua com o tempo de armazenamento.

Figura 1 - Valores de pH durante o tempo de armazenamento

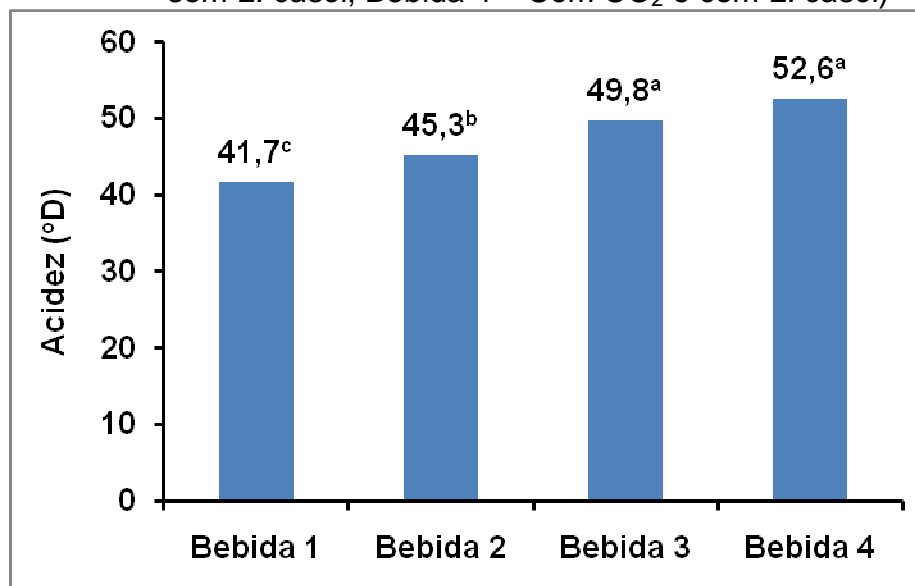


Fonte: Da autora.

A acidez das bebidas foi influenciada pelo tratamento e pela interação tratamento x tempo de armazenamento, o que indica que o comportamento da acidez foi diferente entre todas as bebidas ao longo do tempo de armazenamento independente do tratamento recebido. (Tabela 2). Foi observada uma maior acidez nas bebidas que receberam adição do CO<sub>2</sub> (Figura 2), o que é esperado, já que sua adição eleva a acidez devido à formação de ácido carbônico no meio (HOTCHKISS; WERNER; LEE, 2006).

Paula (2005) desenvolveu uma bebida pasteurizada carbonatada à base de soro de leite obtido da fabricação de queijo Minas padrão ou mussarela, estável à temperatura ambiente, pelo menos por três meses, sem receber tratamentos térmicos extremos como a esterilização. Para avaliar a estabilidade do produto, durante os 90 dias de estocagem à temperatura ambiente, foram realizadas periodicamente análises sensoriais, microbiológicas e físico-químicas, seguindo-se inspeção visual para verificar sinais de alteração das embalagens ou modificações do produto. Os resultados mostraram que o produto desenvolvido teve boa aceitação e revelaram ainda ser este um produto estável durante a avaliação.

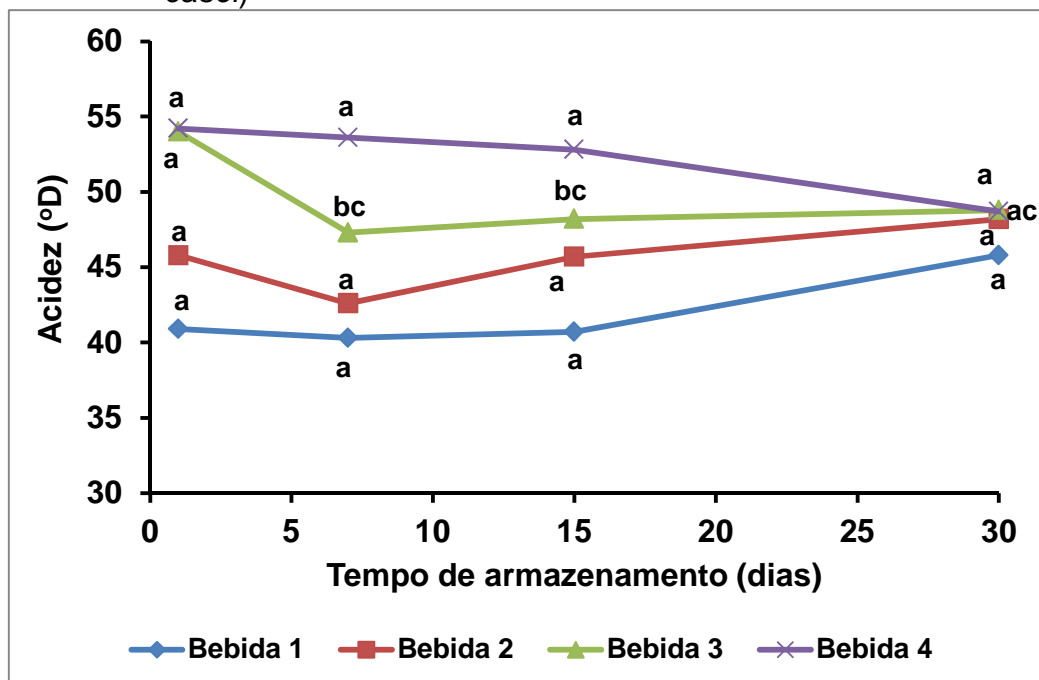
Figura 2 - Valores médios de acidez das bebidas lácteas submetidas aos diferentes tratamentos (Bebida 1 – Sem CO<sub>2</sub> e sem *L. casei*; Bebida 2 – Sem CO<sub>2</sub> e com *L. casei*; Bebida 3 – Com CO<sub>2</sub> e sem *L. casei*; Bebida 4 – Com CO<sub>2</sub> e com *L. casei*)



Fonte: Da autora.

A Figura 3 apresenta os valores de acidez das bebidas durante os 30 dias de armazenamento refrigerado. Com exceção da bebida 3 (com CO<sub>2</sub> e sem *L. casei*), a acidez foi estável para todas as bebidas durante os 30 dias de análise. A acidez da bebida 3 diminuiu após 7 dias de armazenamento e manteve-se constante até o final do experimento. Esta diminuição da acidez pode ser explicada pela perda de CO<sub>2</sub> da bebida durante este período provocada por falhas no fechamento hermético da garrafa escolhida aleatoriamente para análise neste dia. Observa-se que na bebida 4, que também sofreu adição de CO<sub>2</sub> este fato não aconteceu, mostrando a eficiência do fechamento hermético das garrafas.

Figura 3 - Valores de acidez das bebidas lácteas ao longo do tempo (Bebida 1 – Sem CO<sub>2</sub> e sem *L. casei*; Bebida 2 – Sem CO<sub>2</sub> e com *L. casei*; Bebida 3 – Com CO<sub>2</sub> e sem *L. casei*; Bebida 4 – Com CO<sub>2</sub> e com *L. casei*)



Fonte: Da autora.

A contagem de microrganismos mesófilos foi influenciada somente pela interação tratamento x tempo de armazenamento (Tabela 2). Isso quer dizer que o comportamento dos mesófilos entre as amostras foi diferente ao longo do tempo.

Observando a Figura 4, nota-se que existe uma diferença de comportamento entre as amostras com probiótico e sem probiótico e o comportamento destas, independente da adição de CO<sub>2</sub>, é semelhante.

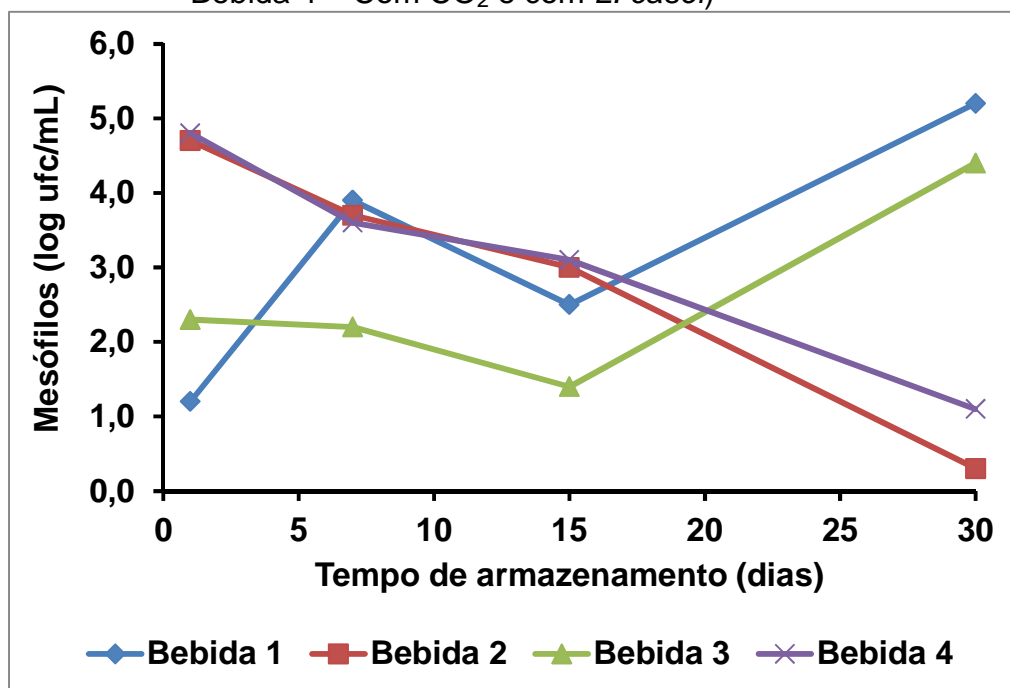
As amostras com o *L. casei* apresentaram uma contagem inicial de mesófilos maior e uma diminuição durante os 30 dias, enquanto as bebidas sem o probiótico evidenciaram uma contagem de mesófilos menor no início do armazenamento e apresentaram aumento ao longo do tempo. Esse aumento na contagem de mesófilos das bebidas sem o *L. casei* pode estar relacionado à deterioração da bebida, que após 30 dias de armazenamento apresentou-se visualmente deteriorada, inclusive com a formação de gel, o que dificultou as análises neste ponto.

Mesmo a bebida 3 sem *L. casei*, mas com adição de CO<sub>2</sub>, teve

aumento de mesófilos, concordando com o estudo de Ravindra et al. (2011) que desenvolveram uma bebida pasteurizada a base de leite com dissolução de CO<sub>2</sub> e avaliaram as mudanças microbiológicas das amostras ao longo de 30 dias de estocagem refrigerada. A carbonatação das bebidas inibiu o crescimento apenas dos microrganismos psicotróficos e não dos microrganismos mesófilos (contagem total em placas).

Nas amostras com o *L. casei* (bebidas 2 e 4), a diminuição da contagem de mesófilos poderia ser explicada pela competição entre o probiótico e os mesófilos, já que algumas culturas probióticas podem apresentar efeito inibidor (SCHWENNINGER et al., 2005) e também porque os probióticos são capazes de produzir metabólitos como ácido, acético, ácido láctico e bacteriocinas, exercendo efeito antagônico na população de patógenos e contaminantes nos alimentos (SAARELA et al., 2000).

Figura 4 - Populações de microrganismos mesófilos durante o tempo de armazenamento. (Bebida 1 – Sem CO<sub>2</sub> e sem *L. casei*; Bebida 2 – Sem CO<sub>2</sub> e com *L. casei*; Bebida 3 – Com CO<sub>2</sub> e sem *L. casei*; Bebida 4 – Com CO<sub>2</sub> e com *L. casei*)



Fonte: Da autora.

A contagem de psicotróficos foi influenciada pelo tratamento, pelo tempo de armazenamento e pela interação entre esses dois fatores (Tabela 2), mostrando que o comportamento destes microrganismos foi diferente entre as

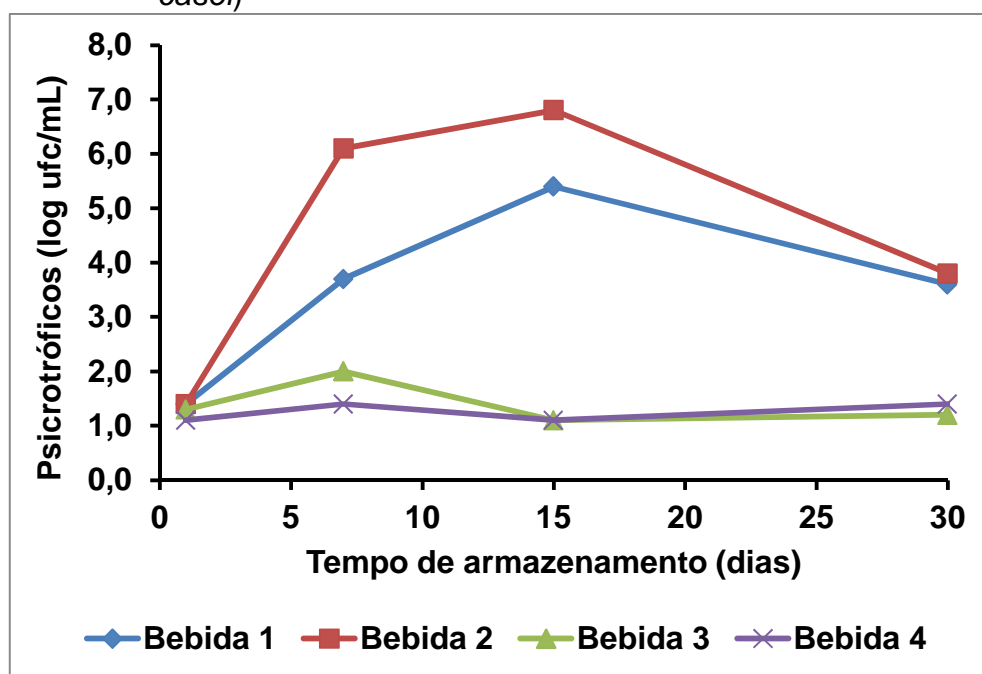
amostras durante os 30 dias de armazenamento refrigerado.

Observa-se na Figura 5 que a contagem de psicotróficos foi maior nas bebidas sem adição de CO<sub>2</sub> durante todo o tempo de armazenamento. Nas bebidas 1 e 2 a contagem de psicotróficos aumentou até o 15º dia e depois diminuiu no 30º dia de armazenamento, enquanto nas amostras 3 e 4 esta contagem foi menor e permaneceu constante durante todo o período (variando entre 10 e 100 UFC/mL). Estes dados também mostram que a adição do probiótico não influenciou a contagem de psicotróficos. O CO<sub>2</sub> é solúvel tanto em meio aquoso como lipídico e é o principal responsável pelo efeito bacteriostático, especialmente sobre bactérias Gram negativas, como os psicotróficos (SARANTÓPOULOS; SOLER, 1994). A ação do CO<sub>2</sub> sobre a microbiota, tem sido atribuída a redução de pH, devido a dissolução de CO<sub>2</sub> no meio, as alterações da permeabilidade celular bacteriana e a inibição enzimática, resultando no prolongamento da fase de adaptação e no aumento do tempo de geração dos microrganismos, o que reduz a taxa de crescimento, além de uma mudança na microbiota, levando à predominância de microrganismos de menor potencial de deterioração (SARANTÓPOULOS; SOLER, 1994).

Ma, Barbano e Santos (2003) avaliaram o efeito da adição de CO<sub>2</sub> na proteólise e lipólise do leite cru refrigerado a 4°C. A adição de CO<sub>2</sub> retardou a multiplicação de bactérias no leite cru durante os 21 dias de armazenamento a 4°C. Do ponto de vista da contagem microbiana, a adição de CO<sub>2</sub> dobrou o tempo de armazenamento do leite cru a 4°C. A adição de CO<sub>2</sub> no leite cru diminuiu a proteólise por pelo menos dois mecanismos: redução das proteases devido à reduzida multiplicação microbiana e a possível redução na atividade da plasmina em função do pH mais baixo do leite. O efeito do CO<sub>2</sub> na redução da lipólise foi atribuído a uma reduzida multiplicação microbiana.



Figura 5 - Populações de microrganismos psicotróficos (log UFC/mL) durante o tempo de armazenamento. (Bebida 1 – Sem CO<sub>2</sub> e sem *L. casei*; Bebida 2 – Sem CO<sub>2</sub> e com *L. casei*; Bebida 3 – Com CO<sub>2</sub> e sem *L. casei*; Bebida 4 – Com CO<sub>2</sub> e com *L. casei*)



Fonte: Da autora.

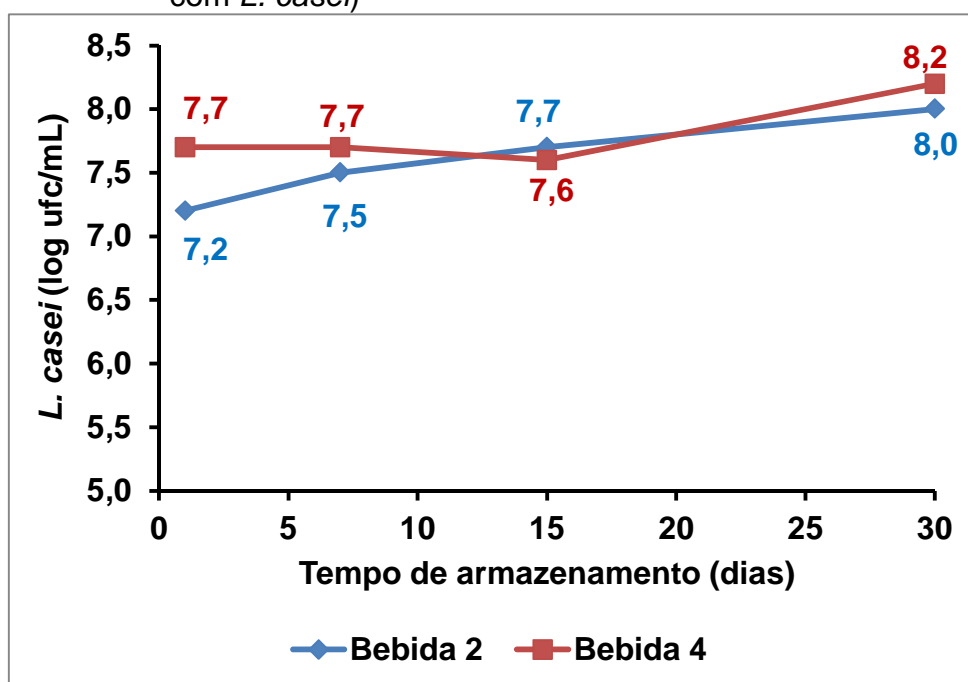
A contagem de *L. casei* demonstrada na Figura 6, não foi influenciada por nenhum dos fatores avaliados, mostrando que o microrganismo manteve-se na bebida tanto na presença quanto na ausência de CO<sub>2</sub> durante os 30 dias de armazenamento refrigerado.

Após 30 dias de armazenamento a contagem de *L. casei* foi de  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL para a bebida sem CO<sub>2</sub> e  $1,6 \times 10^8$  UFC/mL para a bebida com CO<sub>2</sub> e manteve-se na ordem de  $10^7$  UFC/mL durante todo o período de armazenamento, podendo assim, ser considerada probiótica, de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2008).

Zacarchenco e Massaguer-Roig (2004) constataram que populações de *Lactobacillus acidophilus* apresentaram redução de um ciclo logarítmico até 21 dias de estocagem em leites fermentados.

Espie e Madden (1997) constataram que não houve inibição do gênero *Lactobacillus* spp. pela adição de CO<sub>2</sub> em leite cru refrigerado, mas Gueimonde et al. (2003) constataram que houve aumento de sua viabilidade durante a estocagem refrigerada do iogurte processado a partir do leite carbonatado.

Figura 6 - População de *L. casei* (Log UFC/mL) durante o armazenamento. (Bebida 2 – Sem CO<sub>2</sub> e com *L. casei*; Bebida 4 – Com CO<sub>2</sub> e com *L. casei*)



Fonte: Da autora.

### 5.3 AVALIAÇÃO SENSORIAL

A Tabela 3 apresenta as notas médias atribuídas pelos provadores na avaliação sensorial das bebidas lácteas.

Tabela 3 - Notas médias da avaliação sensorial das amostras sob diferentes tratamentos

Atributos	Notas médias				Valor de <i>p</i>
	Bebida 1	Bebida 2	Bebida 3	Bebida 4	
Aroma	7,80 <sup>a</sup>	7,27 <sup>b</sup>	7,24 <sup>b</sup>	7,08 <sup>c</sup>	0,0051
Sabor	7,22 <sup>a</sup>	6,98 <sup>a</sup>	6,90 <sup>a</sup>	6,98 <sup>a</sup>	0,5307
Impressão global	7,14 <sup>a</sup>	6,88 <sup>a</sup>	6,94 <sup>a</sup>	7,02 <sup>a</sup>	0,5444

(Bebida 1 – Sem CO<sub>2</sub> e sem *L. casei*; Bebida 2 – Sem CO<sub>2</sub> e com *L. casei*; Bebida 3 – Com CO<sub>2</sub> e sem *L. casei*; Bebida 4 – Com CO<sub>2</sub> e com *L. casei*)

Fonte: Da autora.

Na análise sensorial observa-se que todas as amostras tiveram uma boa aceitação em relação a todos os atributos avaliados, apenas o aroma apresentou diferença quanto aos tratamentos no nível de significância avaliado. A bebida sem adição de CO<sub>2</sub> e sem *L. casei* apresentou maior nota quanto ao atributo

aroma em relação às demais. A adição de CO<sub>2</sub> e do *L. casei* pode ter ocasionado alguma influência no aroma das bebidas, entretanto a realização da análise sensorial por provadores não treinados pode gerar esse tipo de diferença. Além disso, os provadores não deixaram comentários que pudessem identificar a causa desta diferença nas fichas de avaliação. Mesmo apresentando diferença significativa no aroma, todas as notas obtidas estiveram acima de 7, o que significa uma boa aceitação por parte dos provadores.

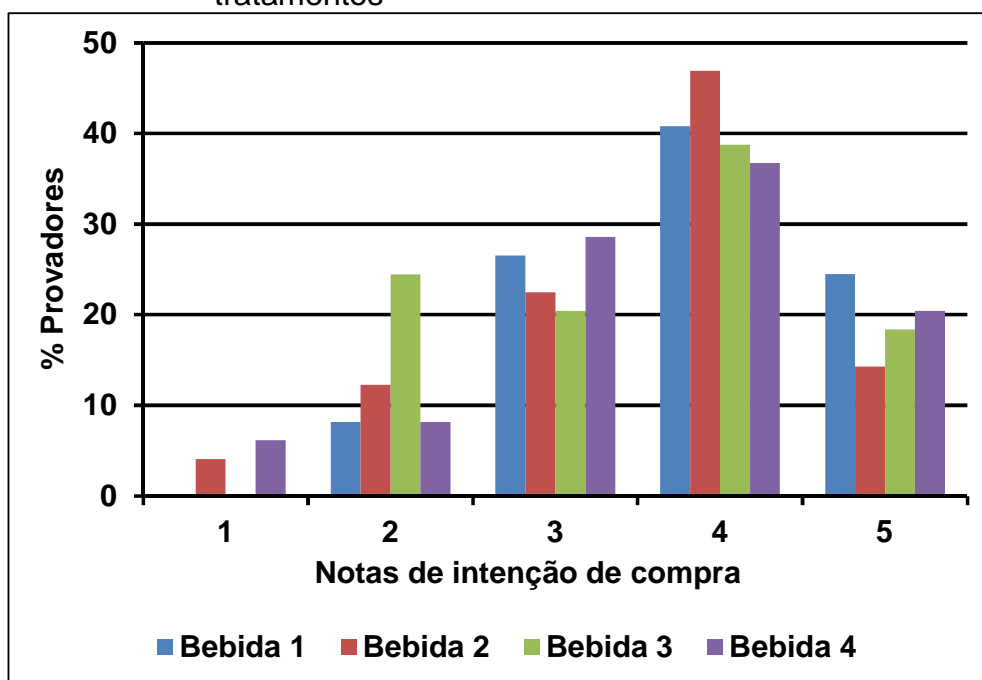
Todos os atributos avaliados tiveram em média nota 7,0 o que corresponde na escala hedônica a “gostei moderadamente”. Estudos mostram que a aceitação de produtos carbonatados é alta e que a carbonatação não interfere na avaliação sensorial. Karagül-Yüceer et al. (1999) também não encontraram diferenças entre sabor, textura e aroma de iogurtes carbonatados quando comparados ao tradicional. Choi e Kosikowski (1985) reportam que a carbonatação de iogurtes melhora as qualidades sensoriais. Estes autores fizeram uma avaliação sensorial com provadores que gostavam de iogurte comercial e refrigerante e provadores que não gostavam de algum ou de ambos. Os resultados para ambos os grupos foi que o iogurte carbonatado teve uma maior aceitação em relação a amostra comercial.

Karagül-Yüceer et al. (1999) produziram um iogurte com baixo teor de gordura, com os sabores de morango e de limão, adicionando culturas probióticas (*Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum*). O dióxido de carbono foi incorporado ao iogurte já refrigerado e aromatizado e não alterou as características sensoriais, quando comparado ao controle.

Chio e Kosikowski (1985) produziram um iogurte aromatizado e carbonatado. O CO<sub>2</sub> retardou a pós-acidificação do produto durante a estocagem refrigerada a 4°C, sendo estável durante 4 meses. O iogurte não carbonatado (controle) não obteve aceitabilidade sensorial após 30 dias.

A Figura 7 representa a intenção de compra das bebidas lácteas conforme a avaliação dos provadores. As bebidas sem adição de CO<sub>2</sub> (1 e 2) apresentaram mais de 60% de aprovação, e as bebidas carbonatadas (3 e 4) apresentaram valores acima de 57% de intenção de compra (provavelmente comprariam e certamente comprariam). Os dados confirmam a boa aceitação sensorial das bebidas, e o seu potencial de produção em escala industrial e comercialização.

Figura 7 - Intenção de compra das bebidas lácteas com diferentes tratamentos



(Bebida 1 – Sem CO<sub>2</sub> e sem *L. casei*; Bebida 2 – Sem CO<sub>2</sub> e com *L. casei*; Bebida 3 – Com CO<sub>2</sub> e sem *L. casei*; Bebida 4 – Com CO<sub>2</sub> e com *L. casei*). Notas de intenção de compra variam de 1 = certamente não compraria a 5 = certamente compraria  
Fonte: Da autora.

## 6 CONCLUSÃO

As características físico-químicas das bebidas não foram influenciadas pelos diferentes tratamentos, com exceção do pH e acidez das bebidas carbonatadas.

A adição de CO<sub>2</sub> às bebidas não apresentou um efeito claro sobre o comportamento dos microrganismos mesófilos durante o tempo de armazenamento, entretanto, esta contagem diminuiu ao longo do tempo nas bebidas adicionadas do probiótico. A contagem de psicrotrofos foi maior nas bebidas sem adição de CO<sub>2</sub>, evidenciando a eficiência de inibição do CO<sub>2</sub> sobre estes microrganismos.

A contagem de *L. casei* nas bebidas que sofreram sua adição permaneceu constante durante os 30 dias de armazenamento refrigerado e na ordem de 10<sup>7</sup> a 10<sup>8</sup> ufc/mL, podendo-se considerar assim as bebidas como probióticas.

Independente dos tratamentos todas as bebidas apresentaram boa aceitação sensorial e alta intenção de compra por parte dos provadores.

A partir dos dados obtidos neste estudo pode-se concluir que produção de uma bebida láctea carbonatada e adicionada de probiótico é viável em escala industrial, principalmente por se tratar de um produto inovador e sem semelhantes no mercado brasileiro.

## REFERÊNCIAS

- AGHEYISI, R. The probiotics market: Ingredients, supplements, foods. **BCC Research. Food and Beverage**, 2008. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/report/FOD035B.html>>. Acesso em: 20 maio 2013.
- APHA American Public Health Association. **Standard Methods for the examination of dairy products**. Washington, p. 546, 1992.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Oficial methods of analysis of AOAC international**. Washington, v. 1-2, 1995.
- BASSI, L. G. et al. Evaluation of physicochemical, microbiological and sensorial characteristics of fermented milk beverages with buttermilk addition. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 64, p. 1-5, 2011.
- BRASIL, 2008. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA.2008. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em: 22 jun. 2013.
- BRASIL, 2001. **Resolução RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001**. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Regulamento Técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <<http://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelinck.php?numlink=1-9-34-2001-01-02-12>>. Acesso em: 8 jun. 2013.
- BRASIL, 1999. **Resolução nº 17, de 30 de abril de 1999**. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. Brasília, 1999.
- BRASIL, 1981. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal, LANARA. **Métodos analíticos oficiais para controle de produto de origem animal e seus ingredientes**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1981.
- BRAZIL TRADE SHOWS. **Conteúdo online**. Disponível em: <[http://www.btsinforma.com.br/print\\_noticia.asp?cod\\_noticia=2333](http://www.btsinforma.com.br/print_noticia.asp?cod_noticia=2333)>. Acesso em: 16 jul. 2013.
- CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, London, v. 45, n. 1, p. 61-84, 2005.
- CHATTERTON, D. E. W. et al. Bioactivity of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin: technological implications for processing. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, n. 11, p. 1229-1240, 2006.
- CHOI, H. S.; KOSIKOWSKI, V. Sweetened plain and flavored carbonated yogurt

beverages. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, p. 613-619, 1985.

CRUZ, A. G.; FARIA, A. F. J.; VAN DENDER, A. G. F. Packaging system and probiotic dairy foods. **Food Research International**, Barking, v. 4, p. 951–956, 2007.

CRUZ, R. S.; SOARES, N. F. F. Efeito da adição de CO<sub>2</sub> sobre o crescimento microbiano em macarrão tipo massa fresca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 2, p.147-150, maio/ago. 2002.

DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. Influence of carbon dioxide on the growth of spoilage bacteria. **Food Science and Technology**, London, v. 33, n. 8, p. 531–537, 2000.

ESPIE, W. E.; MADDEN, R. H. The carbonation of chilled bulk milk. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 52, n. 5, p. 249-252, 1997.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. 34 p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport\_en.pdf>. Acesso em: 19 jun. 2013.

FORESTIER, C. et al. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. **Research Microbiology**, Amsterdam, v. 152, n. 2, p. 167-173, 2001.

GRANATO, D. et al. Probiotic dairy products as functional foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Malden, v. 9, n. 5, p. 455-470, 2010.

GUEIMONDE, M. et al. Quality of plain yoghurt made from refrigerated and CO<sub>2</sub>-treated Milk, Instituto de Productos Lacteos de Asturias (CSIC), Villaviciosa, Asturias, Spain, **Food Research International**, Barking, v. 36, p. 43–48, 2003.

GUGLIELMOTTI, D. et al. Spontaneous *Lactobacillus delbrueckii* phage-resistant mutants with acquired bile tolerance. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 3, p. 236-42, 2007.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W.C. ; PAULA, H. Proteínas do soro de leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, Campinas. v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.

HOTCHKISS, J.; WERNER, B. G; LEE, A. Adição EYC de dióxido de carbono para os produtos lácteos para melhorar a qualidade: uma revisão abrangente. **Revisões Abrangentes em Ciência dos Alimentos e Segurança Alimentar**, [S. l.], v. 5, p. 158-169, 2006.

JOUSSE, F. Modeling to improve the efficiency of product and process development. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, London, v. 7, p. 175-181, 2008.

KARAGÜL-YÜCEER, Y. et al. Carbonated yogurt - sensory properties and consumer acceptance. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 7, p.1394–1398, 1999.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 3, jul./ set. 2008.

LAM, D.; PETITFOUR, C. Carbonated dairy beverage and process for its manufacture. **French Patent Application**, França, v. 2, p. 789, 2000.

LEISTNER, L. Principles and applications of hurdle technology. In: GOULD, G. W. (Ed.). **New methods of food preservation**. New York: Aspen Publishers, 1995. p. 1-21.

LOW, P. P. L. et al. Enhancement of mucosal antibody responses by dietary whey protein concentrate. **Food and Agricultural Immunology**, Abingdon, v. 4, n. 13, p. 255-264, 2001.

LOSS, C. R.; HOTCHKISS, J. H. **Dairy processing**: the use of dissolved carbon dioxide to extend the shelf-life of dairy products. Boca Raton: CRC Press, 2000.

MA, Y.; BARBANO, D. M.; SANTOS, M. Effect of CO<sub>2</sub> addition to raw milk on proteolysis and Lipolysis at 4 °C. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 1616-1631, 2003.

MATSUBARA, S. Alimentos funcionais: uma tendência que abre perspectivas aos laticínios. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, v. 6, n. 34, p. 10-18, 2001.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 4. ed. Boca Raton: Taylor and Francis, 2006.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutraceuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3, p. 109-122, 2006.

OELSCHLAEGGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions: a review. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 300, n. 1, p. 57-62, 2010.

ÖZER, B. H.; KIRMACI, H. A. Functional milks and dairy beverages. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 63, n. 1, p. 1-15, 2010.

PAULA, J. C. J. **Elaboração e estabilidade de bebida carbonatada aromatizada à base de soro de leite**. 2005. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

PRADO, F. C. et al. Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**, Barking, v. 41, p. 111-123, 2008.

RAUD, C. Os alimentos funcionais: a nova fronteira da indústria alimentar análise das estratégias da danone e da nestlé no mercado brasileiro de iogurtes. **Revista de Sociologia Política**, Curitiba, v. 16, n. 31, p. 85-100, 2008.

RAVINDRA, M. R. et al. Extended shelf life flavoured dairy drink using dissolved carbon dioxide. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, 2011.



Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/m6213634u159uq67/fulltext.pdf>>. Acesso em: 26 jun. 2013.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, Italia, v. 34, p. 105-110, 2002.

RUAS-MADIEDO, P. et al. Influence of carbon dioxide addition to raw milk on microbial levels and some fat-soluble vitamin contents of raw and pasteurized milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 4, p. 1552-1555, 1998.

RUAS-MADIEDO, P. et al. Preservation of the microbiological and biochemical quality of raw milk by carbon dioxide addition: a pilot-scale study. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, p. 502–508, 1996.

SAAD, S. M. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 1, p. 42, 2006.

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

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Review**, Washington, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.

SANDERS, M. E.; KLAENHAMMER, T. R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 84, p. 319-331, 2001.

Brasil **Instrução Normativa nº 16 de 23 de agosto de 2005**. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea. Disponível em: <<http://www.defesaagropecuaria.sp.gov.br/www/legislacoes/popup.php?action=view&idleg=702>>. Acesso em: 22 jun. 2013.

SARANTÓPOULUS, C. I. G. L.; SOLER, R. M. **Embalagens com atmosfera modificada/controlada**. Campinas: Ital, 1994.

SCHWENNINGER, S. M. et al. Detection of antifungal properties in *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* SM20, SM29, and SM63 and molecular typing of the strains. **Journal of Food Protection**, United States, v. 68, n. 1, p. 111-119, 2005.

SCHWENNINGER, S. M. et al. Detection of antifungal properties in *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* SM20, SM29, and SM63 and molecular typing of the strains. **Journal of Food Protection**, United States, v. 68, n. 1, p. 111-119, 2005.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, Barking, v. 17, p. 1262-1277, 2007.

SHAIKH, S. Y. et al. Studies on development of a process for preparation of fermented carbonated whey beverage. **Journal of Food Science and Technology**, Maysore, v. 38, n. 5, p. 519-521. 2001.

SIVIERI, K.; OLIVEIRA, M. N. Avaliação da vida-de-prateleira de bebidas lácteas preparadas com “fat replaces” (litesse e dairy-lo). **Ciências e Tecnologia Alimentar**, Campinas, v. 22, p. 24-31, jan./abr. 2002.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da SBCTA**, Campinas, v. 37, n. 2, p. 127-135, 2003.

STANTON, C. et al. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. In: FARNWORTH, E. R. (Ed.). **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p. 27-58.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 393-400, jul./set. 2005.

TUOHY, K. M. et al. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today, Haywards Heath**, Kidlington, v. 8, n. 15, p. 692-700, 2003.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Dairy world markets and trade. **Circular Series**, 2011. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/dairy.pdf>>. Acesso em: 30 jan. 2012.

VARAVALLO, M. A.; THOMÉ, J. N.; TESHIMA, E. Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 83-104, jan./jun. 2008.

VÁSQUEZ, A. et al. DNA - based classification and sequence heterogeneities in the 16S RNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, n. 5, p. 430-441, 2005.

VIANNA, P. C. B.; GIGANTE, M. L. Qualidade microbiológica e físico química do leite cru refrigerado adicionado de dióxido de carbono. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juíz de Fora, v. 65, n. 375, p. 51:59, 2010.

WALZEM, R. L.; DILLARD C. J.; GERMAN, J. B. Whey components: Millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: What we know and what we may be overlooking. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, London, v. 42, n. 4, p. 353-375, 2002.

ZACARCHENCO, P. B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 674-679, out./dez. 2004.

## ANEXOS

## Anexo 1 - Modelo de ficha utilizada para avaliação sensorial

**AVALIAÇÃO SENSORIAL DE BEBIDA LÁCTEA SABOR MARACUJÁ**

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

e-mail: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

- 1) Avalie a amostra codificada e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou do AROMA, SABOR e IMPRESSÃO GLOBAL.

**AMOSTRA** \_\_\_\_\_

- 9 – gostei muitíssimo  
8 – gostei muito  
7 – gostei moderadamente  
6 – gostei ligeiramente  
5 – nem gostei/nem desgostei  
4 – desgostei ligeiramente  
3 – desgostei moderadamente  
2 – desgostei muito  
1 – desgostei muitíssimo

**AROMA** \_\_\_\_\_  
**SABOR** \_\_\_\_\_  
**IMPRESSÃO GLOBAL** \_\_\_\_\_

Comentários:

---

---

---

- 2) Se este produto estivesse à venda o/a Sr(a):

- \_\_\_ certamente compraria  
\_\_\_ provavelmente compraria  
\_\_\_ talvez comprasse/talvez não comprasse  
\_\_\_ provavelmente não compraria  
\_\_\_ certamente não compraria

Comentários:

---

---

---