

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

KLEBER MARCOS ZERBIELLI

**BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA COM CULTURA PROBIÓTICA  
ADICIONADA DE SEMENTE DE CHIA (*Salvia hispanica L.*)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LONDRINA

2014

KLEBER MARCOS ZERBIELLI

**BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA COM CULTURA PROBIÓTICA  
ADICIONADA DE SEMENTE DE CHIA (*Salvia hispanica L.*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTAL da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Campus Londrina, na linha de pesquisa Produtos de Origem Animal.

**Orientador:** Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho

**Co-orientadora:** Prof. Dra. Ivane B. Tonial

LONDRINA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

Z58b Zerbielli, Kleber Marcos  
Bebida láctea fermentada com cultura probiótica adicionada de semente  
de chia (*Salvia hispanica L*) / Kleber Marcos Zerbielli. - Londrina: [s.n.], 2014.  
57 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho  
Coorientadora: Prof. Dr. Ivane B. Tonial  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Londrina, 2014.  
Bibliografia: f. 49-55

1. Leite fermentado. 2. Probióticos. 3. Sementes oleaginosas. I. Coelho,  
Alexandre Rodrigo, orient. II. Tonial, Ivane B., coorient. III. Universidade  
Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em  
Tecnologia de Alimentos. V. Título.

CDD: 664

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Título da Dissertação Nº 17**

**“Bebida láctea fermentada com cultura probiótica  
adicionada de semente de chia (*Salvia hispanica L.*)”**

por

**Kleber Marcos Zerbielli**

Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos, pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – PPGTAL – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Câmpus Londrina, às 16:30 hs do dia 12 de novembro de 2014. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta por:

---

Dr. Alexandre Rodrigo Coelho  
UTFPR Câmpus Londrina  
Orientador

---

Dra. Kerley Braga P. Bento Cesari  
UNIOESTE  
Membro examinador titular

---

Dra. Fabiane Picinin de Castro  
UTFPR Câmpus Francisco Beltrão  
Membro examinador titular

Visto da coordenação:

---

Prof. Fabio A. Coró, Dra.  
(Coordenadora do PPGTAL)

Dedico este trabalho a meus filhos Julio Cesar e Rafaela e meus pais Angelo e Ise.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela força, proteção e inspiração durante esta jornada;

Ao prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho e profa. Dra. Ivane Benedetti Tonial, pela orientação e co-orientação;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTAL, pelos ensinamentos;

Aos laboratoristas da UTFPR Câmpus Francisco Beltrão;

Ao biólogo Carlos Eduardo Silva, pelas análises de ácidos graxos;

A direção do CEEP Assis Brasil;

A todos que de alguma forma me auxiliaram ou deram apoio.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Sementes da Chia.....	19
<b>Figura 2:</b> Dimensões da semente da Chia.....	19
<b>Figura 3:</b> Fluxograma de fabricação da bebida láctea.....	24
<b>Figura 4:</b> Fermentador utilizado na fabricação da bebida láctea fermentada.....	25
<b>Figura 5:</b> Bebida láctea fermentada com, formulação A, B e C respectivamente....	40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Características físico-químicas do soro usado para a elaboração da bebida láctea fermentada com chia.....	32
<b>Tabela 2:</b> Características físico-químicas do leite UHT usado para a elaboração da bebida láctea fermentada com chia.....	32
<b>Tabela 3:</b> Características físico-químicas da semente de chia usada para a elaboração da bebida láctea.....	34
<b>Tabela 4:</b> Características físico-químicas da bebida láctea fermentada adicionada de diferentes concentrações de chia, no produto recém preparado e após 7 e 14 dias de estocagem a 4°C.....	36
<b>Tabela 5:</b> Avaliação da qualidade microbiológica da bebida láctea fermentada com adição de diferentes concentrações de chia recém-preparada.....	39
<b>Tabela 6:</b> Avaliação sensorial da bebida láctea fermentada adicionada de três concentrações diferentes de chia, em relação ao tempo de estocagem a 4°C.....	40
<b>Tabela 7:</b> Teste de ordenação de preferência nos tempos 0, 7 e 14 dias – formulação mais aceita.....	42
<b>Tabela 8:</b> Teste de ordenação de preferência nos tempos 0, 7 e 14 dias – formulação mais rejeitada.....	42
<b>Tabela 9:</b> Teores de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos na formulação padrão e na bebida láctea com 3% de chia no tempo 0 nas três repetições .....	43
<b>Tabela 10:</b> Contagem de micro-organismos probióticos da bebida láctea fermentada durante período de estocagem a 4°C.....	46



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	10
2 OBJETIVOS .....	11
2.1 Objetivo geral .....	11
2.2 Objetivos específicos .....	11
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	12
3.1 Soro lácteo .....	12
3.2 Bebida láctea fermentada .....	14
3.3 Alimentos funcionais .....	15
3.4 Probióticos .....	16
3.4.1 <i>Lactobacillus</i> e <i>Bifidobacterium</i> .....	17
3.4.1.1 <i>Bifidobacterium</i> .....	17
3.4.1.2 <i>Lactobacillus</i> .....	18
3.5 Chia ( <i>Salvia hispanica</i> L) .....	18
3.6 Ácidos graxos Ômega-3 e Ômega-6 (n-3 e n-6) .....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	23
4.1 Formulação .....	23
4.2 Avaliação das condições higiênico-sanitárias da fabricação da bebida .....	25
4.2.1 Preparo das amostras .....	26
4.2.2 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais .....	26
4.2.3 Determinação do NMP de coliformes a 45°C ou coliformes termotolerantes ....	26
4.2.4 Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. ....	27
4.3 Avaliação química e físico-química .....	27
4.3.1 Determinação do pH .....	27
4.3.2 Viscosidade aparente .....	28
4.3.3 Proteínas .....	28
4.3.4 Lipídeos .....	28
4.3.5 Fibra crua .....	29
4.3.6 Acidez titulável .....	29

4.3.7 Umidade .....	29
4.3.8 Cinzas .....	29
4.4 Avaliação sensorial .....	29
4.5 Contagem de micro-organismos probióticos .....	30
4.5.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	31
4.5.2 <i>Bifidobacterium</i> .....	31
4.6 Análise estatística.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1 Caracterização da matéria-prima e ingredientes .....	32
5.2 Caracterização físico-química da bebida látea com e sem chia .....	36
5.3 Avaliação das condições higiênico-sanitárias da fabricação da bebida.....	39
5.4 Análise sensorial.....	40
5.5 Repetição da formulação B – contagem de micro-organismos probióticos e pós-acidificação .....	43
5.5.1 Caracterização físico-química.....	43
5.5.2 Pós-acidificação durante estocagem refrigerada por 14 dias .....	44
4.5.3 Contagem de micro-organismos probióticos .....	46
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	48
REFERÊNCIAS .....	49
Anexo A: Parecer consubstanciado .....	56
Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	59

## RESUMO

ZERBIELLI, K. M. **Bebida láctea fermentada com cultura probiótica adicionada de chia (*Salvia hispanica L.*)**. 2014. Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Francisco Beltrão, PR, 2014.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma bebida láctea fermentada preparada com 60% de leite, 32% de soro lácteo e 8% de açúcar, utilizando micro-organismos probióticos. Foram desenvolvidas 3 formulações, com 1% (A), 3% (B) e 5% de semente de chia (*Salvia hispanica L.*). Foram realizadas análises físico-químicas na formulação padrão e nas formulações A, B e C durante 0, 7 e 14 dias; análise sensorial nas formulações A, B, e C nos tempos 0, 7 e 14 dias e avaliação microbiológica. O teor de umidade nas 3 formulações apresentou diferença significativa aos 0 e 7 dias de estocagem ( $p < 0,05$ ). Os teores de cinzas, proteínas, lipídeos e a viscosidade da bebida aumentaram significativamente à medida que se aumentou a proporção de chia na bebida. Foi observada uma redução gradativa do pH e aumento da acidez titulável em função do tempo de estocagem da bebida. A bebida láctea obteve boa aceitação sensorial, mas foi observada uma diminuição nas notas da escala hedônica e intenção de consumo durante o período de estocagem. A contagem de bactérias probióticas teve redução de aproximadamente 1 ciclo logarítmico por semana. A formulação preferida no teste de ordenação de preferência foi a formulação A.

**Palavras-chave:** Bebida láctea fermentada. Chia. Probióticos. Alimentos funcionais.

## ABSTRACT

ZERBIELLI, K. M. **Dairy beverage fermented by probiotic micro-organisms, with added chia seed (*Salvia hispanica* L.)**. 2014. Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Francisco Beltrão, PR, 2014.

The aim of this study was to develop a fermented dairy beverage made with 60% milk, 32% whey and 8% sugar, using probiotic microorganisms. Three formulations, with 1% (A), 3% (B) and 5% chia seed (*Salvia hispanica* L.) have been developed. Physico-chemical analyzes on standard formulation and the formulations A, B and C for 0, 7 and 14 days were made; sensory analysis in formulations A, B, and C for times 0, 7 and 14 days and microbiological evaluation. The moisture content of the three formulations showed a significant difference at 0 and 7 days of storage ( $p < 0.05$ ). Contents of ash, protein, lipids and viscosity increased significantly as it increased the proportion of chia. A gradual reduction of pH and increase in acidity due to the storage time of the beverage was observed. The product has obtained good acceptability, but a decrease was observed in the global acceptability and intention of consumption during the storage period. The probiotic bacteria count was reduced by about 1 log cycle per week. The preferred formulation of the ranking preference test was the formulation A.

**Keywords:** Fermented dairy beverage. Chia. Probiotics. Functional foods.

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente a busca por produtos saudáveis, que auxiliem na prevenção e combate de doenças vem sendo uma preocupação constante de grande parcela da população. Este assunto é constantemente abordado pela mídia que não cansa de elencar os benefícios de uma alimentação saudável, remetendo aos alimentos ditos funcionais, lembrando Hipócrates, que cerca de 400 a.C. postulou: “que teu alimento seja teu remédio”. Para Muller (2001), propriedade funcional é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente, ou não nutriente, tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção, e outras funções normais do organismo humano.

Segundo Funke (2014) em 2013 foram registrados 91 produtos funcionais junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), contra os 178 registrados entre 2011 e 2012, chegando a 734. Dados da Euromonitor indicam que o país movimenta US\$ 10 bilhões com as vendas do setor, cujo crescimento até 2017 deve alcançar 19%. Estes dados reforçam a ideia de que tais produtos sejam valorizados pela indústria de alimentos, desenvolvendo produtos que atendam às demandas da população. Neste contexto, destacam-se as bebidas lácteas probióticas.

A fabricação de bebida láctea fermentada é uma forma de aproveitamento do soro obtido na fabricação de queijos, tornando o uso deste subproduto uma importante forma de agregação de valor na cadeia de produção de derivados lácteos. A utilização de soro de queijo na elaboração de bebidas lácteas constitui uma forma racional de aproveitamento além de apresentar excelente valor nutritivo e fornecer alta qualidade proteica com um baixo teor de gordura (ALMEIDA, BONASSI e ROÇA, 2001). A adição de probióticos é uma maneira de agregar valor às bebidas lácteas, bem como de se obter um produto diferenciado.

Além disso, é possível melhorar as características sensoriais e funcionais do produto por meio da adição de outros ingredientes, além de micro-organismos probióticos. Neste contexto, o trabalho tem como proposta adicionar semente de chia à bebida láctea fermentada probiótica, conferindo suas características funcionais à bebida. Para Muñoz et al. (2011) a Chia é uma fonte potencial de nutrientes para a indústria de alimentos, sendo sua produção global crescente por suas características. Atualmente tem-se observado uma crescente discussão sobre os

benefícios desta planta para a saúde humana e potenciais efeitos benéficos em dietas de restrição calórica, principalmente pelo fato da semente de chia ser rica em ácido alfa-linolênico, da série dos ômega-3, que exercem ação anti-inflamatória, previnem o desenvolvimento de tumores, melhoram a função cardíaca, dentre outros benefícios (BARBOSA et al., 2007).

Tendo em vista o exposto, justifica-se este trabalho por somar as propriedades funcionais da chia e dos probióticos, para o desenvolvimento de um produto inovador, a base de soro de leite (que é um subproduto da indústria do processamento do leite), que seja fonte de ácidos graxos Ômega-3 e de micro-organismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium*.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver uma bebida láctea fermentada com cultura probiótica contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* adicionada de semente de chia (*Salvia hispanica* L).

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a qualidade microbiológica no produto recém preparado;
- Avaliar a qualidade físico-química do produto recém preparado, após 7 e 14 dias de estocagem;
- Determinar a quantidade de micro-organismos probióticos no produto refrigerado após 5, 12 e 19 dias de estocagem refrigerada;
- Avaliar a aceitação do produto com diferentes concentrações de semente de chia após 0, 7 e 14 dias de estocagem.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Soro lácteo

O soro de leite é um subproduto da indústria do queijo e da caseína, possui alto valor funcional e nutritivo e quando considerado resíduo líquido industrial e despejado junto com os demais resíduos líquidos das indústrias de laticínios pode significar a duplicação do sistema de tratamento de efluentes, pois possui DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) entre 25.000 e 80.000 mg/L (GIROTO e PAWLOSKEY, 2001). No Brasil uma quantidade substancial de soro de leite é descartada na forma de resíduo industrial, causando um grave problema ambiental. A ABIQ (Associação Brasileira das Indústrias de Queijo) estima que no Brasil tenha sido produzido cerca de um milhão de toneladas de queijos em 2013, e considerando-se que para quilo de queijo sejam gerados aproximadamente 9 litros de soro, tem-se uma projeção de aproximadamente 9 bilhões de litros de soro gerados anualmente.

Pode-se utilizar esta fonte de matéria-prima e nutrientes de diversas maneiras, como ingrediente para outros produtos como ricota, soro em pó, bebidas lácteas, dentre outros. Além das formas tradicionais de uso do soro, tem-se procurado novas alternativas. Como exemplo, Silva et al. (2013) substituíram 25 e 50% do leite por soro na fabricação de doce de leite e observaram redução no tempo de concentração, porém com diminuição do rendimento. Andrade (2013) utilizou soro lácteo no processo e encapsulamento e secagem de própolis.

O soro possui cerca da metade do extrato seco do leite, que é composto por lactose, proteínas e sais. Do volume de leite destinado à fabricação de queijos, entre 75 e 85% resulta em soro (ZADOW, 1997). Possui 93 a 94% de água, 0,3 a 0,5 % de gordura; 0,8 a 1,0% de proteínas, 4,5 a 5,0% de lactose; 0,5 a 0,7% de sais minerais (MADRID et al., 1995, *apud* TRINDADE, 2002). Teixeira e Fonseca (2008) comparando a composição de soros obtidos na elaboração de mussarela e queijo minas padrão observaram diferenças em sua composição. Como resultado médio para mussarela obtiveram -0,565 °H para crioscopia; 6,19 para pH; 13,16 °Dornic para acidez; 6,33% para sólidos totais; 93,67% para umidade; 0,77% para gordura; 0,84% para proteína; 4,42% para lactose; 0,47% para cinzas; 0,18% para cloretos e 1,0253 para densidade. Para soro de queijo minas-padrão os autores encontraram -

0,555+0,030°H para crioscopia; 6,30 para pH;12,48°D para acidez; 6,28% para sólidos totais; 93,97% para umidade; 0,7% para gordura; 0,49% para cinzas; 4,12% para lactose; 0,8 % para proteínas; 0,2% para cloretos e 1,0249 para densidade.

As proteínas de soro apresentam praticamente todos os aminoácidos essenciais em quantidades superiores às recomendadas, exceto pelos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina) que não aparecem em excesso, porém atendem às recomendações para todas as idades. Apresentam elevadas concentrações de triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina (SGARBIERI, 2004). Possuem um dos mais altos PER (Protein Efficiency Ration) conhecidos, 3,2, superando a caseína que é de 2,5 e o da proteína da carne que é de 2,9 (ANTUNES, 2003).

A principal proteína do soro é a beta-lactoglobulina, representando aproximadamente metade das proteínas totais do soro do leite. As propriedades do soro são um reflexo das características desta proteína (ANTUNES, 2003). Apresenta peso molecular de 18,4 a 36,8kDa, o que lhe confere resistência à ação de ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago, sendo absorvida no intestino delgado (HARAGUCHI, ABREU e PAULA, 2006).

A proteína do soro que se apresenta com o segundo maior teor no leite é a alfa-lactoalbumina com cerca de 2% das proteínas totais do leite e 13% das proteínas do soro. Apresenta alto teor de triptofano, aminoácido essencial na regulação do sono e precursora da serotonina (ANTUNES, 2003). Caracteriza-se por ser de fácil e rápida digestão (HARAGUCHI, ABREU e PAULA, 2006). Apresenta atividade antimicrobiana contra algumas bactérias patogênicas como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* (LONNERDAL, 2003).

As imunoglobulinas são a terceira proteína em quantidade no soro do leite. Possuem elevada concentração e papel importante no colostro e na defesa dos recém-nascidos. As imunoglobulinas do leite permanecem quase que integralmente no soro e desempenham função importante no sistema gastrointestinal e sistemicamente em todo o organismo (SGARBIERI, 2004). Lonnerdal (2003) relata que a proteína tem atividade prebiótica para Bifidobactérias e *Lactobacillus*.

As lactoferrinas apresentam afinidade por ferro, apresentando atividade bacteriostática por inibir micro-organismos dependentes deste mineral. Durante sua digestão forma a lactoferricina, um potente peptídeo bactericida contra *E. coli* enteropatogênica (LONNERDAL, 2003).



### 3.2 Bebida láctea fermentada

Bebida Láctea Fermentada é o produto fermentado mediante a ação de cultivo de micro-organismos específicos e/ou adicionado de leite(s) fermentado(s) e que não poderá ser submetido a tratamento térmico após a fermentação, onde a base láctea representa pelo menos 51% (m/m) do total de ingredientes do produto (BRASIL, 2005). No Brasil, a produção de bebidas lácteas é uma das principais opções de aproveitamento do soro do leite e as mais comercializadas são as bebidas fermentadas, com características sensoriais semelhantes ao iogurte, e bebidas lácteas não-fermentadas (CAPITANI, 2005). Sua tecnologia de fabricação baseia-se na mistura de iogurte e soro na proporção adequada, seguida da adição de ingredientes como aromatizantes, corantes, edulcorantes, polpa de frutas e outros, de acordo com a formulação do produto (OLIVEIRA, 2006).

É um produto geralmente confundido com o iogurte, sendo diferenciado deste por alguns requisitos, como o fermento utilizado, matéria-prima, teor mínimo de proteínas e contagem de bactérias lácticas. Na bebida láctea não existe definição de micro-organismo utilizado, devendo apresentar um mínimo de  $10^6$  UFC/g no produto final para o cultivo láctico específico empregado. Nas bebidas lácteas o teor mínimo de proteínas de origem láctica é de 1,0 grama para cada 100 gramas da bebida, sendo obrigatório o uso de soro em sua formulação (BRASIL, 2005). No iogurte deve-se utilizar obrigatoriamente o *Lactobacillus delbrueckii* (subespécie *bulgaricus*) e *Streptococcus salivarius* (subespécie *thermophilus*), sendo necessário um mínimo de  $10^7$  UFC/g destes micro-organismos. Quanto ao teor mínimo de proteínas, no iogurte admite-se um mínimo de 2,03 gramas por 100 gramas de iogurte, sendo opcional o uso do soro (BRASIL, 2007).

Não existe uma quantidade padrão de soro que deva ser usado nas formulações de bebidas lácteas fermentadas. Santos et al. (2008) estudaram diferentes concentrações de soro em bebida láctea fermentada com polpa de fruta, usando 20%, 40%, 60% e 80% de soro na formulação. As bebidas elaboradas foram avaliadas por sessenta provadores não-treinados em um teste de aceitação com uma escala hedônica de nove pontos. Os resultados obtidos demonstraram que a formulação em que ocorreu a substituição de 40% do leite por soro de queijo foi a mais aceita, situando-se próximo do termo hedônico "gostei muito". O teor

intermediário de substituição de leite por soro de queijo da formulação 'B', 40%, propiciou a formação do gel protéico com consistência intermediária, resultando em um produto com melhor aceitação para uma bebida láctea. De forma semelhante, Oliveira (2006), comparando diferentes concentrações de soro na bebida láctea, 10%, 30% e 50%, obteve como preferência as concentrações de 30% e 50% de soro.

Adicionalmente às bebidas lácteas pode ser feito uso de diferentes ingredientes como forma de diminuir o seu custo de fabricação, melhorar seu valor nutritivo e suas características sensoriais e também atribuir funcionalidade a este produto. Gerhardt et al. (2013) desenvolveram uma bebida láctea adicionada de colágeno, melhorando a estabilidade do produto e com apelo funcional, obtendo boa aceitação sensorial. Kempka et al. (2008) utilizaram 30% de extrato hidrossolúvel de soja em formulação de bebida láctea fermentada obtendo boa aceitabilidade durante 14 dias de estocagem. A adição de chia à bebida láctea pode contribuir com a melhoria das características funcionais das bebidas lácteas, bem como prover apelo funcional às mesmas.

### **3.3 Alimentos funcionais**

Os alimentos funcionais podem ser definidos como sendo aqueles alimentos que beneficiam uma ou mais funções orgânicas, além da nutrição básica, contribuindo para melhorar o estado de saúde e bem-estar e reduzir o risco de doenças (DIPLOCK et al., 1999). São consumidos em dietas convencionais, mas demonstram capacidade de regular funções corporais de forma a auxiliar na proteção contra doenças como hipertensão, diabetes, câncer, osteoporose e coronariopatias (SOUZA, SOUZA NETO e MAIA, 2003).

É importante destacar que alimentos funcionais são aqueles que além de fornecerem a nutrição básica, promovem a saúde, possuindo potencial para promover a saúde por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional, devendo ser salientado que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura de doenças. Para alimentos terapêuticos, tem-se o termo nutracêutico, que diz respeito a um alimento ou ingrediente alimentar que proporciona benefícios médicos e de saúde, incluindo prevenção e tratamento de

doenças (SANDERS, 1998). No Japão, precursor da alimentação funcional, a definição legal de alimento funcional foi estipulada de acordo com o Sistema "Alimento Destinado a Uso Específico de Saúde" (*Food for Specific Health Use – FOSHU*) da legislação de alimentos japonesa, sendo alimento funcional definido como aquele ao qual é atribuído um efeito positivo sobre a saúde (LEE et al., 1999).

No Brasil, a ANVISA considera como funcionais os seguintes compostos ou agentes: bactérias probióticas, proteínas de soja, ácidos graxos ômega 3, carotenóides (licopeno, luteína, zeaxantina) fibras alimentares (fibras alimentares comuns, beta-glucana, dextrina resistente, frutooligossacarídeo, goma guar parcialmente hidrolisada, inulina, lactulose, polidextrose, psillium ou psyllium, quitosana) fitosteróis, polióis (manitol, xilitol e sorbitol), chegando a aproximadamente 734 produtos aprovados, principalmente nos segmentos "alegações de propriedades funcionais ou de saúde" e "substâncias bioativas e probióticos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde" (BRASIL, 2008). O produto a ser desenvolvido se enquadra na designação de alimento funcional, por ser fonte de probióticos e de semente de chia, fonte de ácido alfa-linolênico.

### **3.4 Probióticos**

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 02/2002 da ANVISA define probióticos como micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002). Goldin (1998) afirma que termo probiótico foi usado pela primeira vez em 1965 por Lilley e Stillwell para descrever micro-organismos que desempenham atividades benéficas. A quantidade mínima viável para estes micro-organismos deve estar situada na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo (BRASIL, 2008). Para Theophilo e Guimarães (2008) probióticos são micro-organismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro. A utilização destes modula a microbiota intestinal, estimulando a proliferação de bactérias benéficas em detrimento de bactérias potencialmente prejudiciais. Segundo estes autores os probióticos atuam:

- ✓ Recompondo a microbiota intestinal, através da adesão e colonização na mucosa intestinal, impedindo a adesão e produção de toxinas ou invasão das células epiteliais por bactérias patogênicas;
- ✓ A microbiota benéfica compete com as bactérias indesejáveis pelos nutrientes disponíveis;
- ✓ A relação simbiótica entre hospedeiro e bactérias impede a presença de nutrientes em excesso, o que favoreceria o estabelecimento de competidores microbianos com potencial patogênico ao hospedeiro;
- ✓ Os probióticos podem impedir a multiplicação de seus competidores, através de compostos antimicrobianos, principalmente as bacteriocinas.

No Brasil, a ANVISA considera como probióticos os micro-organismos *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium*. O *Lactobacillus delbrueckii* (subespécie *bulgaricus*) e *Streptococcus salivarius* (subespécie *thermophilus*) foram retirados da lista tendo em vista que além de serem espécies necessárias para produção de iogurte, não possuem efeito probiótico cientificamente comprovado (BRASIL, 2008).

### 3.4.1 *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*

#### 3.4.1.1 *Bifidobacterium*

As bactérias do gênero *Bifidobacterium* foram isoladas pela primeira vez em 1899 por Tissier. Representam um papel importante no ecossistema bacteriano intestinal do homem. São bacilos, Gram positivos, não esporogênicos, imóveis, anaeróbios estritos, com temperatura ótima de crescimento em 39 a 40°C e são diferenciadas do gênero *Lactobacillus* pela presença da enzima frutose-6-fosfato fosfocetolase (GAVINI et al., 1990). Segundo Holt et al. (1994) sua temperatura ótima esta na faixa de 37° a 41°C, não havendo crescimento em temperaturas abaixo de 25-28°C e acima de 43°- 45°C. O pH ótimo de crescimento compreende a

faixa de seis a sete, não ocorrendo crescimento abaixo de 4,5 a 5,0 ou acima de 8 a 8,5.

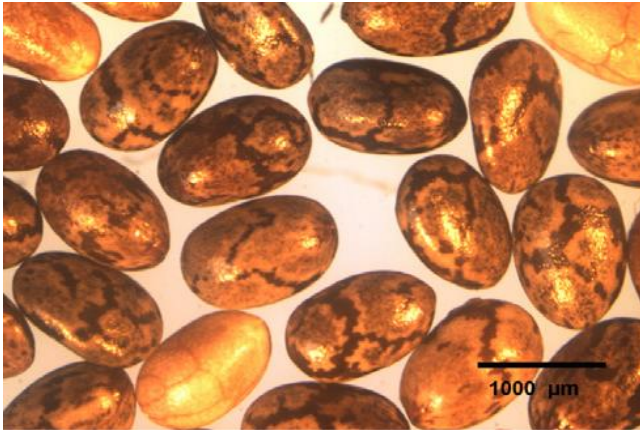
#### 3.4.1.2 *Lactobacillus*

Os *Lactobacillus* foram isolados pela primeira vez por Moro em 1890 a partir de fezes de lactentes amamentados com leite humano. Estes micro-organismos crescem bem em meios ligeiramente ácidos, pH inicial de 6,4 a 4,5. A maioria das cepas são aerotolerantes e seu crescimento ótimo acontece em baixas condições microaerófilas ou anaeróbicas. A maior parte dos lactobacilos são mesófilos (30 - 40°C), com limite superior de 40°C, oscilando de 2 a 53°C. São geralmente caracterizados como Gram-positivos, incapazes de formar esporos, desprovidos de flagelos, possuindo forma bacilar ou cocobacilar, e aerotolerantes ou anaeróbios. Os membros deste gênero transformam açúcares simples em ácido láctico por homofermentação ou em ácido láctico e outros produtos finais como ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico e ácido succínico (FERNANDES e CASTILLO, 2002).

### 3.5 Chia (*Salvia hispanica* L)

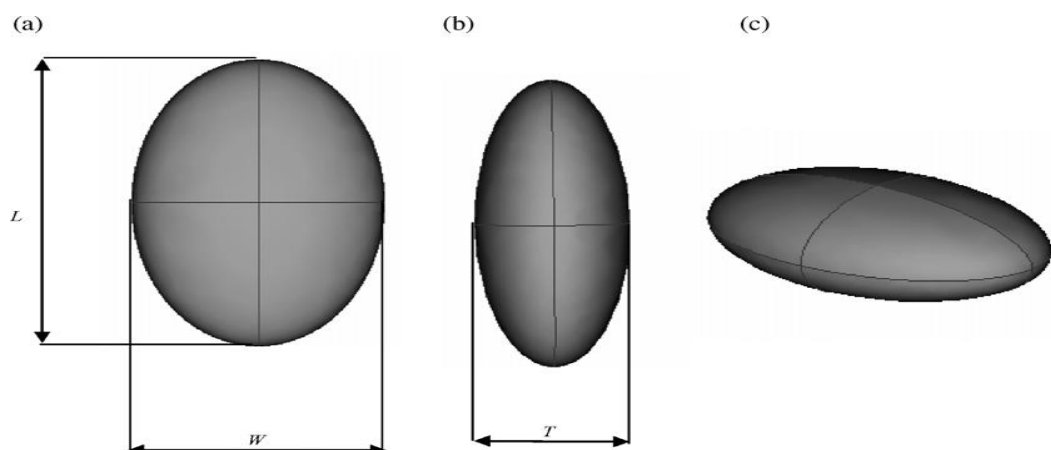
A Chia (*Salvia hispanica* L) é uma planta de verão, anual, e pertencente à família *Labiatae*. As sementes podem se apresentar na cor marrom escuro ou marrom claro. Nos tempos pré-colombianos era um dos alimentos básicos das civilizações da América Central. Por ser usada em cerimônias pagãs, os espanhóis tentaram erradicá-la e introduziram novas espécies providas do Novo Continente. No idioma dos antigos maias, quer dizer *força*. Era considerada um superalimento, pois acreditava-se suprir as necessidade nutricionais diárias de uma pessoa (AYERZA e COATES, 2009).

Ixtaina et al. (2008) estudaram as características físicas das sementes, obtendo como valores para o comprimento (*L*), largura (*W*) e espessura (*T*) 2,11; 1,32 e 0,81 mm para as sementes escuras 2,15; 1,40 e 0,83 mm para as sementes claras, respectivamente (figuras 1 e 2).



**Figura 1:** Sementes da Chia

Fonte: Muñoz et al. (2012).



**Figura 2:** Dimensões da semente da Chia.

Fonte: Ixtaína et al. (2008).

As sementes de chia apresentam variações consideráveis em sua composição centesimal, devido principalmente às características da região onde foram cultivadas. Ayerza e Coates (2011) pesquisaram diferenças na composição de proteína, óleo e composição dos ácidos graxos em campos comerciais localizados na Argentina, Bolívia e Equador, obtendo como resultado médio para proteína 16,45%, 26,03% e 15,95% e para lipídeos 33,50%, 29,98% e 31,47%, respectivamente. Os dados apresentados demonstram a grande quantidade de nutrientes que deram à planta sua fama de super alimento.

O principal atrativo da Chia é a composição dos ácidos graxos que formam o óleo. Ayerza e Coates (2011) identificaram 78,87% a 82,85% dos ácidos graxos como polinsaturados, sendo que 16,99 a 25,5% da composição dos óleos foram identificados como ômega-6 e 60,35 a 64,35% como ômega-3, sendo a semente uma considerável fonte de ácidos graxos n-3, dando margem ao seu uso como fonte deste composto em outros alimentos

Outra característica das sementes é a presença de compostos fenólicos, antioxidantes naturais encontrados em diversas espécies de planta. Taga, Miller e Pratt (1984) *apud* Reyes-Caudillo, Tecante e Valdivia-Lopez (2007) relatam a presença dos ácidos cinâmico, clorogênico e cafeico, juntamente com miricetina, quercetina e quemperol em extratos metanólicos hidrolisados. Reyes-Caudillo, Tecante e Valdivia-Lopez (2007) comparando diferentes métodos de extração de compostos fenólicos isolaram glicosídeo fenólico-Q, glicosídeo fenólico-K, ácido cafeico, ácido clorogênico, quercitina e quemperol. Estudos têm procurado formas de uso industrial da Chia ou da torta resultante da extração do óleo, que é o principal derivado da semente. O uso em bebidas lácteas não foi relatado em nenhum trabalho científico e o seu efeito na reologia do produto é desconhecido. Apesar de o principal atrativo do uso da Chia como ingrediente em alimentos ser devido as suas características de alimento funcional, a semente possui características físico-químicas que podem ser aproveitadas na indústria de alimentos, principalmente devido a sua mucilagem, que forma aproximadamente 5% do peso da semente.

A mucilagem da Chia tem uma grande capacidade de hidratação, pois uma amostra de 100 mg de mucilagem foi capaz de absorver 2,7 gramas de água, 27 vezes o seu peso (MUÑOZ et al., 2011). A goma é composta por D-xilopiranosil, D-glucopiranosil e ácido 4-O-metil-D-glucopiranosilurônico, formando tetrassacarídeo (KUEI-YING, JAMES e WHISTLER, 1994). Esta característica a torna um alimento apropriado para dietas de restrição calórica, pois quando ingerida aumenta seu volume dentro do estômago, promovendo sensação de saciedade, um dos motivos da fama da semente como superalimento.

Borneo et al. (2010) estudaram a substituição de ovos e óleo por gel feito a partir da semente da Chia em formulações de bolo e concluíram que substituindo 25% tanto dos ovos quanto do óleo, obtém-se características físico-químicas e sensoriais próximas as características do controle, obtendo aceitabilidade muito

próximas. Moreira et al. (2012) observaram melhorias nas propriedades reológicas de farinha de nozes usada em massas para produtos sem glúten ao adicionar 4,0% de farinha de chia à massa, juntamente com goma guar, tragacante e hidróxipropilmetilcelulose em diferentes concentrações. Muñoz et al. (2012) obtiveram filmes com boas propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água usando mucilagem da chia e soro lácteo na proporção de 1:3 e 1:4 respectivamente, obtendo, segundo os autores, um produto com possíveis usos como embalagens para alimentos.

### 3.6 Ácidos graxos Ômega-3 e Ômega-6 (n-3 e n-6)

As famílias n-6 e n-3 são compostas por ácidos graxos que possuem insaturações separadas por um carbono metilênico, com a primeira insaturação no sexto ou terceiro carbono, respectivamente, enumerado a partir do grupo metil terminal (MARTIN et al., 2006). Destacam-se aqueles pertencentes à família ômega-6, como os ácidos linoléico (18:2n-6, AL) e o araquidônico (20:4n-6, AA) e à família ômega-3 como os ácidos alfa-linolênico (18:3n-3, AAL), eicosapentaenóico (20:5n-3, AEP) e docosahexaenóico (22:6n-3, ADH) (PERINI et al., 2010).

No caso mais específico da Chia, os principais ácidos graxos que formam o óleo são o ácido alfa-linolênico (AAL, 18:3n-3) com 641 g/kg do total de ácidos graxos e ácido linoleico (AL, 18:2n-6) com 188 g/kg do total de ácidos graxos (PEIRETTI e GAI, 2008). Estes compostos servem como base para a atuação das alongases e dessaturases no retículo endoplasmático, principalmente nas células hepáticas. As alongases atuam adicionando dois átomos de carbono à parte inicial da cadeia, e as dessaturases agem oxidando dois carbonos da cadeia, originando uma dupla ligação com a configuração *cis*. Neste processo são formados os Ácidos Graxos Poliinsaturados de Cadeia Muito Longa (AGPI – CML) como o mdocosahexanóico (22:6n-3, ADH) e o araquidônico (20:4n-6, AA) (MARTIN et al., 2006).

Para um bom aproveitamento dos AAL na sua conversão em ADH é necessária a observação da relação n-6/n-3 na dieta. Os ácidos graxos n-6 competem pela ação das alongases e dessaturases, sendo que uma relação muito alta n-6/n-3 pode inibir a formação de AGPI – CML, como o ADH (EMKEN et al.,



1994). A proporção n-6 /n-3 ingeridos na dieta humana que era de 4:1, hoje chega a ser de 20-30:1, trazendo efeitos indesejáveis à saúde. Este efeito tem sido atribuído ao aumento dos níveis de prostaglandinas e leucotrienos derivados do metabolismo do ácido araquidônico, em função da elevada ingestão do ácido linoléico oriundo de óleos vegetais e produtos industrializados (SGARBIERI e PACHECO, 1999).

O ácido alfa-linolênico se converte nos ácidos eicosapenatanóico (AEP) e decosaehexanóico (ADH), que são precursores dos mediadores químicos, denominados prostaglandinas da série 3 e leucotrienos da série 5, desempenhando efeitos biológicos protetores contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Sugere-se que eles tenham efeitos antitrombóticos, antiateroscleróticos, antiinflamatórios e agem na melhora da função endotelial e na diminuição da pressão arterial e concentração de triglicérides. Em contraste, o ácido linoléico é convertido em ácido araquidônico, que por sua vez é precursor da síntese dos eicosanóides prostaglandinas 2 e leucotrienos 4, mediadores químicos que desempenham efeitos biológicos envolvidos nos processos de infecção, inflamação, lesão tecidual, modulação do sistema imune e agregação plaquetária e desenvolvimento, crescimento e metástases tumorais (BARBOSA et al., 2007).

A relação dos n-6:n3 nas sementes da chia fica em aproximadamente 2:6, compensando o consumo de AL em outros alimentos, como no óleo de soja, em que a relação é 5:1. A Sociedade Internacional para o Estudo de Ácidos Graxos e Lípidios (ISSFAL) sugere a quantidade de 0,65 gramas por dia de ADH e mais 1 grama por dia de AAL (BARBOSA et al., 2007). Segundo a ANVISA, para ser considerado “fonte” de AAL, o alimento deve conter no mínimo 300 mg deste ácido graxo na porção, e para ser considerado com “alto conteúdo” deve ter no mínimo 600 mg de AAL na porção (BRASIL, 2012).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

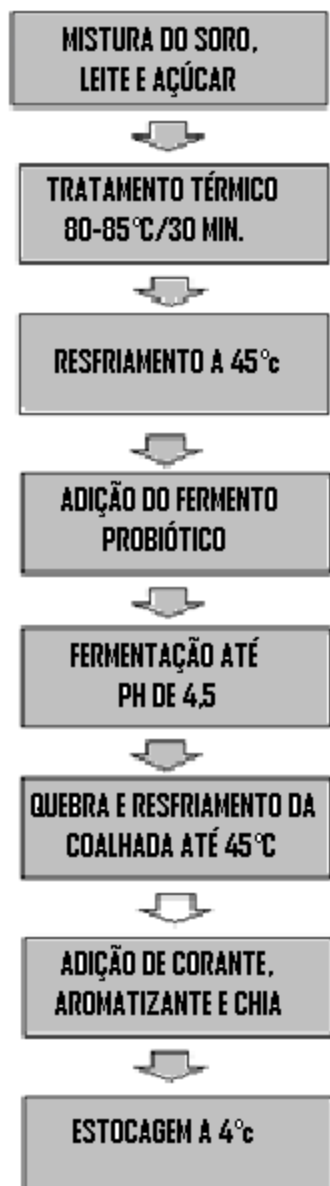
### 4.1 Formulação

No preparo da bebida foi utilizado leite UHT, soro lácteo, açúcar cristal, fermento láctico e semente de chia. Antes da determinação da formulação a ser utilizada no experimento foram realizados testes preliminares com diferentes concentrações dos ingredientes. Após escolha da formulação, a bebida láctea foi preparada conforme Figura 3, no laticínio do Centro Estadual de Educação Profissional Assis Brasil, localizado no município de Clevelândia, no estado do Paraná. O experimento foi dividido em 2 etapas, sendo a primeira etapa caracterizada para a definição da melhor formulação, com base nas análises físico-químicas, microbiológica e sensorial das formulações previamente desenvolvidas. Na segunda etapa, a formulação escolhida foi desenvolvida (repetida) mais duas vezes (nas mesmas condições e com matéria-prima e ingredientes de mesmo lote), sendo realizadas a contagem de bactérias probióticas e a caracterização físico-química.

O soro utilizado nas formulações foi obtido no laticínio do CEEP Assis Brasil, resultante da fabricação de queijo Minas-padrão, produzido utilizando-se leite integral pasteurizado de animais da raça Holandesa, coalho em pó, cloreto de cálcio e fermento láctico DVS (*Direct Vac Set*). Após a obtenção, o soro foi armazenado em câmara frigorífica a 4°C até a fabricação da bebida láctea. Como fermento foi usado cultura termofílica DVS-50U, marca Chr. Hansen (ABY-3) com cepas mistas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium* BB-12 e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. A opção pelo uso da cultura mista ABY-3 é justificada pela presença de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium*, que são considerados probióticos. O leite e a chia usados foram adquiridos no comércio local, sendo utilizados lotes diferentes entre as repetições.

A bebida foi formulada com 60% (m/m) de leite, 32% (m/m) de soro e 8% (m/m) de açúcar, utilizando um fermentador automático com capacidade para 100 litros (Figura 4). A mistura recebeu tratamento térmico de 80-85°C por 30 minutos, seguido de resfriamento a 45°C para inoculação da cultura láctea. A fermentação foi realizada nesta temperatura até pH de 4,6. Terminada a fermentação, foi procedida a quebra da coalhada e resfriamento até 4°C, bem como adição da chia nas

proporções de 1,0% (m/v) (formulação A), 3,0% (m/v) (formulação B) e 5,0% (m/v) (formulação C), aroma de morango e corante vermelho carmim de cochonilha. O produto foi armazenado em garrafas de vidro de 500 mL e mantido sob refrigeração até a realização das análises microbiológicas e físico-químicas, e avaliação sensorial.



**Figura 3:** Fluxograma de fabricação da bebida láctea.



**Figura 4:** Fermentador utilizado na fabricação da bebida láctea fermentada.

#### **4.2 Avaliação das condições higiênico-sanitárias da fabricação da bebida**

Para averiguação do atendimento da higiene durante o processamento das bebidas utilizadas na análise sensorial foram realizadas as análises preconizadas para bebidas lácteas fermentadas pela RDC 12/2001 (Determinação do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes a 45°C e Pesquisa de *Salmonella* sp.) (BRASIL, 2001), e pela Instrução Normativa 16/2005 do MAPA (NMP de coliformes 45°C e NMP de coliformes 35°C) por meio de metodologia preconizada na Instrução Normativa 62/2003 do MAPA (BRASIL, 2003) e International Commission on Microbiological Specification for Foods – ICMSF (1978, 1980) na bebida recém elaborada. As análises foram feitas na UTFPR Pato Branco.

#### 4.2.1 Preparo das amostras

No laboratório cada amostra recebeu um código de identificação. A seguir, foram colocados assepticamente 25 mL de amostra em um frasco de Erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada 0,1% estéril, sendo misturada posteriormente (diluição  $10^{-1}$ ). A partir dessa diluição procederam-se as demais diluições decimais seriadas até  $10^{-6}$  utilizando-se sempre água peptonada 0,1% estéril como diluente. As diluições obtidas foram usadas, conforme necessário, nas análises subsequentes (ICMSF, 1980; BRASIL, 2003). As semeaduras em placas de Petri foram feitas em triplicata.

#### 4.2.2 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais

Foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos (3 séries de 3 tubos), empregando-se o Caldo Lauril Sulfato Triptose com incubação a 35°C durante 24-48 horas, para o teste presuntivo. A formação de turbidez com produção de gás, contido em tubos de Durham, indicaram resultado positivo.

Para o teste confirmativo de coliformes totais, transferiu-se uma alíquota dos tubos positivos em Caldo LST para tubos de ensaio contendo Caldo Verde Brilhante, seguido de incubação a 35°C durante 24-48 horas. A formação de turbidez com produção de gás, contido em tubos de Durham, indicaram resultado confirmativo para coliformes totais.

A determinação do NMP de coliformes totais foi realizada empregando-se a tabela de Hoskins (ICMSF, 1978).

#### 4.2.3 Determinação do NMP de coliformes a 45°C ou coliformes termotolerantes

A partir dos tubos positivos em Caldo LST no teste presuntivo, transferiu-se uma alíquota para tubos de ensaio contendo Caldo EC, com incubação a 45°C por 24-48 horas (SILVA et al., 2007). A formação de turbidez com produção de gás,

contido em tubos de Durham, indicaram resultado confirmativo para coliformes termotolerantes, cuja determinação do NMP se deu com auxílio da tabela de Hoskins (ICMSF, 1978).

#### 4.2.4 Pesquisa de *Salmonella* sp.

Em 225 mL de Caldo Lactosado foram adicionados 25 mL de amostra. Após incubação a 35°C por 24 horas, 1 mL do pré-cultivo foi transferido para tubos de ensaio contendo 10 mL de Caldo Tetracionato de Kauffmann e para tubos com 10 mL de Caldo Selenito Cistina, seguido de incubação a 35°C. Após 24-30 horas foram feitas sementeiras, em placas de Petri contendo Ágar *Salmonella Shigella* - SSA. As colônias suspeitas (incolores, com ou sem centro negro) foram submetidas a prova de soroaglutinação, que se baseia na reação antígeno-anticorpo, com conseqüente aglutinação do antígeno frente ao anti-soro para *Salmonella* polivalente "O" (BRASIL, 2001).

### 4.3 Avaliação química e físico-química

Para as avaliações das características químicas e físico-químicas da bebida láctea foram realizadas as análises de pH, acidez titulável, viscosidade aparente, proteínas, gordura, cinzas e umidade. No soro e no leite foram feitas análises de cinzas, umidade, lipídeos, acidez titulável, pH e proteínas. Na chia foram determinados o teor de proteínas, lipídeos, cinzas, umidade e fibra crua. As análises químicas e físico-químicas foram feitas no produto após 0, 7 e 14 dias a partir da data de fabricação. Todas as análises foram feitas em triplicata e procedidas na UTFPR Francisco Beltrão.

#### 4.3.1 Determinação do pH

Foi utilizado o método potenciométrico com o auxílio de um pHmêtro marca Tecnopon, modelo MPA 210. O método consiste na imersão do eletrodo do

potenciômetro na amostra que fará a leitura da concentração dos íons hidrogênio, dando como resultado direto o pH da solução.

#### 4.3.2 Viscosidade aparente

A viscosidade aparente das amostras de bebida láctea foi determinada a 8°C, com um viscosímetro de cilindro *Brookfield* modelo DVII+ *Viscometer* no tempo de 1 minuto na rotação de 22 RPM no *Campus* CEDETEG da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO) em Guarapuava, no Paraná .

#### 4.3.3 Proteínas

A determinação do teor de proteínas foi realizada pelo método descrito por Tedesco et al. (1995). Neste método a matéria orgânica é digerida e o nitrogênio proteico transformado em amônia. A análise foi realizada através da digestão de 0,5 gramas da amostra em 1 ml de peróxido de hidrogênio e 2 ml de ácido sulfúrico, com posterior destilação da amostra digerida e titulação com HCl 0,1 M padronizado.

#### 4.3.4 Lipídeos

A determinação do teor lipídico foi realizada pelo método de Bligh-Dyer (1959). Utiliza-se no método uma mistura de três solventes: clorofórmio, metanol e água. Mistura-se a amostra com o metanol e clorofórmio que estão numa proporção que formam uma só fase. Em seguida adiciona-se mais clorofórmio e água promovendo a formação de uma fase de clorofórmio, contendo lipídios, e outra de metanol mais água, contendo substâncias não lipídicas. A fase contendo a gordura é isolada e após a evaporação do clorofórmio e obtém-se a quantidade de gordura total por pesagem (PARK e ANTONIO, 2006).

#### 4.3.5 Fibra crua

O teor de fibra crua (lignina e celulose) foi determinado pelo método de digestão ácida seguida de digestão alcalina. No método, 2 a 3 gramas da amostra são digeridas em uma solução fervente de 1,25% de ácido sulfúrico, seguida por digestão em solução fervente de 1,25% de hidróxido de sódio. Em seguida a amostra é filtrada a vácuo e feito cálculo gravimétrico.

#### 4.3.6 Acidez titulável

A acidez titulável foi determinada através da titulação da amostra por solução de hidróxido de sódio 0,11 N (solução Dornic), em presença de indicador fenolftaleína.

#### 4.3.7 Umidade

O teor de umidade foi determinado pelo método gravimétrico. A amostra foi pesada em cadinho previamente calcinado em mufla permanecendo durante aproximadamente 4 horas em estufa a 105°C até peso constante.

#### 4.3.8 Cinzas

A determinação do teor de cinzas foi realizada pelo método gravimétrico. A amostra foi pesada em cadinho previamente calcinado em mufla, sendo que a mesma permaneceu durante aproximadamente 5 horas em uma mufla em temperatura de 550°C para posterior pesagem.

### **4.4 Avaliação sensorial**

Considerando que a presente pesquisa envolveu a participação de humanos na análise sensorial, o projeto foi antecipadamente submetido ao comitê de ética da UTFPR para análise e apreciação, CAEE (Certificado de Apresentação para



Apreciação Ética) número 15869313.9.0000.554, recebendo parecer favorável (anexo A) sob o número 392.800.

O teste de aceitabilidade global foi realizado utilizando provadores não treinados, com idade mínima de 18 anos, alunos e funcionários do CEEP Assis Brasil, na cidade de Clevelândia, no estado do Paraná, por meio de teste hedônico com escala de 1 a 9 pontos, variando de gostei muitíssimo até desgostei muitíssimo; teste de ordenação de preferência com escala de 1 a 3 e teste de intenção de consumo com escala de 1 a 7, conforme metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008). A análise foi realizada após 0, 7 e 14 dias para o acompanhamento da aceitação do produto durante o período de estocagem sob refrigeração.

Os provadores foram orientados sobre o procedimento da análise sensorial aplicada para que preenchessem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (anexo B) e avaliassem as amostras. Foram servidos aproximadamente 30 mL de cada amostra, em conjunto, sendo solicitado que bebessem água nos intervalos entre uma provação e outra.

#### **4.5 Contagem de micro-organismos probióticos**

A contagem de *Lactobacillus acidophilus* e do *Bifidobacterium* foi realizada para verificação do atendimento à legislação específica de produtos lácteos fermentados e alimentos funcionais (probióticos) durante o armazenamento por 19 dias, que estabelece a quantidade mínima viável para os probióticos, situada na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  UFC na recomendação diária para consumo (BRASIL, 2008). Para a contagem foi utilizada a metodologia da American Public Health Association – APHA, descrita no Capítulo 19 do Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (HALL et al., 2001) e no Capítulo 8 da 17<sup>o</sup> Edição do Standard Methods for the Examination of Dairy Products (FRANK e YOUSEF, 2004). As análises foram feitas após 5, 12 e 19 dias.

#### 4.5.1 *Lactobacillus acidophilus*

Uma alíquota de 1,0 mL das diluições previamente preparadas conforme item 4.2.1 foi inoculada por profundidade, utilizando-se o meio De Man, Rogosa e Sharpe – MRS, modificado com a adição de 0,15 % (m/v) de Bile (MRS-Bile) (VINDEROLA; REINHEIMER, 2000). A contagem das Unidades Formadoras de Colônias – UFC/mL foi realizada após incubação a 37°C por 72 horas em jarras anaeróbicas contendo Anaerogen® (Oxoid, Reino Unido). A análise foi realizada em triplicata.

#### 4.5.2 *Bifidobacterium*

Uma alíquota de 1,0 mL das diluições previamente preparadas conforme item 3.2.1 foi inoculada por profundidade, utilizando-se o meio De Man, Rogosa e Sharpe – MRS, modificado com adição de 0,2 % (m/v) de Cloreto de lítio e 0,3 % (m/v) de Propionato de sódio (MRSLP) (VINDEROLA; REINHEIMER, 2000). A contagem de Unidades Formadoras de Colônias – UFC/mL foi realizada após incubação a 37°C por 72 horas em jarras anaeróbicas contendo Anaerogen® (Oxoid, Reino Unido). A análise foi realizada em triplicata.

### 4.6 Análise estatística

Os resultados obtidos nas análises físicas, físico-químicas e sensorial foram submetidos ao teste de *Tukey* com  $p < 0,05$  como nível de significância para comparação das médias, através do programa *Assistat* (versão 7.7 beta pt, por Prof. Dr. Francisco de Assis Santos e Silva, DEAG-CTRN-UFCG, Campina Grande, PB, Brasil). Para o teste de ordenação de preferência foi realizado o teste de Friedman, utilizando a tabela de Newell e Mac Farlane.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização da matéria-prima e ingredientes

A caracterização, mediante a realização de análises físico-químicas, da matéria-prima e dos demais ingredientes utilizados na elaboração do produto foi realizada com o propósito de conhecer a composição centesimal dos mesmos e assegurar sua qualidade. As Tabelas 1 e 2 apresentam os resultados em três repetições (R1, R2 e R3) das análises físico-químicas do soro e do leite UHT utilizados para a elaboração da bebida láctea. Nas segunda e terceira repetições foi utilizado o mesmo lote de matéria-prima.

**Tabela 1:** Características físico-químicas do soro usado para a elaboração da bebida láctea fermentada com chia.

Repetição	Umidade %	Cinzas %	Proteínas %	Lípideos %	Acidez titulável (°D)	pH	Carboidratos*
R 1	92,90±0,029	0,49±0,011	1,72±0,060	0,48±0,066	13,00±0,000	6,59±0,005	4,41
R 2 e R3**	93,05±0,064	0,52±0,030	0,89±0,040	0,93±0,152	13,00±0,000	6,42±0,005	4,61

Resultados expressam a média ± desvio padrão. \* Estimativa. \*\*Media de 2 repetições

**Tabela 2:** Características físico-químicas do leite UHT usado para a elaboração da bebida láctea fermentada com chia.

Repetição	Umidade %	Cinzas %	Proteínas %	Lípideos %	Acidez titulável (°D)	pH	Carboidratos*
R 1	88,29±0,36	0,74±0,004	5,53±0,35	3,06±0,03	16,00±0,00	6,75±0,005	3,38
R 2 e R3**	87,60±0,19	0,73±0,003	3,78±0,02	2,90±0,05	16,00±0,00	6,69±0,005	4,99

Resultados expressam a média ± desvio padrão. \* Estimativa. \*\*Media de 2 repetições.

O teor de lipídeos no soro lácteo apresentou variação de 0,48% na Repetição 1 (R1) a 0,93% (Repetições 2 e 3), com média igual a 0,78% considerando as três repetições. Valores inferiores aos encontrados na média foram obtidos por Soares et al. (2011) em soro gerado na fabricação de queijo Coalho (0,47%), e valores semelhantes foram relatados por Teixeira e Fonseca (2008) em soro oriundo da fabricação de queijo mussarela e minas padrão, sendo respectivamente 0,77 e 0,70%. O teor de lipídeos do soro usado na R2 e R3 foi de 0,93%, quase o dobro do valor encontrado na primeira repetição. Esta diferença pode ser atribuída a não padronização da composição do leite e do processo de fabricação (MIZOBUTI, 1994).

O teor de proteínas do soro apresentou variações de 0,89 a 1,72%, valores estes, superior aos valores obtidos por Soares et al. (2011) e Teixeira e Fonseca (2008), que encontraram respectivamente, 0,88% e 0,84 - 0,80% de proteína em soro de queijo minas e mussarela, respectivamente.

Os percentuais de cinzas e umidade variaram de, respectivamente, 0,49 – 0,52% e 92,90 – 93,05% valores estes, próximos aos encontrados por Soares et al. (2011), que relataram teores de 0,48% (cinzas) e 93,05% (umidade).

A acidez titulável de 13°D no soro de leite nas três repetições também foi semelhante à relatada por Soares et al. (2011), com valor de 13,6°D. O valor médio de pH do soro variou de 6,59 em R1 a 6,42 em R2 e R3, superior ao pH 6,05 obtido por Milagres et al. (2007).

A análise dos dados (Tabela 1) indicou falta de padronização na matéria-prima (soro) utilizada na elaboração da bebida láctea, especificamente quanto aos teores de proteínas e lipídeos observados entre as repetições, o que poderá interferir na qualidade do produto final. A composição do soro varia devido a diversos fatores, como o tipo de queijo produzido, tratamento térmico recebido, manipulação, entre outros fatores. A variação no perfil físico-químico do soro apresentada neste trabalho, apesar de ser mínima, pode dificultar a padronização de produtos que utilizam este ingrediente como matéria-prima, como ocorre, por exemplo, na elaboração das bebidas lácteas.

Os resultados das análises físico-químicas do leite UHT utilizado para a elaboração da bebida láctea estão apresentados na Tabela 2. O leite utilizado na preparação da bebida láctea foi o UHT integral, padronizado a 3% de gordura. Os resultados para o teor de lipídeos variaram de 3,05 (R1) a 2,90% (R2 e R3),

atendendo, portanto, ao anunciado no rótulo. Martins et al. (2008) relataram valores de 3,0 a 3,4% de lipídeos em leite UHT processado em uma indústria situada no Estado de São Paulo, mostrando variabilidade no produto final.

O teor de proteínas do leite UHT variou de 3,78 a 4,53%, próximo ao obtido por Lima et al. (2009), que obtiveram valores entre 3,90 e 5,02% em 4 marcas diferentes. No mesmo estudo os autores relataram valores de pH entre 6,62 e 6,72, enquanto Martins et al. (2008) obtiveram valores entre 6,4 e 6,7. Tais valores encontram-se muito próximo ao determinado no leite utilizado na formulação da bebida láctea nas três repetições, que variou de 6,69 a 6,75 (Tabela 2).

A acidez titulável de 16°D nas três repetições manteve-se dentro dos valores estabelecidos pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que preconiza a acidez do leite UHT entre 14 e 18°D (BRASIL 1996). Martins et al. (2008) também obtiveram acidez titulável dentro do padrão estabelecido, ao passo que Lima et al. (2009) relataram valores entre 18,68 e 20,31°D em leite UHT, não atendendo a legislação vigente.

A Tabela 3 apresenta os resultados das análises físico-químicas realizadas na semente de chia.

**Tabela 3:** Características físico-químicas da semente de chia usada para a elaboração da bebida láctea

Repetição	Umidade %	Cinzas %	Proteínas %	Lipídeos %	Fibra crua %
R 1	5,53±0,081	4,72±0,060	19,53±0,576	25,43±0,663	11,63±0,64
R2 e R3**	6,40±0,176	5,50±0,032	22,00±0,654	19,71±1,218	***

Resultados expressam a média ± desvio padrão. \* Estimativa. \*\*Media de 2 repetições. \*\*\*Não realizado

O teor lipídico apresentou variação entre as repetições de 19,71 a 25,43% (Tabela 3). Esta variação é confirmada por diversos autores, Ferreira (2013) obteve o teor médio de 22,12% de lipídeos, ao passo que Jimenes, Masson e Quitral (2013) obtiveram 27,9%. Já Ayerza e Coates (2011) relataram uma variação de 29,98 a 31,47% em sementes de chia. Essas diferenças podem ser explicadas pela

diferença nas condições de cultivo, sendo a altitude um dos fatores a serem levados em consideração. De acordo Ayerza e Coates (2009), quanto maior a altitude em relação ao nível do mar, maior o teor lipídico das sementes.

A porção protéica da semente também apresenta valores significativos, sendo superior a outros alimentos tradicionais como o trigo, arroz, milho e cevada (AYERZA e COATES, 2005). Neste trabalho o valor obtido apresentou variação de 19,53 a 22,00% (Tabela 3), muito próximo aos encontrados por Jimenes, Masson e Quitral (2013) e Pizarro et al. (2013), cujos valores foram de 19,9 e 20,01%, respectivamente. A variação de 15,95 a 26,03% nos níveis de proteínas relatada por Ayerza e Coates (2011) também foi explicada pela diferença nas condições de cultivo, sendo considerada inversamente proporcional à altitude em que a planta é cultivada (AYERZA e COATES, 2009).

Os teores de cinzas ficaram em 4,72 (R1) e 5,50 (R2 e R3) e a umidade das sementes ficou em 5,53% (R1) e 6,40% (R2 e R3), respectivamente, próximos aos obtidos por Jimenes, Masson e Quitral (2013), cujos valores situaram-se em 5,1 e 7,8% para cinzas, e 4,5 e 6,2% para umidade. A alta concentração de cinzas fornece um indicativo da sua importância como fonte de minerais. Ferreira (2013) obteve como valor para cinzas 5,08%, e avaliou o perfil de minerais da semente, observando como resultado 0,66% para fósforo e potássio, 0,52 % para magnésio, 0,22% para enxofre, 0,10% para ferro, contendo ainda traços de cobre, manganês e zinco.

As fibras alimentares são usualmente classificadas em dois principais grupos: fibras solúveis e insolúveis. Dentre as fibras solúveis estão pectinas,  $\beta$ -glucanas, galactomananas, gomas e oligossacarídeos não digeríveis, enquanto que fibras insolúveis incluem a celulose, hemicelulose e lignina (SIMAS, 2008). A metodologia utilizada no trabalho, conhecida como digestão química, permitiu a detecção apenas da lignina e da celulose, também conhecida como fibra crua (SABIONI, 1989). . Em um trabalho comparando diferentes metodologias para quantificação de fibras em farelo de trigo, Anderson e Clidesdaly (1980) *apud* Sabioni (1989), através do método enzimático obtiveram como resultado 46,0% de fibras enquanto que com o método de digestão química, ou seja, fibra crua, o valor decaiu para 8,9%. O valor de fibra na chia utilizada na fabricação da bebida usando a metodologia de digestão química foi de 11,63%, enquanto que Ferreira (2013) e Jimenes, Masson e Quitral

(2013) utilizando o método enzimático obtiveram 28% e 33% de fibras totais respectivamente.

## 5.2 Caracterização físico-química da bebida láctea com e sem chia

As amostras da bebida láctea fermentada com adição de 1,0, 3,0 e 5,0% de chia foram identificadas como Formulação A, B e C, respectivamente. Na tabela 4 estão apresentados os resultados das análises físico-químicas (m/v) da bebida láctea fermentada adicionada de três concentrações diferentes de chia, no produto recém preparado e no produto estocado a 4°C por 7 e 14 dias.

**Tabela 4:** Características físico-químicas da bebida láctea fermentada adicionada de diferentes concentrações de chia, no produto recém preparado e após 7 e 14 dias de estocagem a 4°C

Chia %	Umidade %	Cinzas %	Proteínas %	Lipídeos %	Viscosidade (**Pa/s)	pH
Bebida láctea recém preparada						
0,0 %	81,53±0,120 <sup>a</sup>	0,66±0,020 <sup>d</sup>	2,80±0,035 <sup>d</sup>	2,31±0,101 <sup>d</sup>	*N.D.	4,58±0,000 <sup>a</sup>
1,0 %	78,42±0,120 <sup>b</sup>	0,69±0,015 <sup>c</sup>	3,40±0,020 <sup>c</sup>	2,98±0,025 <sup>c</sup>	*N.D.	4,59±0,010 <sup>a</sup>
3,0 %	77,42±0,577 <sup>c</sup>	0,77±0,010 <sup>b</sup>	5,03±0,047 <sup>b</sup>	4,86±0,180 <sup>b</sup>	*N.D.	4,59±0,006 <sup>a</sup>
5,0 %	75,92±0,125 <sup>d</sup>	0,81±0,015 <sup>a</sup>	5,37±0,030 <sup>a</sup>	5,44±0,316 <sup>a</sup>	*N.D.	4,58±0,006 <sup>a</sup>
Bebida láctea armazenada a 4°C por 7 dias						
0,0 %	81,35±0,120 <sup>a</sup>	0,67±0,020 <sup>d</sup>	2,78±0,115 <sup>c</sup>	2,31±0,180 <sup>d</sup>	3,6±0,00 <sup>d</sup>	4,32±0,020 <sup>b</sup>
1,0 %	78,50±0,087 <sup>b</sup>	0,69±0,010 <sup>c</sup>	2,55±0,121 <sup>d</sup>	3,42±0,180 <sup>c</sup>	5,0±0,00 <sup>c</sup>	4,35±0,000 <sup>b</sup>
3,0 %	76,86±0,364 <sup>c</sup>	0,75±0,010 <sup>b</sup>	3,33±0,153 <sup>b</sup>	4,23±0,100 <sup>b</sup>	9,0±0,00 <sup>b</sup>	4,35±0,006 <sup>b</sup>
5,0 %	75,78±0,407 <sup>d</sup>	0,80±0,021 <sup>a</sup>	5,02±0,053 <sup>a</sup>	5,05±0,163 <sup>a</sup>	16,0±0,00 <sup>a</sup>	4,38±0,006 <sup>a</sup>
Bebida láctea armazenada a 4°C por 14 dias						
0,0 %	80,95±0,220 <sup>a</sup>	0,68±0,020 <sup>b</sup>	2,80±0,115 <sup>c</sup>	2,38±0,180 <sup>c</sup>	*N.D.	4,11±0,020 <sup>c</sup>
1,0 %	78,43±0,235 <sup>b</sup>	0,70±0,020 <sup>b</sup>	2,13±0,025 <sup>d</sup>	3,64±0,300 <sup>b</sup>	*N.D.	4,11±0,006 <sup>c</sup>
3,0 %	77,34±0,125 <sup>b</sup>	0,76±0,026 <sup>ab</sup>	3,27±0,276 <sup>b</sup>	4,51±0,320 <sup>ab</sup>	*N.D.	4,15±0,006 <sup>b</sup>
5,0 %	77,03±1,244 <sup>b</sup>	0,80±0,035 <sup>a</sup>	4,03±0,145 <sup>a</sup>	3,87±0,217 <sup>a</sup>	*N.D.	4,19±0,006 <sup>a</sup>

Os resultados expressam a média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente pelo Teste Tukey ( $P > 0,05$ ). \*ND: Não determinado. \*\*Pa/s: Pascal por segundo.

Conforme mostra a Tabela 4 o teor de umidade nas 4 formulações da bebida (incluindo a bebida controle, ou seja, sem adição de chia) foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ), no produto recém-preparado e armazenado por 7 dias. A adição de chia em diferentes percentuais (0,0; 1,0; 3,0 e 5,0) na bebida láctea fermentada favoreceu uma redução no teor de umidade conforme aumento dos teores de sementes adicionados. Este fato poderia ser explicado pelo teor de umidade da chia ser muito baixo em relação ao soro de leite e ao leite, elevando o teor de sólidos totais na bebida láctea à medida que se eleva a proporção de chia.

No tempo de 14 dias não ocorreu diferença significativa entre as três formulações ( $p > 0,05$ ). Os valores de umidade permaneceram estáveis em função do tempo, não sendo observadas mudanças significativas entre os três períodos analisados. O fato de se obter um produto com menos umidade em relação à porcentagem de chia adicionada altera de forma positiva o perfil nutricional do produto, pois se eleva o teor de nutrientes, ou seja, quanto mais chia adicionada, menos umidade e maior nível de minerais, fibras, lipídeos e proteínas.

O aumento nos percentuais de chia, também contribuiu para o aumento dos teores de cinzas, sendo este gradual e significativo ( $p < 0,05$ ). A concentração de cinzas na semente da chia é maior que a do leite e do soro, provocando uma elevação no teor de cinzas da bebida e conseqüente aumento no teor de minerais. Não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) no teor de cinzas na bebida em função do tempo de estocagem.

O teor elevado de proteínas da chia (19,53%) em relação ao leite (4,53%) e ao soro (1,72%), conforme apresentado na Tabela 4, provocou um aumento considerável no teor de proteínas da bebida láctea, com diferença significativa entre as 4 formulações.

Este aumento mostra o potencial da chia como ingrediente melhorador do teor de proteínas em alimentos. Ferreira (2013) relatou um aumento no teor de proteínas em pães adicionados de chia em diferentes concentrações (3, 6 e 9%), obtendo valores médios de 8,76, 9,34 e 10,05%, respectivamente, quando comparados com a amostra padrão, que apresentou 8,19% de proteína. Ressalta-se ainda que todas as formulações apresentaram teores de proteína de origem láctea superior ao mínimo recomendado pela legislação para classificação de bebida láctea fermentada



com a adição (BRASIL, 2005), que estabelece um mínimo de 1,0 grama para cada 100 gramas da bebida.

Em relação ao teor lipídico, observou-se que a bebida láctea fermentada apresentou um aumento gradual no teor de lipídeos em função da porcentagem de chia adicionada (Tabela 4). A chia utilizada apresentou um teor de lipídeos de 25,43% (R1) e 19,43 (R2 e R3), conferindo à bebida teores lipídicos que variaram de 2,98 e 5,44 %, considerando que o ácido graxo predominante no óleo da chia é o ácido alfa-linolênico, da família dos ácidos graxos ômega 3, correspondente a um total de 60,35 a 64,35% do total de ácidos graxos (AYERZA e COATES, 2011). A semente de chia é uma fonte importante de ômega 3, e seu consumo atua na prevenção de doenças cardiovasculares, age na melhora da função endotelial, na diminuição da pressão arterial e na concentração de triglicérides, além de conferir efeitos antitrombóticos, antiateroscleróticos e antiinflamatórios (BARBOSA et al., 2007).

O potencial hidrogeniônico (pH) apresentou decréscimo nas formulações durante o tempo de armazenamento. Santo et al. (2010), em iogurte probiótico com diferentes micro-organismos, também observaram o mesmo fenômeno, diferente de Ramos et al. (2013) que não verificaram alterações do pH em bebidas lácteas fermentadas probióticas durante a estocagem por 28 dias. Nas formulações A e B o pH, que inicialmente estava em 4,59, diminuiu para 4,11 e 4,15, respectivamente, após 14 dias de fabricação. Na formulação C a variação foi de 4,58 a 4,19. Também ocorreram diferenças de pH entre as formulações a partir do sétimo dia de estocagem. Já no produto recém-preparado não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ).

Quanto à viscosidade, o valor na bebida sem adição de chia foi de 3,6 Pa/s a 22 rpm. Na amostra adicionada de 1,0% de chia a viscosidade aumentou para 5 Pa/s, seguido de um aumento para 9 e 16 Pa/s, nas amostras contendo 3,0 e 5,0% de chia, respectivamente. Não foi possível comparar os resultados da viscosidade aparente obtidos neste trabalho com a literatura, em virtude da ausência de trabalhos utilizando chia em bebidas lácteas e também pelo fato da viscosidade aparente mudar em função da temperatura e da rotação da sonda do viscosímetro. Porém, observou-se que a viscosidade da bebida é diretamente proporcional à concentração de chia adicionada, fenômeno este provocado pela presença de fibra

solúvel na semente, que ao se hidratar, diminui o conteúdo de água na fase líquida da bebida, e conseqüentemente aumenta a viscosidade aparente.

Comparando-se as formulações desenvolvidas neste estudo, constatou-se que as características favoráveis da bebida estão diretamente associadas com o aumento da porcentagem de chia adicionada, ou seja, quanto maior a quantidade de chia adicionada, melhor as propriedades nutricionais e funcionais do produto. Sendo assim, estes dados foram utilizados em consonância com os resultados da avaliação sensorial para a obtenção da melhor formulação da bebida láctea fermentada probiótica com adição de chia.

### 5.3 Avaliação das condições higiênico-sanitárias da fabricação da bebida

Com o objetivo de avaliar as condições higiênico-sanitárias da bebida láctea fermentada com adição de chia e garantir a segurança dos provadores na análise sensorial, foram realizadas as análises microbiológicas previstas pela RDC 12/2001 da ANVISA. A Tabela 5 apresenta os resultados das análises microbiológicas com seus respectivos limites de tolerância. Todos os resultados apresentaram-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação, indicando as condições adequadas da matéria-prima e do processo de elaboração da bebida, bem como possibilitando oferecer o produto de forma segura para os provadores participantes da análise sensorial.

**Tabela 5:** Avaliação da qualidade microbiológica da bebida láctea fermentada com adição de diferentes concentrações de chia recém-preparada.

Micro-organismo	Formulação A	Formulação B	Formulação C	Tolerância (BRASIL, 2001)
<i>Salmonella</i> sp.	Ausência	ausência	Ausência	Ausência
Coliformes 35°C	<3 NMP /mL	<3 NMP /mL	<3 NMP /mL	*N.C.
Coliformes 45°C	<3 NMP /mL	<3 NMP /mL	<3 NMP/mL	10 NMP/mL

\* N. C.: não consta.

## 5.4 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada durante o período de estocagem, nos tempos 0, 7 e 14 dias. Na primeira etapa houve a participação de 63 provadores, na segunda etapa 54 provadores e na terceira etapa 66 provadores. A Tabela 6 apresenta o perfil sensorial da bebida láctea fermentada adicionada de três concentrações diferentes de chia em relação ao tempo de estocagem a 4°C.

**Tabela 6:** Avaliação sensorial da bebida láctea fermentada adicionada de três concentrações diferentes de chia, em relação ao tempo de estocagem a 4°C.

Formulação	Escala hedônica (1 a 9) – aceitabilidade global			Intenção de consumo (1 a 7)		
	0 dias	7 dias	14 dias	0 dias	7 dias	14 dias
A	8,33±1,58 <sup>a AB</sup>	8,46±0,77 <sup>a A</sup>	7,94±1,36 <sup>a B</sup>	5,60±1,52 <sup>a B</sup>	6,24±1,11 <sup>a A</sup>	5,42±1,37 <sup>a B</sup>
B	8,32±0,81 <sup>a A</sup>	8,15±0,81 <sup>ab A</sup>	7,11±1,70 <sup>b B</sup>	5,87±1,25 <sup>a A</sup>	5,80±1,16 <sup>ab A</sup>	4,77±1,41 <sup>b B</sup>
C	8,21±1,11 <sup>a A</sup>	7,72±1,29 <sup>b B</sup>	6,64±1,61 <sup>b B</sup>	5,71±1,31 <sup>a A</sup>	5,31±1,43 <sup>b B</sup>	4,30±1,46 <sup>b C</sup>

Os resultados expressam a média ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais na mesma coluna e letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo Teste Tukey ( $P > 0,05$ ).

As 3 formulações tiveram boa aceitação por parte dos provadores, porém os resultados da análise sensorial foram influenciados pelo aspecto da bebida (Figura 5), que quanto maior o percentual de chia adicionado maior a viscosidade e menor as notas e a preferência. No produto recém-preparado (tempo zero) as notas da escala hedônica variaram de 8,21 a 8,33, ou seja, entre os termos gostei moderadamente e gostei extremamente, que seria o valor máximo. Após sete dias de armazenamento as notas continuaram muito próximas para as formulações A e B, enquanto que para a formulação C foi observada uma variação significativa ( $p < 0,05$ ).

em relação ao tempo 0, ficando em 7,72. No tempo 14 dias de estocagem a média das notas variou de 6,64 a 7,94.



**Figura 5:** Bebida láctea fermentada com chia, formulações A, B e C respectivamente.

Em relação ao tempo de estocagem, a formulação B não diferiu estatisticamente entre o produto recém-preparado e o armazenado por sete dias, mostrando estabilidade na aceitação da bebida ao longo deste período de armazenamento. Nas demais formulações, o período de estocagem apresentou diferenças na aceitação e intenção de consumo do produto. Observa-se que ocorreu uma avaliação positiva das bebidas, principalmente das formulações A e B, que obtiveram média das notas acima de sete até o fim do período de estocagem.

Com relação ao teste de ordenação de preferência (Tabela 7) na bebida recém preparada, para a definição da amostra preferida, a formulação A obteve um somatório de notas igual a 132, a amostra B 134 e a amostra C 118. A diferença entre a soma da ordenação das amostras A e B foi igual a 2, entre A e C igual a 3 e entre B e C igual a 16. Pela tabela de Newell e Mac Farlane, a diferença crítica entre os totais de ordenação no nível de 5%, para 63 notas e 3 amostras é de 26,6 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Pode-se concluir que não houve diferença significativa em relação à preferência entre as 3 formulações ( $p > 0,05$ ).

Após 7 dias de estocagem, formulação A obteve um somatório de notas igual a 149, a amostra B 100 e a amostra C 98. A diferença entre a soma da ordenação das amostras A e B foi igual a 49, entre A e C igual a 51 e entre B e C igual a 2. Pela tabela de Newell e Mac Farlane, a diferença crítica entre os totais de ordenação no nível de 5%, para 54 notas e 3 amostras é de 24,8 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ,

2008). A amostra A obteve a melhor pontuação e diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) da amostra B e da amostra C, e entre as amostras B e C não foi observada diferença significativamente ( $p > 0,05$ ), podendo-se afirmar que estatisticamente a formulação preferida no tempo 7 dias foi a formulação A.

No dia 14 de estocagem a formulação A obteve um somatório de notas igual a 163, a amostra B 126 e a amostra C 119. A diferença entre a soma da ordenação das amostras A e B foi igual a 37, entre A e C igual a 44 e entre B e C igual a 7. Pela tabela de Newell e Mac Farlane, conforme interpretação, a diferença mínima entre os totais de ordenação no nível de 5%, para 66 notas e 3 amostras é de 27,2 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Assim como no tempo 7 dias, a amostra A obteve a melhor pontuação e diferiu significativamente da amostra B e da amostra C ( $p < 0,05$ ). Entre as amostras B e C não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

Para a formulação mais rejeitada (Tabela 8), na bebida recém preparada, não houve diferença significativa entre as formulações. Após 7 dias, acentuou-se uma rejeição pela formulação C, que diferiu significativamente das formulações A e B. Esta rejeição foi observada também no final da terceira semana de estocagem.

**Tabela 7:** Teste de ordenação de preferência nos tempos 0, 7 e 14 dias – formulação preferida

Tempo (dias)	Provadores	A	B	C
0	63	132 <sup>a</sup>	134 <sup>a</sup>	118 <sup>a</sup>
7	54	149 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	98 <sup>b</sup>
14	66	163 <sup>a</sup>	126 <sup>b</sup>	119 <sup>b</sup>

Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente pela tabela de Newell e Mac Farlane ( $P > 0,05$ ).

**Tabela 8:** Teste de ordenação de preferência nos tempos 0, 7 e 14 dias – formulação mais rejeitada

Tempo (dias)	Provadores	A	B	C
0	63	125 <sup>a</sup>	129 <sup>a</sup>	119 <sup>a</sup>
7	54	94 <sup>a</sup>	94 <sup>b</sup>	30 <sup>b</sup>
14	66	110 <sup>a</sup>	124 <sup>b</sup>	162 <sup>b</sup>

Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente pela tabela de Newell e Mac Farlane ( $P > 0,05$ ).

Em consideração aos parâmetros físico-químicos e sensorial, constatou-se que: os teores de proteína, lipídeos e minerais das formulações de bebidas lácteas fermentadas desenvolvidas são diretamente proporcionais ao percentual de chia adicionado (1,0, 3,0 e 5,0%); a aceitação (sensorial) da bebida é inversamente proporcional à concentração de chia adicionada.

Após confrontar os resultados físico-químicos (teores de nutrientes) e sensoriais das três formulações, optou-se pela formulação B para a segunda fase do experimento, que consistiu em repetir a formulação mais duas vezes, nas mesmas condições e com matéria-prima e ingredientes de mesmo lote.

### 5.5 Repetição da formulação B – contagem de micro-organismos probióticos e pós-acidificação

Na segunda fase do experimento, a formulação B foi submetida à contagem de micro-organismos probióticos e à caracterização físico-química. Foi realizado também um acompanhamento da pós-acidificação do produto.

#### 5.5.1 Caracterização físico-química

A Tabela 9 apresenta o perfil físico-químico da formulação B e da formulação controle (sem adição de chia), ambas de amostras recém-preparadas.

**Tabela 9:** Teores de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos na formulação padrão e na bebida láctea com 3% de chia no tempo 0 nas três repetições

Tratamento	Umidade (%)	Cinzas (%)	Proteínas (%)	Lipídeos (%)
Controle	81,26±0,070 <sup>a</sup>	0,64±0,013 <sup>b</sup>	2,87±0,075 <sup>b</sup>	2,20±0,153 <sup>b</sup>
Bebida com chia	78,61±0,353 <sup>a</sup>	0,76±0,008 <sup>a</sup>	3,30±0,075 <sup>a</sup>	3,55±0,380 <sup>a</sup>

Controle: Bebida láctea fermentada sem adição de chia; Bebida láctea com chia: Bebida láctea fermentada com adição de 3,0% de chia. Os resultados expressam a média ± desvio padrão de duas

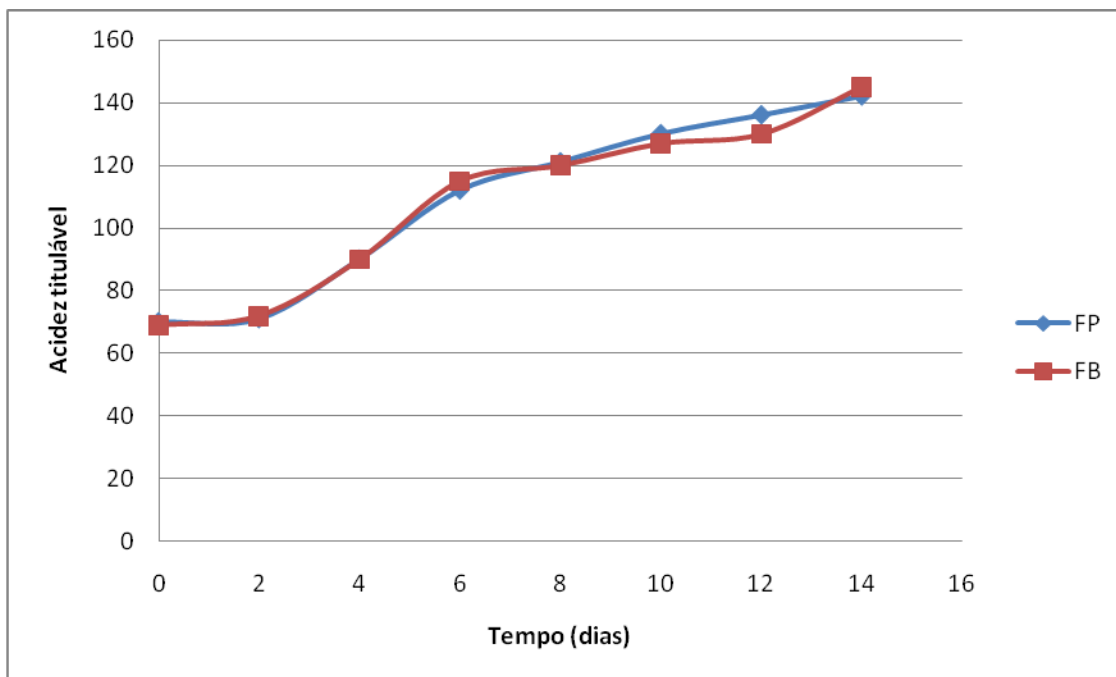
repetições. Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente pelo Teste Tukey ( $P > 0,05$ ).

Os resultados de cinzas, proteínas e lipídeos na amostra de bebida com 3% de chia foram significativamente maiores que na bebida controle. No que se refere às proteínas e lipídeos, a adição de semente de chia na bebida pode conferir um aumento no seu teor nutritivo, ao passo que maiores concentrações de cinzas sugerem um produto com maior fonte de minerais. Embora a umidade de 78,61% da bebida láctea com chia tenha sido inferior à umidade da bebida controle (81,26%), a diferença não foi significativa ( $p > 0,05$ ). A redução na umidade da bebida com chia pode estar associada à sua capacidade de hidratação, uma vez que MUÑOZ et al. (2011) relataram a absorção de 2,7 gramas de água a partir de 100 mg de mucilagem de chia.

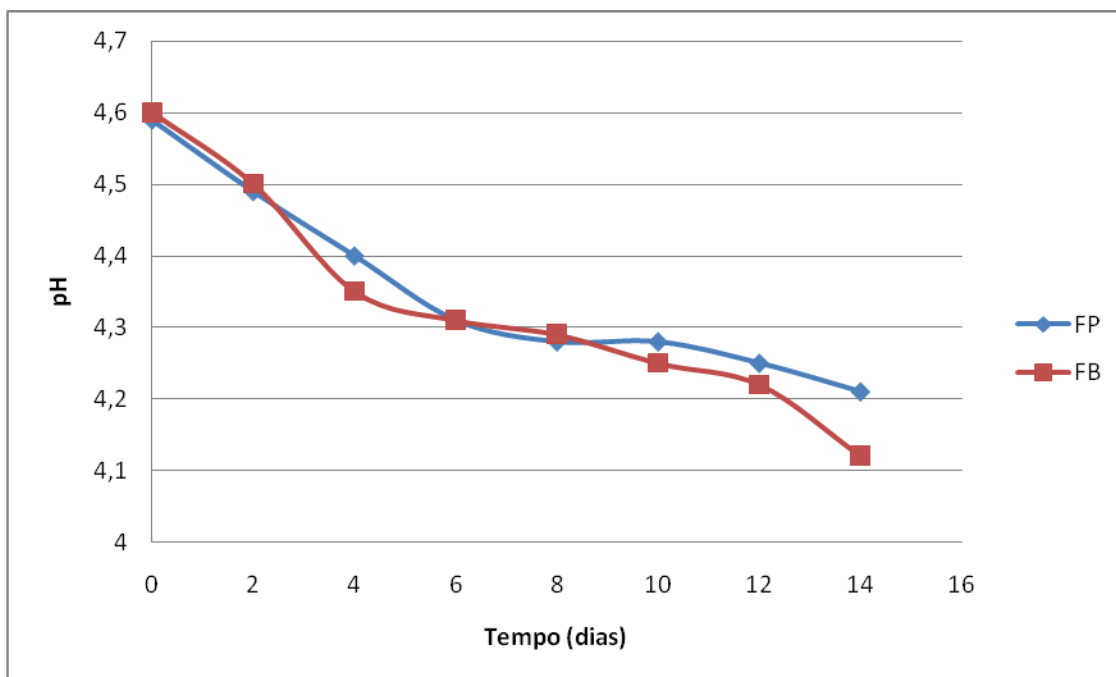
Contudo, ressaltam-se características bastante favoráveis à bebida láctea adicionada de semente de chia que, além de fornecer um produto mais nutritivo, sugere a possibilidade de conter ácidos graxos ômega-3, haja visto que a semente de chia pode possuir de 60,35 a 64,35% deste componente na composição lipídica (Ayerza e Coates, 2011).

#### 5.5.2 Pós-acidificação durante estocagem refrigerada por 14 dias

Os gráficos 1 e 2 apresentam o comportamento da acidez titulável e do pH respectivamente. A acidez titulável da bebida controle e da formulação B foi monitorada em intervalos de dois dias, durante 14 dias de estocagem a 4°C. Observou-se um aumento da acidez titulável (Gráfico 1) e diminuição do pH durante o período de estocagem tanto no controle quanto na formulação B (Gráfico 2). Na bebida recém preparada sem adição de chia, a acidez titulável evoluiu de 69°D para 143°D após 14 dias de fabricação. Na formulação com chia, no mesmo período, os valores de acidez titulável evoluíram de 69 para 145°D. Zacharchenco e Massaguer-Roig (2004), observaram fenômeno parecido em bebida láctea probiótica.



**Gráfico 1:** Comportamento da acidez titulável da bebida láctea fermentada com adição de 3% de chia (FB) e sem adição de chia (FP) durante 14 dias de estocagem a 4°C (média de 2 repetições).



**Gráfico 2:** Comportamento do pH da bebida láctea fermentada com adição de 3% de chia (FB) e sem adição de chia (FP) durante 14 dias de estocagem a 4°C (média de 2 repetições).



#### 4.5.3 Contagem de micro-organismos probióticos

A contagem dos micro-organismos probióticos (Tabela 10) foi realizada na formulação B (adicionada de 3,0% de chia) e na formulação padrão como controle (sem adição de chia) durante a segunda e terceira repetições do experimento. Observou-se um comportamento semelhante nas duas repetições. A contagem de *Lactobacillus acidophilus* e de Bifidobactérias sofreu influência em relação a proporção de chia adicionada, quando comparado com a bebida controle. Este fenômeno pode ser explicado pela presença de fibra solúvel na chia adicionada. Com relação ao tempo de estocagem, houve uma redução significativa de praticamente 1 ciclo logaritmo por semana na contagem total destes micro-organismos. Até o final da segunda semana de estocagem, em consideração a porções de 100 mL, a bebida atendeu a legislação da ANVISA, que preconiza o mínimo de  $10^8$  UFC do micro-organismo probiótico na quantidade diária ingerida.

Para Gomes e Malcata (1999), o controle da assepsia e adição de fatores promotores de crescimento são pré-requisitos para se obter altas contagens iniciais de células viáveis de probióticos, pois a velocidade de crescimento de outras bactérias lácticas é maior que de probióticos. Segundo Galinna et al. (2011), fatores como acidez, oxigênio dissolvido e interação entre espécies afetam a viabilidade dos probióticos. No fermento utilizado existe a presença de *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, uma das bactérias do iogurte, que produz ácido láctico durante a estocagem refrigerada (pós-acidificação), o que afeta, segundo Maganha (2010) a viabilidade das bactérias probióticas.

Dentre os motivos da diminuição da contagem de probióticos observados neste trabalho pode-se citar a pós-acidificação do produto, que foi significativa, bem como a temperatura de estocagem utilizada para a bebida, que foi de 4°C, interferindo assim na viabilidade das culturas lácticas. Sendo assim, sugere-se algumas alternativas para garantir o conceito de probiótico na bebida até 14 dias de estocagem, tais como: aumentar o inóculo inicial adicionado na bebida; estocagem da bebida em temperatura de 8°C; a utilização de culturas lácticas sem *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, que diminuiriam a acidificação da bebida durante o período de estocagem e conseqüentemente garantiriam maior viabilidade dos probióticos.

**Tabela 10:** Contagem de micro-organismos probióticos da bebida láctea fermentada durante período de estocagem a 4°C.

Tempo de Armazenamento (dias)	Contagem de probióticos (log UFC / mL)	
	<i>Lactobacillus</i> spp.	
	Formulação sem adição de chia	Formulação com 3% de chia
5	7,39 <sup>Aa</sup>	7,35 <sup>Ab</sup>
12	6,26 <sup>Bb</sup>	6,28 <sup>Ba</sup>
19	5,27 <sup>Ca</sup>	5,28 <sup>Ca</sup>
	<i>Bifidobacterium</i> spp.	
	Formulação sem adição de chia	Formulação com 3% de chia
5	7,20 <sup>Aa</sup>	7,19 <sup>Aa</sup>
12	6,06 <sup>Ab</sup>	6,07 <sup>Ab</sup>
19	5,05 <sup>Bc</sup>	5,19 <sup>Ac</sup>

Os resultados expressam o log de UFC / mL da média da contagem de seis valores, provenientes de duas repetições, cada uma em triplicata. Letras minúsculas iguais na mesma coluna e letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo Teste Tukey ( $p > 0,05$ ).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A formulação da bebida láctea fermentada com 1,0% (A) de chia foi a mais preferida no teste de ordenação de preferência e as formulações com 3 (B) e 3%(5) de chia não diferiram entre si. A formulação C foi a mais rejeitada, enquanto que as formulações A e B não apresentaram diferenças significativas no requisito formulação menos preferida;

A aceitação do produto diminuiu em relação ao tempo de estocagem e a porcentagem de chia adicionada, porém as notas apresentadas no teste de aceitação global demonstraram que o produto agradou sensorialmente nas 3 formulações e nos diferentes períodos analisados;

A adição de chia influenciou positivamente na contagem de micro-organismos probióticos;

A formulação B (3,0% de chia) mostrou-se como a melhor opção de formulação, por apresentar resultados satisfatórios para as análises físico-químicas e sensoriais;

Sugere-se para estudos posteriores a utilização de farinha de chia em comparação com a semente de chia, a determinação do perfil de ácidos graxos, aminoácidos e minerais e determinação do teor de fibras utilizando o método enzimático.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, K. E.; BONASSI, I. A.; ROÇA, R. O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de Queijo Minas Frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v 21, n 2, p. 187-192, 2001.
- ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. Barueri: Manole, 2003.
- ANTUNES, L. A. F. Microrganismos probióticos e alimentos funcionais. **Indústria de laticínios**. São Paulo, v 6, nº 34, p. 31, julho/agosto de 2001.
- AYERZA, R. COATES, W.. **Chia: rediscovering a forgotten crop of the Aztecs**. The University of Arizona Press, Tucson, AZ, USA , 2005.
- AYERZA, R.; COATES, W. Influence of environment on growing period and yield, protein, oil and  $\alpha$ -linolenic content of three chia (*Salvia hispanica* L.) selections. **Industrial Crops and Products**, v 30, n 2, p. 321-324, 2009.
- AYERZA, R.; COATES, W. Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). **Industrial Crops and Products**. v 34, n 2, p. 1366-1371, 2011.
- BAIRD, C. **Química ambiental**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2011.
- BARBOSA, K. B. F.; VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGHETA, P. C. Omega-3 and 6 fatty acids and implications on human health. **Nutrire**, v 32, n 2, p. 129-145, 2007.
- BORNEO, R.; AGUIRRE, A., LÉON, A. E. Chia (*Salvia hispanica* L) Gel can be used as egg or oil replacer in cake formulation. **Journal of the American Dietetic Association**, v 110, n 6, p. 946-949, 2010.
- BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. 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: 14/07/2012.
- BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012**. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/630a98804d7065b981f1e1c116238c3b/Resolucao+RDC+n.+54\\_2012.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/630a98804d7065b981f1e1c116238c3b/Resolucao+RDC+n.+54_2012.pdf?MOD=AJPERES)  
Acesso em: 15/05/2014

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº360, de 23 de dezembro de 2003. **Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados**. Brasília, 23 de dez. 2003. Disponível em: <[http://s.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1c2998004bc50d62a671ffbc0f9d5b29/RDC\\_N\\_360\\_DE\\_23\\_DE\\_DEZEMBRO\\_DE\\_2003.pdf?MOD=AJPERES](http://s.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1c2998004bc50d62a671ffbc0f9d5b29/RDC_N_360_DE_23_DE_DEZEMBRO_DE_2003.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 03/02/2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC n.º 2, de 7 de janeiro de 2002. **Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedade funcional e ou de saúde**. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02\\_02rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02_02rdc.htm)> Acesso em: 04/10/2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003**. Oficializar os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Brasília (DF); 2003. Diário Oficial da União. 2003 18 set.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº16, de 23 de Agosto de 2005. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea**. Disponível em: <[http://www3.servicos.ms.gov.br/iagro\\_ged/pdf/565\\_GED.pdf](http://www3.servicos.ms.gov.br/iagro_ged/pdf/565_GED.pdf)> Acesso em: 05/10/2012.

BRASIL. Resolução RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. **Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite UAT (UHT)**. Disponível em: <http://www.sfdk.com.br/imagens/lei/ma%20-%20portaria%20146.htm>. Acesso em: 05/01/2014.

CAPITANI, C. D.; PACHECO, M. T. B.; GUMERATO, H. F.; VITALI, A.; SCHMIDT, F. L. Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.11, p.1123-1128, nov. 2005.

CHAVES, A. H.; SILVA, J. F. C.; PINHEIRO, A. J. R.; CAMPOS, O, F; VALADARES FILHO, S. C. Isolamento de *Lactobacillus acidophilus* a Partir de Fezes de Bezerros. **Revista brasileira de zootecnia**, v 28, n 5, p 1086-1092, 1999.

CHR. HANSENS'S. **Nutrish Cultures**. Denmark: Chr. Hansen's Laboratorium.

COATES, W.; AYERZA, R. Production potential of chia in northwestern Argentina. **Industrial Crops and Products**, v 5, n 3,p. 229-233,1996.

CUNHA NETO, O. C.; OLIVEIRA, C. F.; HOTTA, R. M.; SOBRAL, P. J. A. Avaliação físico-química e sensorial do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo

diferentes níveis de gordura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v 25, n 3, p. 448-453, 2005.

DEWIT, J. N. **Functional Properties of Whey Proteins**. In: FOX, P. F. (Ed.). *Developments in Dairy Chemistry*, New York: Elsevier Applied Science, p 285–321, 1989.

DIPLOCK, A. T.; AGGETT, P. J.; ASHWELL, M.; BORNET, F.; FERN, E. B.; ROBERFROID, M. B. 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. **British Journal of Nutrition**, v 88, 1999.

FERNANDEZ, L. M. S.; CASTILLO, M. S. **Lactobacillus spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora**. Centro de Estudios Biotecnológicos. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”. Matanzas, Cuba. Disponível em: <<http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/libros/index/assoc/HASH011d/e18c5081.dir/doc.pdf>> Acesso em: 05/10/2012.

FERREIRA, T. R. B. **Caracterização nutricional e funcional da farinha de chia (*Salvia hispanica*) e sua aplicação no desenvolvimento de pães**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

FRANK, J.F.; YOUSEF, A.E. Tests for groups of microorganisms. In: WEHR, H.M. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, 17<sup>th</sup> ed. American Public Health Association, Washington, D.C., 2004. Chapter 8, p. 227-247, Section 8.071.

FUNKE, M. **Anvisa registra 91 alimentos funcionais em 2013**. Disponível em <[http://www.idisa.org.br/site/documento\\_10829\\_0\\_\\_anvisa-registra-91-alimentos-funcionais-em-2013.htm](http://www.idisa.org.br/site/documento_10829_0__anvisa-registra-91-alimentos-funcionais-em-2013.htm)>. Acesso em: 03/06/2014.

GALLINA, D. A.; ALVES, A. T. S.; TRENTO, F.; CARUSI, J. Caracterização de leites fermentados com e sem adição de probióticos e prebióticos e avaliação da viabilidade de bactérias lácticas e probióticas durante a vida-de-prateleira. **Revista UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v 13, n 4, 2011

GAVINI, F.; POURCHER, A. M.; BAHAKA, D.; FRENEY, J.; ROMOND, C.; IZARD, D. Le genre *Bifidobacterium*. Classification, identification, aspects critiques. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v 20, n 3, p 53-62, 1990.

GERHARDT, A.; MONTEIRO, B. W.; GENNARI, A.; LEHN, D. V.; SOUZA, C. Características físico-químicas e sensoriais de bebidas lácteas fermentadas utilizando soro de ricota e colágeno hidrolizado. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v 68, n 390, 2013.

GIROTO, J. M.; PAWLOWSKY, U. O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. **Brasil Alimentos**, v.2, n.5, p. 43-46, 2001

GOLDIN, B.R. Health benefits of probiotics. **British Journal of Nutrition.**, v.80, p. 203-207, 1998.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Boletim de Biotecnologia Alimentar**, n 64, p 12-22, 1999.

HALL, P.A.; LEDENBACH, L.; FLOWERS, R.S. Acid-producing microorganisms. In: DOWNES, F.P.; ITO K (eds.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4<sup>th</sup> ed. American Public Health Association, Washington, D.C., 2001. Chapter 19, p. 201-207.

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

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos São Paulo:** Instituto Adolfo Lutz, 2008.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microbial ecology of foods**. New York: Academic Press, v. 2, 1980. 997 p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganisms in foods: their significance and methods of enumeration**. University of Toronto Press, 1978. 434 p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO 5509). **Animal and vegetable fats and oils – Preparation of methyl esters of fatty acids**. International Organization for Standardization – ISO, 1-6, 1978.

IXTAINA, V. Y.; NOLASCO, S. M.; TOMÁS, M. C. Physical properties of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. **Industrial Crops and Products**, v 28, n 3, p. 286-293, 2008.

JIMENEZ, P. P.; MASSON L. S; QUITRAL V. R. Composición química de semillas de chía, linaza y rosa mosqueta y su aporte en ácidos grasos omega-3. **Revista chilena de nutrición**. v 40, n.2, p. 155-160, 2013.

KUEI-YING, L.; DANIEL, J. R.; WHISTLER, R. L. Structure of chia seed polysaccharide exudate. **Carbohydrate Polymers**, v 23, n 1, p. 13-18,1994

LEE, Y.K., NOMOTO, K., SALMINEN, S., GORBACH, S.L. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, 1999.211p.

LIMA, F. M.; BRUNINI, M. A; MACIEL JÚNIOR, V. A.; MORANDIN, C. de S.; RIBEIRO, C. T. Qualidade de leite UHT integral e desnatado, comercializado na cidade de São Joaquim da Barra, SP. **Nucleus Animalium**, v.1, n.1, maio de 2009.

LONNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **American Journal of Clinical Nutrition**, v 77, 2003.

MAGANHA, L. C. **Efeito da inclusão de leite em pó e açúcar sobre a viabilidade de bactérias probióticas em leite fermentado desnatado**. 2010. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e engenharia de alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v 19, n 6, p 761-770. 2006.

MARTINS, A. M. C. V.; ROSSI JUNIOR, O. D. , SALOTTI, B. M.; BÜRGER, K. P.; CORTEZ, A. L. L.; CARDOZO, M. V. Efeito do processamento UAT (Ultra Alta Temperatura) sobre as características físico-químicas do leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n. 2, p.295-298, 2008.

MILAGRES, M. P.; ABRANCHES, A.; DIAS, G.; ARAÚJO, M. M.; SILVA, M. O.; BRANDÃO, S. C. C. Estudo da viabilidade e desenvolvimento de uma bebida a base de soro de leite...In: **23º Congresso Nacional de Laticínios**, 2007, Juiz de Fora. Anais do 23º Congresso Nacional de Laticínios. Juiz de Fora: Instituto de Laticínios Candido Tostes, 2007, p.274-280.

MULLER, V. Alimentos funcionais. **Indústria de laticínios**, São Paulo, v 6, n 34, p. 20, julho/agosto de 2001.

MUÑOZ, L.A.; COBOS, A.; DIAZ, O.; AGUILERA, J.M. Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. **Journal of Food Engineering**, v 108, n. 1, p. 216-224, 2012.

OLIVEIRA, V. M. **Formulação de bebida láctea fermentada com diferentes concentrações de soro de queijo, enriquecida com ferro: caracterização físico-química, análises bacteriológicas e sensoriais**. 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2006.

PARK, K. J.; ANTONIO, G. C. **Análise de materiais biológicos**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Agrícola, 2006. Disponível em: <[http://www.feagri.unicamp.br/ctea/manuais/analise\\_matbiologic\\_o.pdf](http://www.feagri.unicamp.br/ctea/manuais/analise_matbiologic_o.pdf)> Acesso em: 05/10/2012.

PEIRETTI, P. G; GAI, F. Fatty acid and nutritive quality of chia (*Salvia hispanica L.*) seeds and plant during growth. **Animal Feed Science and Technology**, v.148, n 2–4, p 267-275, jan. 2009.

PENNINGS, B.; BOIRIE, Y; SENDEN, J. M.; GILSEN, A. P., KUIPERS, H.; VEN LOON L. J. Whey protein stimulates postprandial muscle protein accretion more effectively than do casein and casein hydrolysate in older men. **American Journal of Clinical Nutrition**, v 93, p 997-1005, 2011.



PERINI, J. Â. L.; STEVANATO, F. B.; SARGI, S. C.; VISENTAINER, J. E. L.; DALALIO, M. M. O. D.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Revista de Nutrição**, v 23, n 6 p. 1075-1086, 2010.

PIZZARRO, P. L.; ALMEIDA, E. L.; SAMMÁN, N. C.; CHANG, Y. K. Evaluation of whole chia (*Salvia hispanica L.*) flour and hydrogenated vegetable fat in pound cake. **Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 73-79, novembro de 2013.

RAMOS, A. C. S. M.; STANFORD, T. L. M.; MACHADO, E. C L; de LIMA, M. F. R. B.; GARCIA; E. F.; ANDRADE, S. A. C. A; da SILVA, C. G. M. Elaboração de bebidas lácteas fermentadas: aceitabilidade e viabilidade de culturas probióticas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 2817-2828, 2013.

REYES-CAUDILLO, E.; TECANTE, A.; VALDIVIA-LÓPEZ, M. A. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica L.*) seeds. **Food Chemistry**, v 107, n 10, p. 656-663, 2008.

SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**., v.8, p.341-347, 1998.

SABIONI, J. G. **Métodos de determinação de fibra dietética**. Curitiba: B. Ceppa, 1989.

SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, p.341-347, 1998.

SANTO, A. P. E.; SILVA, R. C.; SOARES, F. A. S. M.; ANJOS, D.; GIOIELLI, L. A.; OLIVEIRA, M. N. Açai pulp addition improves fatty acid profile and probiotic viability in yoghurt. **International Dairy Journal**, Barking, v. 20, n. 6, p. 415-422, 2010.

SANTOS, C. T.; COSTA, A. R.; FONTAN, G. C. R; FONTAN, R. C. I; BONOMO, R. C. F. Influência da concentração de soro na aceitação sensorial de bebida láctea fermentada com polpa de manga. **Alimentos e Nutrição**., v19, n 1, p. 55-60, jan./mar. 2008.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v 17, n 4, p. 397-409, 2004.

SGARBIERI, V. C.; PACHECO, M. T. B. Revisão: Alimentos Funcionais Fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**., v. 2, n. 1, p. 7-19, 1999.

SILVA, N. **Manual de métodos e análises microbiológicas de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Varela, 2007.

SILVA, F. L; FERREIRA, H. A.; CARVALHO, A.F.; PERRONE, I, T. Efeito do soro de leite no processo de concentração do doce de leite pastoso. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"** v 68, n. 394, p. 20-24, set/out., 2013

SILVA, E. N.; BARRETO, G. P.; SILVA, N. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobactérias e Bactérias Totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**., v 6, n 1, p 119-126, jan./jun., 2003.

SIMAS, K. N. **Resíduo do processamento da palmeira-real (*Archontophoenix alexandrae*) orgânica: caracterização físico-química, aplicação em biscoitos fibrosos sem glúten e avaliação sensorial pelo consumidor celíaco**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

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

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 147p.

TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L. M. Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v 60, n 1, p.243-250, 2008.

TRINDADE, M. C. **Estudo da recuperação de ácido láctico proveniente do soro de queijo pela técnica de membranas líquidas surfactantes**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v.10, p.271-275, 2000.

ZADOW, J.G. **Modern dairy technology: advances in milk processing**. London: Elsevier, v 2, 1997.

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**, v.24, n 4, 2004

Anexo A: Parecer consubstanciado

UNIVERSIDADE  
TECNOLÓGICA FEDERAL DO



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA PROBIÓTICA ADICIONADA DE CHIA (Salvia hispanica L). DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E AVALIAÇÃO SENSORIAL

**Pesquisador:** Kleber Marcos Zerbielli

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 15889313.9.0000.5547

**Instituição Proponente:** Universidade Tecnológica Federal do Paraná

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 392.800

**Data da Relatoria:** 12/09/2013

**Apresentação do Projeto:**

O projeto trata de uma bebida láctea que será produzida, com 60% de leite, 34% de soro e 6% de açúcar, de maneira que a base láctea mínima de 51% seja respeitada, adicionada de farinha de Chia (Salvia hispanica L). O produto será armazenado em garrafas de vidro de 500 ml e mantido sob refrigeração. As análises físico-químicas e microbiológicas serão realizadas no produto recém preparado. A análise sensorial e viabilidade das bactérias probióticas na bebida será realizada no produto recém preparado, após 7 e 14 dias. O teste sensorial será realizado utilizando 40 provadores não treinados por meio de testes hedônicos para os seguintes parâmetros: textura, cor, sabor, aceitação global e aparência com escala de 1 a 9 pontos, variando de gostei muitíssimo até desgostei muitíssimo; teste de ordenação de preferência e teste de intenção de consumo, conforme metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008).

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo geral da pesquisa é desenvolver uma bebida láctea fermentada probiótica com Lactobacillus acidophilus e Bifidobacterium adicionada de farinha de Chia (Salvia hispanica L). Especificamente, o proponente delinea os seguintes objetivos: (1) avaliar a qualidade

**Endereço:** SETE DE SETEMBRO 3165

**Bairro:** CENTRO

**CEP:** 80.230-901

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3310-4943

**E-mail:** coep@utfpr.edu.br

## Anexo A: Parecer consubstanciado

UNIVERSIDADE  
TECNOLÓGICA FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 392.800

microbiológica e físico-química do produto; (2) determinar a viabilidade das culturas probióticas de forma a atender a quantidade mínima na recomendação diária para o consumo; (3) observar o efeito de diferentes concentrações de farinha de chia na viscosidade do produto; (4) verificar o teor final de ácido alfa-linolênico; (5) avaliar a aceitação do produto com diferentes concentrações de farinha de chia (foco desta solicitação).

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Como riscos aos voluntários, o proponente indica apenas alergia a algum ingrediente empregado na formulação da bebida. Como benefícios diretos, não indica nenhum mas aponta para o benefício geral alcançado com a produção de um alimento funcional para a população, principalmente um alimento probiótico, ou seja, que contém microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto proposto tem relevância pois busca desenvolver um produto saudável e que auxilie na prevenção e combate de doenças. A pesquisa visa avaliar as principais características da bebida e sua qualidade, além de, nos ensaios in vivo, avaliar sua aceitação por parte dos consumidores, representados na pesquisa, pelos voluntários.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O projeto de pesquisa proposto atende ao que é exigido pela Resolução do CNS com relação à pesquisa com seres humanos. O proponente atendeu integralmente às recomendações elencadas no parecer anterior.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O proponente atendeu aos requisitos preconizados pelo CONEP para pesquisas com seres humanos. Portanto, somos favoráveis à aprovação do projeto.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do GFP:**

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como

Endereço: SETE DE SETEMBRO 3165

Bairro: CENTRO

CEP: 80.230-901

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3310-4943

E-mail: coop@utfpr.edu.br

## Anexo A: Parecer consubstanciado

UNIVERSIDADE  
TECNOLÓGICA FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 392.800

a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Sallentamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-UTFPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

CURITIBA, 12 de Setembro de 2013

---

**Assinador por:**  
**Thomaz Aurélio Pagioro**  
**(Coordenador)**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

**Título da pesquisa:** Bebida láctea fermentada probiótica adicionada de chia (*Salvia hispanica L*). Desenvolvimento, caracterização físico-química, microbiológica e avaliação sensorial.

**Pesquisador:** Kleber Marcos Zerbielli

**Endereço:** Rua Sete de Setembro, 706 – Clevelândia - PR

**Telefone:** (46) 3252-2644

**Professor orientador:** Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho

**Local de realização da pesquisa:** Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Francisco Beltrão

**Endereço:** Linha Santa Bárbara s/n CEP 85601-970 - Caixa Postal 135 - Francisco Beltrão - PR – Brasil

**Telefone :** (46) 3523-6370

**Critérios de inclusão**

- Idade superior a 20 anos;

**Critérios de exclusão**

- Provadores com idade inferior a 20 anos;
- Provadores acometidos de alguma doença infecto-contagiosa aparente
- Provadores com alergia ou intolerância a algum dos ingredientes : leite, soro lácteo, chia, corante carmim de cochonilha e aromatizante de morango

Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

## **A) INFORMAÇÕES AO PARTICIPANTE**

### **1. Apresentação da pesquisa.**

O estudo diz respeito ao desenvolvimento de uma bebida láctea probiótica com adição de chia.

### **2. Atendimento no caso de problemas durante e após a análise sensorial**

Caso necessário, o atendimento será no ambulatório da UTFPR Francisco Beltrão e no DIRPPG Francisco Beltrão

### **3. Benefício**

Ingestão de um alimento funcional

### **4. Garantia de confidencialidade**

As fichas de avaliação sensorial ficarão arquivadas na Coordenação do Mestrado em Tecnologia em Alimentos da UTFPR Francisco Beltrão até a data da defesa do projeto, sendo as mesmas inutilizadas após o término do mesmo.

### **5. Riscos**

Alergia a algum componente da formulação

### **6. Objetivos da pesquisa.**

Verificar o efeito da adição de chia nas características sensoriais, físico-químicas e microbiológicas de uma bebida láctea probiótica.

### **7. Participação na pesquisa.**

- Ao receber a amostra, prove-a, preenchendo na sequência a ficha da respectiva amostra.
- Antes de provar a amostra seguinte beba água.
- Para receber as amostras acenda a luz do painel.

### **8. Direito de sair da pesquisa e esclarecimentos durante o processo.**

Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O provador tem pleno direito de deixar o estudo a qualquer momento e também o direito a receber esclarecimentos em qualquer etapa da pesquisa, bem como liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem penalização.

### **9. Ressarcimento ou indenização**

No caso da necessidade de ressarcimento ou indenização decorrentes de problemas gerados durante o experimento, será acionada a instituição proponente, no caso a UTFPR Francisco Beltrão.

## **CONSENTIMENTO**

Eu declaro ter conhecimento das informações contidas neste documento e ter recebido respostas claras às minhas questões a propósito da minha participação direta (ou indireta) na pesquisa e, adicionalmente, declaro ter compreendido o objetivo, a natureza, os riscos e benefícios deste estudo.

Após reflexão e um tempo razoável, eu decidi, livre e voluntariamente, participar deste estudo. Estou consciente que posso deixar o projeto a qualquer momento, sem nenhum prejuízo.

Nome

completo: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Endereço: \_\_\_\_\_



\_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ Estado:

\_\_\_\_\_

Assinatura:

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

\_\_\_\_\_

Eu declaro ter apresentado o estudo, explicado seus objetivos, natureza, riscos e benefícios e ter respondido da melhor forma possível às questões formuladas.

Assinatura

pesquisador: Data: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

(ou seu representante)

Nome

completo: \_\_\_\_\_

Para todas as questões relativas ao estudo ou para se retirar do mesmo, poderão se comunicar com Kleber Marcos Zerbielli, via e-mail: [Kleber\\_zz@hotmail.com](mailto:Kleber_zz@hotmail.com) ou telefone: (46) 3252-2644 ou (46) 8403-2692.

**Endereço do Comitê de Ética em Pesquisa para recurso ou reclamações do sujeito pesquisado**

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEP/UTFPR)

REITORIA: Av. Sete de Setembro, 3165, Rebouças, CEP 80230-901, Curitiba-PR,  
telefone: 3310-4943, e-mail: coep@utfpr.edu.br

