

UFRRJ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

DISSERTAÇÃO

**BEBIDA LÁCTEA DE MAMÃO E LARANJA FERMENTADA COM
PROBIÓTICO E TRATADA POR ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA:
AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, SENSORIAL E MICROBIOLÓGICA**

MÁRCIO RODRIGUES DE ANDRADE

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**BEBIDA LÁCTEA DE MAMÃO E LARANJA FERMENTADA COM
PROBIÓTICO E TRATADA POR ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA:
AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, SENSORIAL E MICROBIOLÓGICA**

MÁRCIO RODRIGUES DE ANDRADE

Sob a Orientação do Professor

Dr. Amauri Rosenthal

e Co-orientação da Professora

Dra. Júlia Tiburski

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Tecnologia de Alimentos.

Seropédica, RJ
Junho de 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A553b Andrade, Márcio Rodrigues de, 1986-
Bebida láctea de mamão e laranja fermentada com
probiótico e tratada por alta pressão hidrostática:
Avaliação físico-química, sensorial e microbiológica /
Márcio Rodrigues de Andrade. - 2018.
87 f.: il.

Orientador: Amauri Rosenthal.

Coorientadora: Júlia Tiburski.

Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2018.

1. Bebida Láctea Fermentada. 2. Alimento Funcional. 3.
Probióticos. 4. Alta Pressão Hidrostática. 5. Tecnologia de
Alimentos. I. Rosenthal, Amauri, 1960-, orient. II. Tiburski,
Júlia, 1982-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

MÁRCIO RODRIGUES DE ANDRADE

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Tecnologia de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 07/06/2018

Amauri Rosenthal (D.Sc.) – Embrapa
(Orientador)

Rosa Helena Luchese (D.Sc.) – UFRRJ

Eduardo Henrique Miranda Walter (D.Sc.) - Embrapa

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Sandra, por estar comigo em todas as minhas escolhas, vibrando com o meu caminhar, alegrando os dias de incerteza, e eternizando os dias de felicidade. Me alegro em dizer, que todas as vitórias à senhora, com carinho entregue, e em troca recebo o sorriso e gratidão de quem comigo luta no dia a dia.

Ao meu pai, que em paz descansa, que me proveu os maiores dos ensinamentos. Ao meu amigo, agradeço por tudo que sempre abriu mão pelos meus sonhos.

Ao meu irmão, Fábio. Obrigado por sempre acreditar em minhas loucuras.

À Thayrine, sem você, não estaria aqui hoje. Por toda ajuda nos momentos duvidosos, por toda empatia com as minhas dificuldades, por todo o companheirismo e cumplicidade na execução desse projeto. Sua perspicácia por muitos dias tornaram os meus dias tranquilos. Agradeço de coração, com muito carinho e muito respeito a ti, que jamais hesitou em me ajudar. *“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante”*. Sorria!

Ao meu orientador Amauri Rosenthal e minha orientadora Julia Tiburski por todo aprendizado, pelos incentivos, pelos ensinamentos, pela confiança na minha capacidade e potencial para desenvolver esse projeto.

Ao Dr. Eduardo Miranda Walter, pelas inúmeras contribuições no desenvolvimento desse projeto e todos os esclarecimentos a respeito de microbiologia.

À querida Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) pela saudosa oportunidade de realização do curso de pós-graduação.

À Embrapa Agroindústria de Alimentos que desde da iniciação científica sempre me acolheu e permitiu que a realização desse projeto em suas dependências.

Aos colaboradores do laboratório de Microbiologia da Embrapa Agroindústria de Alimentos Simone, Adriano e Vanessa principalmente pela paciência, e por toda ajuda.

Aos colaboradores da Planta Piloto, Chorão, Filé e William por toda experiência compartilhada e cooperação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos colegas da pós-graduação, Rosiane, Fabíola, Fabiano, Prof. Otávio. O apoio de cada um de vocês permitiu que eu prosseguisse. Agradeço todos os conselhos, e sobretudo pelos infinitos incentivos.

À todas as pessoas que colaboraram diretamente e indiretamente para execução desse projeto.

RESUMO GERAL

ANDRADE, Márcio Rodrigues. **Bebida láctea de mamão e laranja fermentada com probiótico e tratada por alta pressão hidrostática: avaliação físico-química, sensorial e microbiológica** 2018. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Tecnologia de Alimentos) Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

O desenvolvimento de novos produtos funcionais se faz necessário frente ao crescimento da conscientização dos consumidores dos benefícios à saúde que tais produtos podem ofertar ao serem consumidos, exemplificados pelos alimentos probióticos. As bebidas lácteas são apreciadas por consumidores de diversas faixas etárias e, sendo assim, são de grande potencial para a inserção de produtos inovadores no mercado nacional. A tecnologia de alta pressão, quando comparada ao processamento térmico tradicional, elimina microrganismos deteriorantes e patogênicos e contribuem para a extensão da vida útil dos alimentos, sem comprometer características sensoriais dos alimentos. A perspectiva de adição de culturas probióticas tem por finalidade a melhoria das características funcionais, tornando as bebidas lácteas ainda mais atrativas e, por conseguinte, de maior valor agregado. O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de bebida láctea fermentada probiótica submetida ao tratamento por alta pressão hidrostática e avaliar comparativamente a utilização de conservante e do tratamento por alta pressão hidrostática na conservação microbiológica. As bebidas foram acrescidas de soro de leite, polpas de frutas pasteurizadas e cultura probiótica mista *Lactobacillus acidophilus* (LA-5), *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* (BB-12) e *Streptococcus thermophilus*. Foram avaliadas as características físico-químicas, microbiológicas das bebidas formuladas durante 35 dias de armazenamento a 5 ± 1 °C. Não foram detectados *Salmonella* sp/25g, *Staphylococcus* sp., Coliformes 35 °C, Coliformes 45°C e contagem de Fungos filamentosos e leveduras nas amostras. Após 35 dias de armazenamento, as bebidas pressurizadas a 100MPa/5min e 200MPa/5min mantiveram a enumeração de probióticos em níveis exigidos pela legislação. Para *Lactobacillus acidophilus* LA-5 ao longo do armazenamento houve uma inativação máxima de 3,49 log UFC/mL para 100MPa/5min e 3,60 log UFC/mL para 200MPa/5min. Já para *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, a redução máxima apresentada no estudo foi de 1,88 log UFC/mL para 100MPa/5min, 1,26 log UFC/mL para 200MPa/5min e 2,04 log UFC/mL para 300MPa/5min. Não foram constatadas diferenças significativas ($p > 0,05$) para as análises de umidade, cinzas, nitrogênio total, proteína, extrato etéreo e pH. O processo de alta pressão hidrostática exerceu a inibição de microrganismos deteriorantes em lácteos funcionais que utilizem culturas probióticas mistas e foi capaz de promover a viabilidade de probióticos ao longo do armazenamento refrigerado, resultando em bebidas lácteas potencialmente funcionais pressurizadas com características adequadas para suprirem as exigências legais e mercadológicas.

Palavras-chave: Bebida Láctea Fermentada, Probiótico, Alta Pressão Hidrostática.

GENERAL ABSTRACT

ANDRADE, Márcio Rodrigues. **Papaya and orange dairy drink fermented with probiotic and treated by high hydrostatic pressure: physical-chemical, sensory and microbiological evaluation** 2018. 87f. Dissertation (Master Science in Food Science and Technology, Food Science) Institute of Technology, Department of Food Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

The development of new functional products is necessary in the face of growing consumer awareness of the health benefits that these products can offer when consumed, exemplified by probiotic foods. The dairy drinks are appreciated by consumers of different age groups and, as such, have great potential for the insertion of innovative products in the national market. High pressure technology, when compared to traditional thermal processing, eliminates deteriorating and pathogenic microorganisms and contributes to extending the shelf life of food without compromising sensory characteristics of food. The aim of adding probiotic cultures is to improve functional characteristics, making milk beverages even more attractive and, therefore, of higher added value. The objective of this study was the development of probiotic fermented dairy beverage submitted to high hydrostatic pressure treatment and to evaluate the use of preservative and high hydrostatic pressure treatment in microbiological conservation. The drinks were supplemented with whey, pasteurized fruit pulps and mixed probiotic culture *Lactobacillus acidophilus* (LA-5), *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* (BB-12) and *Streptococcus thermophilus*. The physico-chemical and microbiological characteristics of the beverages formulated during 35 days of storage at 5 ± 1 °C were evaluated. No *Salmonella* sp / 25 g, *Staphylococcus* sp., Coliforms 35 ° C, Coliforms 45 ° C and Filamentous fungi count were detected. in the samples. After 35 days of storage, pressurized beverages at 100MPa / 5min and 200MPa / 5min maintained the enumeration of probiotics at levels required by legislation. For *Lactobacillus acidophilus* LA-5 throughout the storage there was a maximum inactivation of 3.49 log CFU / mL for 100MPa / 5min and 3.60 log CFU / mL for 200MPa / 5min. Already for *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, the maximum reduction presented in the study was 1.88 log CFU / mL for 100MPa / 5min, 1.26 log CFU / mL for 200MPa / 5min and 2.04 log CFU / mL for 300MPa / 5min. There were no significant differences ($p > 0.05$) for moisture, ash, total nitrogen, protein, ethereal extract and pH analyzes. The high hydrostatic pressure process inhibited deteriorating microorganisms in functional dairy products using mixed probiotic cultures and was able to promote the viability of probiotics throughout the refrigerated storage, resulting in pressurized potentially functional dairy beverages with characteristics adequate to meet the legal requirements and marketing.

Keywords: Fermented Milk Beverage, Probiotics, High Pressure Hydrostatic.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Produção de leite para os principais países e regiões.....	7
Figura 2. Potenciais mercados emergentes.....	10
Figura 3. Distribuição percentual da receita total em todo o mundo.....	11
Figura 4. Processamento de alimentos por alta pressão hidrostática.	14

CAPÍTULO II

Figura 1. Fluxograma para o preparo das bebidas.....	24
Figura 2. Mapa de Preferência Interno. Posicionamento das amostras de bebida láctea fermentada (a) e a posição dos avaliadores (b).....	30
Figura 3. Representação dos atributos do questionário CATA e dos efeitos na média de aceitação das amostras submetidas ao teste Q de Cochran.	32

CAPÍTULO III

Figura 1. Fluxograma para o preparo das bebidas.....	40
Figura 2. Perfil de proteínas em (g/100g) das bebidas lácteas fermentadas probióticas a base de laranja e mamão.....	48
Figura 3. Perfil de pH (a) e Perfil de Acidez Total (expresso em Ácido Lático em (g/100g) (b) das bebidas lácteas fermentadas armazenadas sob refrigeração a 5 ± 1 °C.....	49
Figura 4. Curva de fermentação (pH vs. tempo) da base láctea utilizada para produção das bebidas lácteas fermentadas adicionadas de cultura mista probiótica: <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> ; <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Streptococcus thermophilus</i>	50
Figura 5. Perfil de pH das amostras de bebida láctea fermentada armazenadas sob refrigeração a 5 ± 2 °C durante 35 dias.....	51
Figura 6. Ilustração das diferenças de coloração das amostras de bebidas lácteas fermentadas.....	53

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Formulações da bebida láctea fermentada sabor mamão e laranja.....	25
Tabela 2. Sobrevivência em UFC/mL de <i>Lactobacillus spp.</i> ao longo do armazenamento refrigerado a 5 ± 1 °C por 7 dias.....	27
Tabela 3. Enumeração de fungos filamentosos e leveduras, <i>Salmonella sp</i> (amostra composta), Estafilococos coagulase positiva e Coliformes 45 °C para as amostras de bebida láctea fermentada adicionada de cultura probiótica mista ABT-5.....	28
Tabela 4. Médias de aceitação [§] das amostras de Bebida Láctea Fermentada.	29
Tabela 5. Perfil sócio demográficos dos consumidores (%).	30
Tabela 6. Frequência (%) que cada um dos termos do questionário CATA que foi marcado para descrição sensorial das amostras de bebida láctea fermentada.....	31

CAPÍTULO III

Tabela 1. Design das seis amostras utilizadas no estudo.....	41
Tabela 2. Valores médios obtidos das análises de Umidade, Cinzas, Nitrogênio Total, Proteína e Extrato Etéreo das amostras Controle, Sorbato, 100MPa, 200MPa e 300MPa de bebida láctea fermentada após o primeiro dia de armazenamento a 5 ± 1 °C.....	46
Tabela 3. Acidez Total e pH das amostras Controle, Sorbato (0,03g/L), 100MPa/5min, 200MPa/5min e 300MPa/5min de bebida láctea fermentada após o primeiro dia de armazenamento a 5 ± 1 °C.....	49
Tabela 4. Análises instrumentais de cor nas amostras de Bebida Láctea Fermentada.....	52
Tabela 5. Resultados das análises microbiológicas de Fungos filamentosos e leveduras, Estafilococos coagulase positiva, Coliformes 35 °C, Coliformes 45 °C e <i>Salmonella sp.</i> , para as amostras de bebida láctea fermentada armazenadas durante 35 dias a 5 ± 1 °C	54
Tabela 6. Enumeração de probióticos das bebidas lácteas fermentadas durante o armazenamento refrigerado a 5 ± 1 °C por 35 dias	56
Tabela 7. Médias de aceitação [§] das amostras de Bebida Láctea Fermentada Probiótica.....	58
Tabela 8. Perfil sócio demográfico dos consumidores (%).....	58

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS E OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
Objetivos Gerais	3
Objetivos Específicos	3
CAPÍTULO I	4
1 INTRODUÇÃO	7
1.1 Probióticos e Bactérias Ácido Lácticas	8
1.2 Tecnologia de Alta Pressão	14
1.3 Alta Pressão em Produtos Funcionais	16
2 CONSIDERAÇÕES FINAIS	18
CAPÍTULO II	19
1 INTRODUÇÃO	22
2 MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1 Matérias-primas	24
2.1.1 Processo da bebida láctea	24
2.2 Análises Microbiológicas	25
2.3 Análise sensorial	26
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.1 Enumeração de <i>Lactobacillus</i> spp.	27
3.2 Perfil microbiológico deteriorante e patogênico	28
3.3 Caracterização sensorial	29
4 CONCLUSÕES	34
CAPÍTULO III	35
1 INTRODUÇÃO	38
2 MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1 Preparo das Bebidas Lácteas	40
2.2 Aplicação da Alta Pressão Hidrostática	41
2.3 Design experimental	41
2.4 Análises Físico-químicas	41
2.4.1 Umidade	41
2.4.2 Cinzas	42
2.4.3 Nitrogênio total	42
2.4.4 Extrato etéreo	43

2.4.5 pH.....	43
2.4.6 Acidez total.....	43
2.4.7 Análise Instrumental de Cor.....	43
2.5 Caracterização microbiológica e enumeração de probióticos.....	44
2.5.1 Preparo dos meios.....	44
2.5.2 Enumeração seletiva de <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5.....	44
2.5.3 Enumeração seletiva de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12.....	44
2.5.4 Enumeração seletiva de <i>Streptococcus thermophilus</i>	45
2.6 Análise sensorial.....	45
2.7 Análises estatísticas.....	45
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
3.1 Caracterização Físico-químicas.....	46
3.2 Análise instrumental de cor.....	52
3.3 Caracterização microbiológica e enumeração de probióticos.....	53
3.4 Teste de aceitação.....	58
4 CONCLUSÕES.....	59
CONCLUSÕES GERAIS.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

INTRODUÇÃO GERAL

Em busca de alimentos mais saudáveis, a população tem demandado produtos com melhor qualidade nutricional e funcional, que também promova satisfação ao paladar. As mudanças no estilo de vida, com afimco em práticas de atividades físicas, melhores dietas e significativo interesse na composição dos produtos alimentícios, têm impulsionado grande aplicação de recursos financeiros em pesquisas e desenvolvimento, por parte das indústrias de alimentos. Desse modo, a busca por inovação tem sido norteadada pelo desenvolvimento de novos produtos e processos para atender a tais exigências demandadas pelos consumidores.

As inovações em alimentos podem ocorrer em todas as etapas da cadeia alimentar, sem obrigatoriamente relacionar-se à exigência do lançamento de um novo produto no mercado. Portanto, o emprego de métodos emergentes de processamento pode contribuir para transformar um produto já estabelecido em um produto inovador, associado ao trinômio alimentação, saúde e tecnologia.

O desenvolvimento de alimentos funcionais tem crescido rapidamente devido à conscientização dos consumidores dos potenciais benefícios à saúde humana, tais como: diminuição do colesterol sérico, melhoria da constipação, melhoria da microbiota intestinal, estímulo da atividade antioxidante, controle da pressão arterial, entre outros. Produtos lácteos são bastante adequados como alimentos funcionais por apresentarem excelente valor nutricional, por serem amplamente consumidos e por serem potenciais matrizes para inoculação de microrganismos benéficos. Sendo assim, o foco de inúmeras pesquisas científicas tem sido a elaboração de produtos lácteos e estudo de suas funcionalidades quando acrescidos de probióticos. Salienta-se que existem no mercado diversos produtos probióticos, destacando-se os produtos lácteos, que se configuram nos mais populares entre os consumidores.

Por definição, probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Os probióticos, quando inoculados nos alimentos, devem resistir ao ambiente gástrico e assim como, permanecer viáveis em toda a extensão da vida útil dos alimentos.

As bebidas fermentadas enriquecidas com probióticos utilizam geralmente cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que devem manter suas funcionalidades ao longo de toda vida útil do produto. Fatores como pH, temperatura de armazenamento e ingredientes adicionados podem comprometer a viabilidade dos microrganismos inoculados na bebida. As proteínas do soro de leite presentes na elaboração de bebidas lácteas exercem maior tamponamento e tornam a reação de acidificação mais tardia, conferindo maior sobrevivência aos probióticos presentes. O emprego de métodos alternativos de processamento, em substituição ao tratamento térmico, pode também contribuir para evitar alterações indesejadas nos alimentos e a manutenção da qualidade elevada.

Dentre os métodos emergentes de processamento, a alta pressão é uma tecnologia não térmica utilizada pela indústria de alimentos que tem mostrado elevado potencial quando comparada a outros métodos alternativos de conservação. Pode ser aplicada em diversos produtos líquidos ou sólidos, incluindo produtos de frutas, produtos carnes e lácteos. Em leite, devido à inativação de células vegetativas, é possível a obtenção do produto pressurizado com qualidade microbiológica comparável ao pasteurizado, devido à possível sobrevivência de esporos bacterianos resistentes à pressão e de maior sobrevivência de parte da microbiota deteriorante, o produto não pode ser considerado estéril.

O processo de alta pressão consiste em submeter o alimento, sólido ou líquido, a altas pressões variando de 100 MPa a 1000 MPa, atingindo todo o produto homogeneamente, independente de forma e tamanho da amostra. Além disso, seu menor impacto nas características sensoriais dos alimentos remete a princípios de processamento mínimo, denotando em novas perspectivas para a indústria e para o consumidor. A combinação de

métodos de preservação, a perspectiva de desenvolvimento de alimento funcional, bem como o potencial inovador, incentivou a realização deste estudo, que tem como objetivo o processamento por alta pressão hidrostática de bebida láctea fermentada probiótica, e avaliá-la quanto aos aspectos microbiológicos, físico-químicos, sensoriais.

Essa dissertação está dividida em três capítulos, sendo o capítulo I o embasamento teórico sobre os benefícios da utilização da Alta Pressão Hidrostática no desenvolvimento de alimentos funcionais. O capítulo II aborda as modificações na metodologia de preparo da bebida láctea e a definição da formulação ideal com base na análise sensorial para o desenvolvimento da bebida láctea fermentada probiótica. Por sua vez, o capítulo III compara o uso do aditivo Sorbato de Potássio ao emprego da Alta Pressão Hidrostática na formulação definida no capítulo II. Capítulo I: A utilização da Alta Pressão Hidrostática em alimentos funcionais; Capítulo II: Bebida láctea fermentada: formulação, processo e potenciais benefícios e Capítulo III: Caracterização da Bebida láctea fermentada pressurizada adicionada de cultura mista probiótica em seus aspectos físico-químicos, microbiológicos e aceitação entre os consumidores.

OBJETIVOS E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivos Gerais

Desenvolvimento de bebida láctea fermentada probiótica e estudo comparativo dos efeitos da alta pressão hidrostática sobre as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do produto.

Objetivos Específicos

- Desenvolvimento de bebida láctea fermentada probiótica utilizando cultura mista ABT-5 (Christian Hansen);
- Caracterização físico-química e de aceitação sensorial das amostras de bebida láctea fermentada probiótica;
- Avaliação comparativa da utilização de conservante químico (Sorbato de potássio) e do tratamento por APH na conservação microbiológica da bebida láctea fermentada probiótica;
- Avaliação da viabilidade dos microrganismos probióticos nas bebidas lácteas formuladas, ao longo do armazenamento refrigerado.

CAPÍTULO I
UTILIZAÇÃO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA EM ALIMENTOS
FUNCIONAIS

RESUMO

Os produtos lácteos são matrizes tradicionais para inoculação de probióticos, além de serem apreciados pelos consumidores ao redor do mundo. Atualmente com o expoente crescimento da demanda por alimentos funcionais, as instituições de pesquisas e as indústrias tem direcionado seus recursos para inovação e desenvolvimento de produtos funcionais e seus impactos em dietas saudáveis. Impulsionado pela conscientização dos benefícios promovidos pelos alimentos funcionais, e compreensão por parte do consumidor da relação entre dieta e saúde, o mercado de alimentos funcionais apresentou significativo crescimento na última década. Alimentos funcionais acrescidos de probióticos, como bebida lácteas, devem garantir benefícios à saúde quando consumidos. Desse modo, devem apresentar microrganismos probióticos viáveis em número suficiente, no momento do consumo. A utilização de soro de leite, nas formulações das bebidas lácteas, consiste na racionalidade do reaproveitamento do resíduo das indústrias de laticínios, e melhoria das características nutricionais dos produtos. A tecnologia de Alta Pressão Hidrostática com efeitos adversos mínimos em alimentos, tem demonstrado êxito na sua aplicabilidade no desenvolvimento de produtos, assim como na extensão da vida útil e controle microbiológico de microrganismos deteriorantes e patogênicos favorecendo a incorporação de cepas probióticas nos alimentos. Essa revisão conduz ao cenário atual de alimentos funcionais, as características de microrganismos probióticos e seus benefícios quando inoculados em alimentos, retratando ainda, a utilização da tecnologia de Alta Pressão Hidrostática em produtos funcionais e suas potencialidades de aplicação.

Palavras-chave: Bebida Láctea, Alta Pressão Hidrostática, Alimentos Funcionais.

ABSTRACT

Dairy products are traditional arrays for inoculation of probiotics, as well as being enjoyed by consumers around the world. Nowadays with the exponent growing demand for functional foods, research institutions and industries have directed their resources to innovation and development of functional products and their impacts on healthy diets. Driven by awareness of the benefits promoted by functional foods, and consumer understanding of the relationship between diet and health, the functional food market has shown significant growth over the last decade. Functional foods plus probiotics, such as dairy drinks, should ensure health benefits when consumed. They must therefore present viable probiotic microorganisms in sufficient numbers at the time of consumption. The use of whey in formulations of dairy drinks consists of the rational use of the waste from the dairy industry and the improvement of the nutritional characteristics of the products. High-pressure hydrostatic technology with minimal adverse effects on food has been successful in its applicability in product development, as well as the extension of shelf life and microbiological control of deteriorating and pathogenic microorganisms favoring the incorporation of probiotic strains in food. This review leads to the current scenario of functional foods, the characteristics of probiotic microorganisms and their benefits when inoculated in foods, and the use of high pressure hydrostatic technology in functional products and their application potentialities.

Keywords: Milk Beverage, High Hydrostatic Pressure, Functional Foods.

1. INTRODUÇÃO

No período de 2013-2015, de acordo com os dados da Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico OECD/FAO (2016), a União Europeia produziu 158 milhões de toneladas de leite, sendo a maior produtora, seguida pela Índia, com 141 milhões de toneladas, e pelos Estados Unidos, com 93 milhões de toneladas. O Brasil, com 29 milhões de toneladas, figurava como o sétimo maior produtor (Figura 1).

As projeções para 2025 indicavam a Índia como o maior produtor mundial, com 206 milhões de toneladas produzidas, ultrapassando a União Europeia, com os Estados Unidos permanecendo como terceiro maior produtor. O Brasil, passaria a sexto lugar, com 39 milhões de toneladas produzidas, ultrapassando a Rússia (OECD/FAO, 2016).

A maior parte do consumo de leite e produtos lácteos estava na forma de lácteos frescos, ocupando cerca de 52% da produção total de leite do mundo. Há perspectiva de certo crescimento para 54% nos próximos anos, devido ao aumento da produção de leite nos países em desenvolvimento. Esperava-se um aumento de 2,9% por ano no consumo total de produtos lácteos frescos nos países em desenvolvimento (OECD/FAO, 2016).

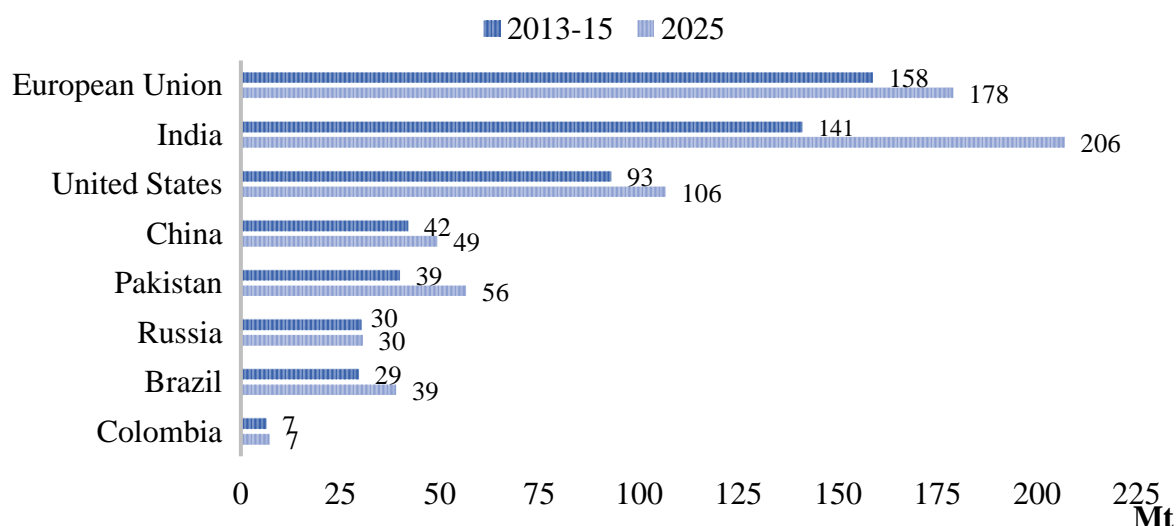


Figura 1. Produção de leite para os principais países e regiões OECD/FAO (2016).

Frente ao exposto, ficava evidente a potencialidade do mercado de lácteos, nos dias atuais e na próxima década, a despeito das quedas dos preços dos produtos lácteos em 2014-2015, resultante da queda da demanda global e aumento da produção mundial. Dentro do mesmo horizonte de 10 anos, esperava-se pouco aumento nos preços dos produtos lácteos (OECD/FAO, 2016). Produtos lácteos são considerados um grupo de alimentos básicos, sendo o seu consumo associado à uma melhor qualidade da dieta (HEANEY, 2013). São uma parte essencial de recomendações das dietas em todo o mundo e muitos países recomendam 3 ou mais produtos lácteos por dia em suas orientações dietéticas (VAN HOOIJDONK e HETTINGA, 2015).

A busca do consumidor brasileiro por produtos mais saudáveis, inovadores, seguros e de prática utilização, aliada à consolidação dos produtos no mercado, contribuíram para o crescimento da indústria de bebidas lácteas, fazendo com que estas ganhassem popularidade (LIMA et al., 2002).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Instrução Normativa 16, de 23 de agosto de 2005, entende-se por bebida láctea:

“O produto lácteo resultante da mistura do leite (*in natura*, pasteurizado, esterilizado, UHT, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado e em pó), adicionado ou não de produto(s) ou substância(s) alimentícia(s), gordura vegetal, leite(s) fermentado(s), fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos. A base láctea representa pelo menos 51% (cinquenta e um por cento) massa/massa (m/m) do total de ingredientes do produto, fermentado mediante a ação de cultivo de microrganismos específicos e/ou adicionado de leite(s) fermentado(s), e que não poderá ser submetido a tratamento térmico após a fermentação. A contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g no produto final, para o(s) cultivo(s) láctico(s) específico(s) empregado(s), durante todo o prazo de validade. A bebida láctea pode ser sem adição de produtos ou substâncias alimentícias, pode ser submetida a tratamento térmico – pasteurização lenta de 62 a 65° C por 30 minutos e pasteurização de curta duração de 72 a 75° C, durante 15 a 20 segundos. Assim como, a bebida láctea pasteurizada pode ser ou não acrescida de produtos ou substâncias alimentícias e, por fim, pode ser submetida ao processo de esterilização obedecendo a diferentes faixas de tempo e temperatura, respeitando a embalagem do produto” (BRASIL, 2005).

A regulamentação brasileira não disserta sobre o uso de métodos alternativos de conservação aos quais as bebidas lácteas podem ser submetidas, sendo utilizada apenas a menção ‘tratamento térmico’ que remete normalmente à aplicação de pasteurização (térmica).

Além de apresentarem alta aceitabilidade, as bebidas lácteas constituem-se em uma utilização racional e lógica de reaproveitamento do soro de queijo, que é um dos resíduos com maior capacidade poluente na indústria. Sendo assim, produzir bebidas lácteas significa converter resíduos em produtos de alto valor agregado, evitando desperdícios nutricionais e financeiros, além de impactos ambientais relevantes, já que possui alto teor de material orgânico (DE MORAIS et al., 2014). Para atender aos novos parâmetros exigidos pelos consumidores por alimentos seguros e funcionais, a demanda por bebidas lácteas e probióticas nos próximos anos será crescente (YERLIKAYA, 2014; KANDYLIS et al., 2016). Bebidas lácteas adicionadas de suco de frutas se destacam como novos produtos de excelente aceitação entre os consumidores devido às suas características nutricionais e sensoriais. Mesmo as diferentes matrizes, tais como leite integral, leite desnatado e outras não lácteas como ‘leite’ de soja, formam ambientes distintos para componentes bioativos das frutas e desempenham um papel importante na liberação e absorção dos nutrientes, tais como tocoferóis, carotenoides e ácido ascórbico (CILLA, ANTONIO et al., 2012; RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2013; HE et al., 2016; SHORI, 2016).

1.1 Probióticos e Bactérias Ácido Lácticas

Em 2001, a Organização Mundial de Saúde (OMS), em conjunto com Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), estabeleceu a seguinte definição para probióticos: “São microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (FAO, 2001), sendo esse o conceito internacional comumente adotado por órgão normatizadores, indústrias e instituições de pesquisas.

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 2, de 07 de janeiro de 2002, define probióticos como “microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo” (BRASIL, 2002). Para que um alimento seja considerado probiótico, foi estabelecido que a quantidade mínima viável de microrganismos probióticos deve-se encontrar na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de

Colônias (UFC), na recomendação de porção diária do produto pronto. Já para o consumo em 100 g do alimento, deve apresentar 10^6 a 10^7 UFC/g de probióticos viáveis. Valores menores podem ser aceitos, desde que comprovados a sua eficácia (BRASIL, 2008).

Os alimentos com probióticos, podem ser classificados como uma classe de alimentos funcionais. Os alimentos funcionais são considerados aqueles que produzem efeitos benéficos à saúde, além das suas funções nutricionais básicas. Os objetivos dos alimentos funcionais são múltiplos: eles melhoram as condições gerais do corpo, como propiciados por alimentos com prebióticos e probióticos; diminuem o risco de algumas doenças, como produtos que reduzem o colesterol (MENRAD, 2003; MARK-HERBERT, 2004; SIDE, 2006; BIGLIARDI E GALATI, 2013), entre outros. O termo “alimento funcional” foi utilizado pela primeira vez no Japão em 1984, resultado de estudos sobre as relações nas diversas áreas da nutrição, sensorial, fortificação e modulação de sistemas fisiológicos (HARDY, 2000; KWAK e JUKES, 2001; BIGLIARDI e GALATI, 2013). Os lácteos funcionais tornaram-se populares após a resposta positiva que o leite fermentado teve no Japão. Na década de 1930, uma pesquisa realizada pelo Dr. Minora Shiroda sobre mortalidade infantil causada por infecção intestinal e desnutrição levou-o a descobrir um microrganismo, que ele chamou de *Lactobacillus casei Shiota*. O microrganismo pode sobreviver no intestino humano e inibir a desequilíbrio em sua microbiota. *Lactobacillus casei Shiota* tornou-se a base para a produção do primeiro alimento funcional artificial em 1935, marca nomeada Yakult. Nas décadas de 1960 e 1970, a produção de Yakult alcançou outros seis países na Ásia e no Brasil, como resultado de sua grande comunidade japonesa (YAKULT, 2011; ALMEIDA et al., 2014). Com uma comunidade japonesa menor, a Europa viu a introdução da Yakult apenas em 1993, na esteira de dietas mais saudáveis (RAUD, 2009). Essa mudança no conjunto institucional europeu levou empresários incumbidos a rever suas imagens do mercado de iogurte na Europa Ocidental. Oportunidades produtivas foram previstas e os produtores de laticínios lançaram seus produtos baseados no *Lactobacillus casei* em 1994. Eles pareciam conscientes de que as propriedades funcionais poderiam ser um recurso para incrementar os produtos lácteos. Naquele ano, a Danone lançou a Actimel no Reino Unido (e em outros países europeus com outras marcas), seu primeiro iogurte com o que inicialmente chamaram de *Lactobacillus casei* Defensis. Sua principal intenção era “tornar a Actimel sinônimo de 'defesa natural'” (MELLENTIN, 2007; ALMEIDA et al., 2014) e mudar seu significado geral para um significado específico e favorável dentro do seu conjunto institucional (MAGUIRE e HARDY, 2009).

O aumento do mercado de alimentos funcionais deve-se principalmente a uma série de modificações comportamentais e críticas relacionadas a saúde pessoal. De acordo com uma pesquisa da Euromonitor, o Japão era o maior mercado mundial, seguido pelos EUA, enquanto o mercado europeu ainda parecia estar menos desenvolvido. Estes três mercados dominantes contribuíam em mais de 90% das vendas totais de alimentos funcionais (BENKOUIDER, 2005). O mercado mundial de bebidas e alimentos funcionais teve um crescimento de U\$33 bilhões no ano 2000 para U\$176,7 bilhões em 2013 (GRANATO et al., 2010; HENNESSY, 2013). Vicentini et al. (2016) sugerem que o mercado de alimentos funcionais é muito complexo, pois há muitos fatores que afetam a indústria. Em geral, a Figura 2, apresenta um gráfico com as potencialidades das principais áreas em termos de investimentos. Brasil, China, Índia, Leste e Sudeste da Ásia são as regiões mais atraentes do ponto de vista de crescimento. São países com economias competitivas. Outras áreas em desenvolvimento, que são o Oriente Médio e o Norte da África, são menos atraentes devido ao maior risco.

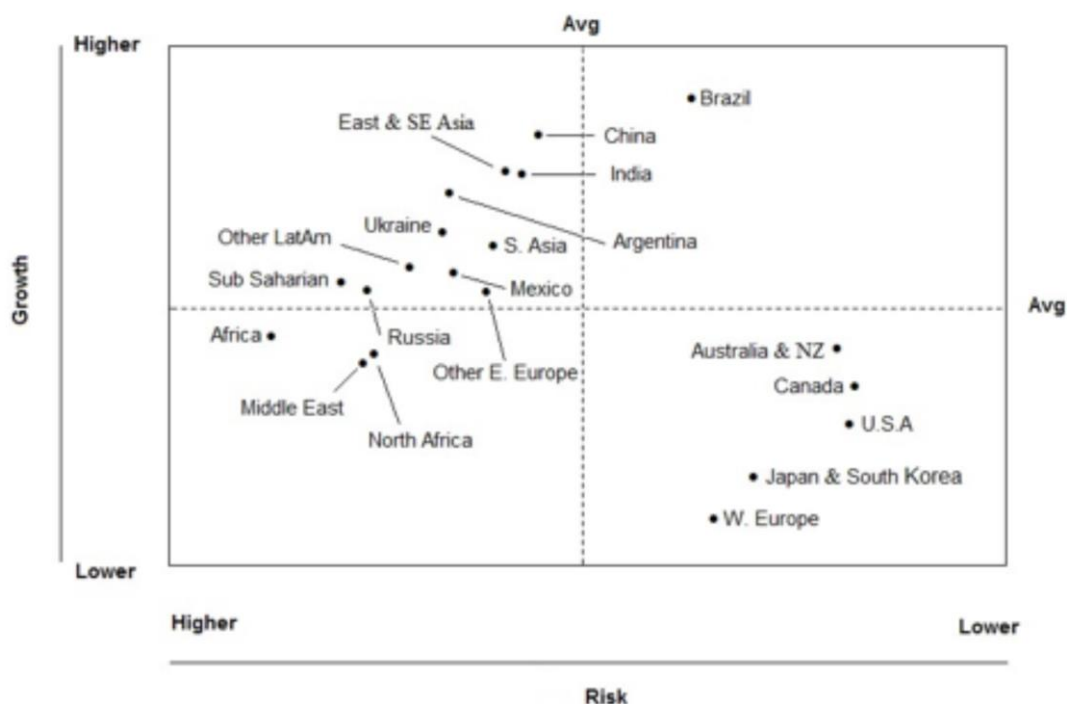


Figura 2. Potenciais mercados emergentes – Brasil, China, Índia e Sudeste Asiático são os mais atraentes (MCKINSEY, 2012).

O mercado de alimentos funcionais está crescendo rapidamente e é altamente dinâmico (BECH-LARSEN e SCHOLDERER, 2007). Williams et al. (2006) sugerem que a demanda por alimentos funcionais dentro dos países em desenvolvimento está crescendo, apresentando uma oportunidade lucrativa de desenvolver mercados domésticos. O aumento da expectativa de vida, resultando no aumento do número de idosos e o desejo de melhorar a qualidade de vida, assim como o aumento dos custos com a saúde, tem estimulado governos, pesquisadores, profissionais de saúde e a indústria de alimentos a estudar como essas mudanças podem ser gerenciadas de forma mais eficaz (VICENTINI et al., 2016). Na América Latina, os alimentos funcionais e a produção de alimentos são relativamente “novos”, mas muito promissores. De fato, como pode ser visto na Figura 3, as receitas para este setor são realmente altas. Considerando, que a comercialização de alimentos funcionais na América do Sul começou muito recentemente e que as receitas para o campo de alimentos funcionais representam atualmente 17% da receita total. Em todo o mundo, pode-se dizer que a América Latina é um mercado no qual o investimento em alimentos funcionais deve continuar (VICENTINI et al., 2016).

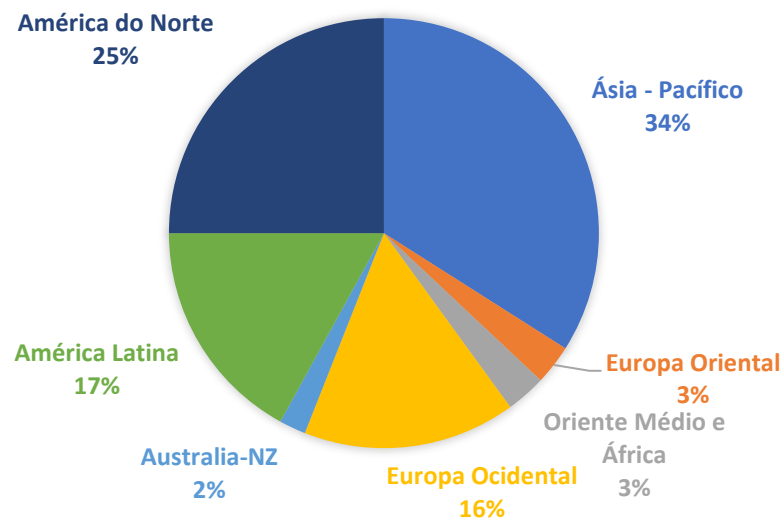


Figura 3. Distribuição percentual da receita total em todo o mundo (EUROMONITOR, 2013).

Para os mercados emergentes, há muitas oportunidades de investimento em alimentos funcionais. Estima-se um crescimento absoluto de US\$ 23 bilhões até 2017, 40% a mais do que a previsão de crescimento para os mercados desenvolvidos. No estudo de mercado de alimentos funcionais, maior atenção tem sido dada a dois grandes países: Brasil e México. Suas condições socioeconômicas favoráveis atraíram empresas que buscaram investir em alimentos funcionais. O Brasil é um dos países líderes na produção e consumo de alimentos, com um mercado de alimentos funcionais crescendo 10% ao ano, três vezes mais que o mercado de alimentos convencionais (VICENTINI et al., 2016).

O mercado brasileiro de iogurtes funcionais cresceu cerca de 40% ao ano desde 2004 (ABRAS, 2009). Entre seus participantes, existem atualmente quatro grandes instituições que merecem destaque. A primeira é a Companhia Danone, empresa francesa que detém quase 90% do mercado (ABRAS, 2009). O segundo é a empresa suíça Nestlé e a terceira é a empresa brasileira Batavo. O quarto ator relevante é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Em termos gerais, a Anvisa desempenha um papel similar ao FDA nos EUA, apenas com um orçamento de cerca de 4% de sua agência irmã norte-americana (ANVISA, 2012).

Em 2002, a Batavo lança o iogurte funcional BioFibras (AZEDO, 2007). O BioFibras tinha bactérias e adicionava fibras em suas fórmulas, mas seu marketing enfatizava apenas a funcionalidade das fibras. Este atributo pode ser facilmente encontrado em outros produtos e, aparentemente, não abriu novos caminhos diante dos consumidores (ALMEIDA et al., 2014). O nome de marca escolhido pela Danone para o Brasil foi DanRegularis. “Dan” refere-se claramente à empresa que produz o iogurte, criando uma associação fácil para os consumidores. Assim, uma estratégia da Danone na promoção de seu iogurte funcional foi: “Activia Danone, a única com DanRegularis”. “Regularis” destaca o atributo funcional reivindicado para o iogurte, lembrando aos consumidores o benefício que podem obter com o produto (ALMEIDA et al., 2014). A Nestlé entra no mercado nacional em 2006, com o lançamento do Nesvita, apesar das semelhanças na publicidade com o Activa, a empresa suíça não conseguiu ameaçar o poder de mercado da Danone (ALMEIDA et al., 2014). A UP alimentos, *jointventure* entre Unilever e Perdigão, criada há quase dois anos, coloca no mercado dois lácteos funcionais com

a marca Becel Pro.Activ: são o iogurte e a bebida láctea, ambos com fitoesteróis. Já a Bertin, que em 2007 entrou em lácteos com a compra da Vigor, lança o Lactive, um iogurte probiótico que contém *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que auxiliam o funcionamento da flora intestinal. Por sua vez, a Itambé também lança no mercado o iogurte Plenus, contendo *Bifidobacterium lactis* e o *Lactobacillus acidophilus* (MILKPOINT, 2009). Tanto Vigor quanto Itambé almejam o mesmo público da francesa Danone, com o Activia, que responde por quase 90% da venda de iogurtes funcionais no Brasil. Com o Lactive, a meta da Bertin é ocupar a segunda posição entre os iogurtes funcionais dentro de três anos. Com isso, o Lactive teria que tirar não só mercado do Activia, como também dos produtos da Nestlé (Nesvita e Mólico ActiFibras) e da Batavo (Biofibras), que já disputam o segmento no Brasil. E para isso ele aposta no preço: o Lactive chega com preço em média 10% menor que o rival Activia (MILKPOINT, 2009). Preponderante no mercado de lácteos funcionais, a Danone observa o lançamento de novos produtos no mercado brasileiro. A Vigor e a Cooperativa Central Aurora Alimentos buscam rivalizar com a com a marca Activia, de modo a captar consumidores preocupados com a saudabilidade além das propriedades nutricionais natural dos laticínios (ÉPOCA, 2015).

De importante aposta da Vigor, os investimentos para a sedimentação da sua marca Lactive juntamente com a reformulação do seu mix de produtos, a empresa prossegue em sua estratégia de produtos funcionais, de maior valor agregado, objetivando ampliar suas margens de rentabilidade (ÉPOCA, 2015). A Aurora, em outubro de 2015 lançou o sabor morango em sua linha Bio Equilíbrio. O produto é adicionado de fibras e se destina a um público extenso, que opta por produtos funcionais (ÉPOCA, 2015). Tais investimentos se baseiam na expectativa de que o consumo de lácteos funcionais ainda tem espaço para avançar no Brasil, embora a crise econômica seja um desafio (ÉPOCA, 2015).

O mercado probiótico permanecia, em 2016, principalmente composto de produtos à base de leite e, afim de atingir-se uma maior parte dos consumidores, deve ser expandido para além do nicho de alimentos lácteos (KANDYLIS et al., 2016). A demanda por alimentos probióticos tem crescido rapidamente, alinhado com a mudança do comportamento do consumidor em relação à escolha dos alimentos, devido a maior compreensão da relação entre dieta e saúde (SHORI, 2016). Os alimentos não mais se destinam apenas a satisfazer a fome e fornecerem os nutrientes necessários, mas também para prevenir doenças relacionadas à alimentação. O avanço dos produtos alimentícios agora é direcionado para assegurar benefícios funcionais e nutricionais específicos (BETORET et al., 2015). Desse modo, os alimentos probióticos devem possuir microrganismos probióticos viáveis em número suficiente, no momento do consumo, para poderem promover os efeitos benéficos, além de serem seguros ao consumidor (TRIPATHI e GIRI, 2014; KANDYLIS et al., 2016).

A digestão gastrointestinal submete os microrganismos probióticos a enzimas, pH e sais biliares (ABADÍA-GARCÍA et al., 2013). Além das condições de crescimento ofertadas pela matriz onde a cepa é inoculada, o tipo de cepa, as tecnologias de processamento aplicadas, a temperatura de resfriamento e a competição por substrato são fatores preponderantes para o número de células viáveis no produto final (abadía-garcía et al., 2013; mokoena et al., 2016; SHORI, 2016).

Os microrganismos probióticos mais utilizados são pertencentes aos grupos *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Há, também, outros microrganismos com possível ação probiótica como *Streptococcus thermophilus* que comumente é utilizado na produção de iogurtes, como cultura starter e tem sido relatado em estudos recentes, os efeitos de sua “ação probiótica” (KIANI, 2006; PRADO et al., 2008; MOKOENA et al., 2016; URIOT et al., 2017), *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces boulardii* (tripathi e giri, 2014; KANDYLIS et al.,

2016). Espécies de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são habitantes do intestino humano (*Bifidobacterium* do intestino grosso; *Lactobacillus* do intestino delgado). Em termos de resistência, *Lactobacillus* são geralmente mais viáveis que *Bifidobacterium* e são utilizados tradicionalmente em leites fermentados. Os *Lactobacillus* são mais resistentes ao pH baixo e apresentam melhor adaptação ao leite e outras matrizes alimentares (TRIPATHI e GIRI, 2014). Apresentam condições de crescimento ótimo em pH 5,5-6 e temperatura dentro de 35-40 °C, mas podem tolerar temperaturas de até 45 °C (KAILASAPATHY, 2013). Por sua vez, o *Bifidobacterium* apresenta pH ideal de crescimento entre 6-7 e temperatura ideal de crescimento entre 37-41 °C, com praticamente nenhum crescimento sendo verificado abaixo de 25 °C e acima de 46 °C (KAILASAPATHY, 2013).

Os probióticos têm um grande potencial para melhorar a nutrição, melhorar o sistema imunológico, otimizar a microflora intestinal e promover a saúde geral devido à sua capacidade de competir com patógenos por locais de adesão (TOMA e POKROTNIK, 2006; BONIFAIT et al., 2009; KORE et al., 2012). Há vários benefícios relacionados à saúde que são adquiridos ao se consumir alimentos probióticos regularmente, incluindo propriedades antitumorais, bem como proteção contra infecções gastrointestinais, redução da colonização gastrointestinal de patógenos, biodisponibilidade de vitaminas, aprimoramento do trânsito intestinal, alívio da intolerância à lactose e redução da constipação (ZHENG et al., 2014; MOTA et al., 2015; VANDENPLAS et al., 2015).

Destaca-se, também, a extensão da vida útil dos alimentos, em virtude da produção de distintos compostos orgânicos, entre eles as bacteriocinas produzidas pelas Bactérias ácido lácticas que apresentam ação contra microrganismos deteriorantes e patogênicos presentes em alimentos (YANG et al., 2014). As bacteriocinas são peptídeos ou proteínas antimicrobianas sintetizadas pelo ribossomo de bactérias e que têm a capacidade de matar ou inibir microrganismos deteriorantes e patogênicos (EGAN et al., 2016). Bactérias ácido lácticas (BAL), produtoras de bacteriocinas, são de interesse crescente da indústria de alimentos, pois são de fácil incorporação aos alimentos e são uma estratégia para atender as atuais demandas do consumidor por alimentos isentos de aditivos químicos (YANG et al., 2014; EGAN et al., 2016). Além de serem consideradas um adjuvante natural, pois estão presentes em diversos alimentos fermentados ou não fermentados há muito manufaturados ao longo da história, sendo geralmente reconhecidas como seguras (YANG et al., 2014; ALVAREZ-SIEIRO et al., 2016). As bacteriocinas são provenientes de um grupo heterogêneo de bactérias gram-positivas, e as mais empregadas na indústria de alimentos são do gênero *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Enterococcus* (EGAN et al., 2016).

Alvarez-sieiro et al. (2016) propuseram a divisão das bacteriocinas de BAL em dois grupos, termolábeis e termoestáveis, agrupando-as de acordo com as novas subclasses, baseado em seus mecanismos de biossíntese e atividade biológica. A classe I inclui peptídeos produzidos pelo ribossomo e modificados pós-tradução, e a classe II e classe III compreendem as bacteriocinas que não contêm modificações pós-tradução.

A ação das bacteriocinas nos alimentos pode ser através da inoculação direta da cepa produtora de bacteriocina ou adicionada na forma de preparados, como conservante. Esses preparados são bacteriocinas purificadas ou semi-purificadas sendo adicionados ao alimento como bioconservantes (ALVAREZ-SIEIRO et al., 2016).

A fermentação do leite por bactérias lácticas (BAL) é utilizada para prolongar a vida útil do leite, sendo aplicada principalmente em iogurtes e leite fermentados. O processo de preparo de iogurtes e bebidas lácteas se assemelham e cada produto apresenta características estruturais específicas (MOKOONLALL et al., 2016).

1.2 Tecnologia de Alta Pressão

O processo por alta pressão (AP) é um dos métodos alternativos de conservação de alimentos com maior êxito de utilização recente pela indústria, com efeitos adversos mínimos aos diferentes alimentos. Existem dois tipos de processos de alta pressão: a Alta Pressão Hidrostática (APH), Figura 4, que pode ser usada para processar alimentos líquidos e sólidos (VOIGT et al., 2015; AUGUSTO et al., 2018), e a Homogeneização a Ultra Alta Pressão (HUAP), que é aplicada em produtos líquidos (ZAMORA E GUAMIS, 2015).

A tecnologia de AP compreende a aplicação de faixas de pressão entre 100-1000 MPa (ou 1000-10000 bar) aos diferentes tipos de matrizes alimentícias, com objetivo de: promover a inativação enzimática; inativar microrganismos patogênicos e deteriorantes; preservar as características sensoriais dos alimentos; estender a vida útil dos alimentos; reduzir o uso de aditivos alimentares; estabilização coloidal através da redução do tamanho das partículas; maior interação na interface proteínas-gorduras em bebidas (VOIGT et al., 2015; ANDRÉS et al., 2016; CEBRIÁN et al., 2016; CODINA-TORRELLA et al., 2016; PATRIGNANI E LANCIOTTI, 2016).

São dois os princípios básicos que se aplicam ao processo de APH, o princípio de 'Le Chatelier' e o princípio Isostático. O primeiro considera que "se uma mudança nas condições é imposta a um sistema em equilíbrio, o sistema vai reagir para contrariar essa mudança e restaurar o equilíbrio". O princípio isostático concebe que o processo de pressão hidrostática é independente de volume; por conseguinte, a pressão pode ser aplicada instantaneamente e de maneira uniforme ao longo de uma amostra e gradientes de pressão não existem, de modo que o tamanho e geometria do produto são irrelevantes. Este é um outro benefício da APH comparando com os alimentos processados pelo tratamento térmico convencional, em que diferentes formas e volumes levam a um sobreaquecimento na superfície e a temperaturas insuficientes no centro do produto, o que pode levar à sobrevivência de bactérias contaminantes (VOIGT et al., 2015)

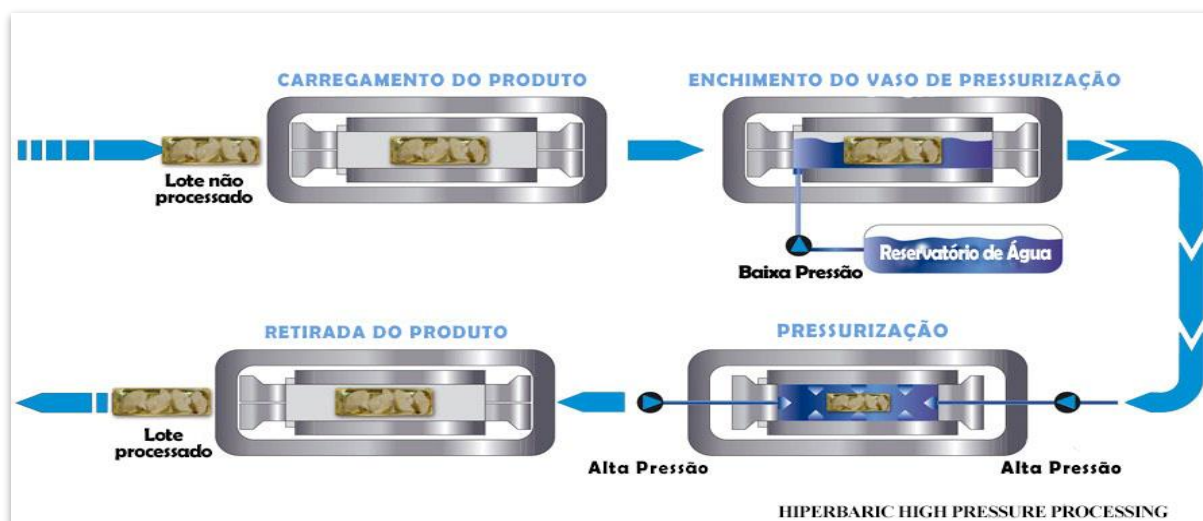


Figura 4. Processamento de alimentos por alta pressão hidrostática.

Segundo Voigt et al. (2015), o meio de transmissão de pressão pode ser água ou uma mistura de óleo ou álcool, dependendo do sistema a ser utilizado. Como resultado do aquecimento adiabático, a temperatura aumenta durante a pressurização por até 2-3°C por 100 MPa para a água, podendo alcançar 8°C em alimentos com alto teor de gordura.

O primeiro estudo de Alta Pressão Hidrostática (APH) foi realizado nos Estados Unidos, em 1885. Posteriormente, os pesquisadores verificaram que a APH propiciava efeito benéfico ao leite, promovendo aumento da vida útil da matéria prima. Desde então, vários estudos têm norteado o potencial de aplicação da alta pressão na indústria alimentícia. Porém, apenas no século XX, no Japão, surgem os primeiros alimentos comercializados (TRUJILLO et al., 2002). Nos dias atuais, a tecnologia de AP é utilizada em diversos países, incluindo os Estados Unidos, México, Coreia do Sul, Espanha e Japão, com estimativas de vendas de US\$ 10 bilhões. O número de unidades de alta pressão tem crescido exponencialmente ao redor do mundo, superando 360 equipamentos industriais, sendo mais utilizada principalmente na América do Norte (WANG et al., 2016; HUANG et al., 2017).

A aplicação da APH se dá comumente em alimentos previamente embalados a vácuo, normalmente em embalagem flexível, os quais são colocados num vaso de pressurização em que se injeta, após fechamento hermético, um líquido de transmissão de pressão. A pressão é produzida por uma bomba hidráulica ou um pistão e é transmitida isostaticamente dentro do recipiente de pressão para o produto, quase instantaneamente e de maneira uniforme. O alimento sofre o processo de pressurização durante um período requerido para ativar a destruição ou a formação de ligações não covalentes presentes em componentes alimentares, incluindo pontes de hidrogênio e ligações hidrofóbicas, possibilitando desnaturar ou gelificar proteínas, gelatinizar amido, desativar enzimas e/ou, principalmente, inativar bactérias patogênicas e microrganismos deteriorantes nos alimentos (WANG et al., 2016).

Syed et al. (2014) conduziram estudo com *Staphylococcus aureus* em suco de laranja, leite desnatado esterilizado e solução tampão *Tris*. As amostras foram inoculadas com *S. aureus* ATCC6538 de modo a resultar em contagem inicial de 1×10^7 UFC/mL. Todas as amostras foram submetidas ao tratamento de 700MPa/5min variando-se a taxa de compressão e descompressão (rápida, média ou lenta) do equipamento de alta de pressão. Após 1 semana, as contagens microbianas mais baixas foram observadas em amostras submetidas a compressão rápida e descompressão lenta em leite desnatado (2,22 e 3,51 UFC/ ml) e no tampão *Tris* (1,25 e 3,85 UFC/ml), respectivamente, não havendo alteração significativa nas contagens após duas semanas de armazenamento.

Por outro lado, verificou-se que o suco de laranja inibiu a sobrevivência de *S. aureus* a níveis abaixo do limite de detecção (<1 UFC/ml) após duas semanas de armazenamento refrigerado (4-6°C) independente do tratamento por APH.

Evert-Arriagada et al. (2014) concluíram que queijos tratados a 500 MPa/5min/16°C e armazenados a 4 °C apresentaram vida útil de 19 dias, enquanto no queijo não tratado e armazenado a 4 °C, a vida útil foi de 8 dias. De acordo com estudo de Andrés et al. (2016), smoothies armazenados a 4 °C apresentaram vida útil superior a 45 dias devido à significativa redução de microrganismos mesófilos, bolores e leveduras quando tratados no intervalo de 450 e 650 MPa. Igualmente, o processo de AP não modificou compostos químicos e parâmetros físico-químicos, preservando os açúcares individuais, ácidos orgânicos e minerais.

O interesse industrial é crescente em processos não térmicos, os quais combinam redução microbiológica eficiente com a preservação máxima das propriedades físico-químicas, bem como as características nutricionais e sensoriais das matérias-primas e dos ingredientes utilizados (PATRIGNANI e LANCIOTTI, 2016).

1.3 Alta Pressão em Produtos Funcionais

O processamento de alta pressão tem mostrado importantes aplicações para melhorar a qualidade dos produtos alimentares, dada a sua capacidade de assegurar seguridade e aumentar a vida de útil pela inativação microrganismos, preservando ou melhorando alguns atributos de qualidade (DENOYA et al., 2016; WANG et al., 2016; PEGA et al., 2018). Os tratamentos por alta pressão afetam as propriedades funcionais de proteínas através da ruptura e formação de ligações de hidrogênio, alterando assim as interações hidrofóbicas e de par iônico dessas macromoléculas. No caso das principais proteínas do leite (soro proteínas e caseínas), a AP induz mudanças que melhoram sua funcionalidade para algumas aplicações. As micelas de caseína dissociam em subunidades menores com propriedades de agregação aprimoradas quando submetida a pressões superiores a 100 MPa. Há também a desnaturação e subsequente agregação de β -lactoglobulina pressurizada na faixa de 200 a 600 MPa (DE ANCOS et al., 2000; LÓPEZ-FANDIÑO, 2006; PEGA et al., 2018). Atualmente, os consumidores estão exigindo cada vez mais produtos alimentícios naturais e voltados para a saúde, impulsionando a implementação de soluções que dispensem o uso de aditivos e minimamente processados. Os alimentos, “clean label” portanto, não só alegaram substituir os aditivos químicos ou artificiais por simples ingredientes naturais, mas também por serem processados por tecnologias menos invasivas para manter a alta qualidade (ASIOLI et al., 2017).

Nos últimos anos, o processamento por alta pressão tem sido pesquisado com relação aos efeitos em compostos bioativos, além da inativação de microrganismos e impacto sensorial. Barba et al. (2013) verificaram compostos e propriedades funcionais, como capacidade antioxidante, antocianinas poliméricas, compostos fenólicos totais e ácido ascórbico em sucos de mirtilo tratados a 0, 200, 400 e 600 MPa por 5, 9 e 15 minutos, e concluíram que todas os indicadores funcionais (ácido ascórbico, fenólicos totais, antocianinas totais e capacidade antioxidante) foram iguais ou superiores nos sucos pressurizados, sem apresentar diferença significativa entre os tratamentos.

Bebidas a base de leite acrescentadas com caqui pressurizado a 200 MPa/6min/25°C apresentaram alto teor de carotenoides, quando comparadas ao produto pasteurizado a 70°C/15min, conforme verificaram Hernandez-Carrion et al. (2014), que atribuíram o resultado à maior capacidade de extração de carotenoides e à precipitação de taninos em frutos de caqui, o que atenuou a adstringência da fruta.

Zheng et al. (2014) constataram que a APH em suco de Lichia fermentado submetidos a pressão de 500 MPa/2min/25°C contribuiu positivamente com as características sensoriais como: cor, flavour e aceitação global. A retenção fenólica e atividade antioxidante foram preservadas ao longo do armazenamento a 4 °C por 4 semanas, período ao final do qual a contagem de *Lactobacillus casei* resultou superior a 8 log UFC/mL. Rodríguez-Roque et al. (2015), em bebidas a base de suco frutas (de laranja, kiwi, abacaxi e manga), leite (integral, desnatado) ou “leite” de soja, submeteram as amostras a um tratamento de 400 MPa/5 min e concluíram ser superior a bioacessibilidade de vitamina C e fenólicos totais, em comparação com as bebidas não tratadas. Cilla, A. et al. (2012) aplicaram tratamento de APH (400 MPa/5 min/40 °C) em combinação com tratamento térmico (90 °C/30 s) em bebidas preparadas a partir de sucos de frutas (laranja, kiwi, abacaxi e manga) e leite (integral ou/e desnatado ou “leite de soja). Constataram que o tratamento com APH promoveu um aumento na bioacessibilidade de carotenoides e tocoferóis, em comparação com o tratamento térmico, contrariamente ao ocorrido com ácido ascórbico. Ainda segundo os autores, o tratamento com APH aumentou a bioacessibilidade de compostos lipofílicos, o que pode estar relacionado à matriz alimentar.

Em estudo de Gouvea (2017) sobre a aplicação de diferentes níveis de Alta Pressão Hidrostática (250 ou 500MPa/10min) em queijo tipo Minas Frescal incorporado com diferentes concentrações de cenoura (3 e 6%) , observou que a APH não impactou nos níveis de carotenoides do produto, e promoveu a extensão da vida útil. Destacando ainda, o potencial da tecnologia para o desenvolvimento de produtos lácteos funcionais. Também em queijo tipo Minas Frescal, tratados a (200 ou 350MPa/5min), Martins (2018) sugere que a utilização da APH em lácteos probióticos afetou a viabilidade inicial de *Bifidobacterium* subsp. *lactis*, porém ao longo do armazenamento refrigerado a 4 ± 2 °C por 28 dias não houve influência na contagem dos probióticos. Sendo assim, as amostras mantiveram-se dentro do padrão exigido para serem consideradas probióticas ao longo de todo o período de estocagem.

A APH pode ser aplicada em *smoothies* de frutas preparado com suco de laranja, suco de mamão, suco de melão, suco de cenoura e leite desnatado. Segundo Andres et al. (2016), as condições de processamento (450 ou 600MPa/3min) preservaram os compostos bioativos naturais e a atividade antioxidante em comparação ao processo térmico 80 °C/3min. E enfatizam, que as amostras pressurizadas a 450MPa/3min mantiveram-se com alterações sensoriais mínimas, além de elevada biodisponibilidade de licopeno, β -caroteno e polifenóis, assim como alta capacidade de retenção de ácido ascórbico e elevada atividade antioxidante.

O tratamento por APH é uma tecnologia importante para o desenvolvimento de alimentos “*clean label*”, dispensando o uso de aditivos, mantendo a qualidade dos alimentos e de comprovada seguridade microbiológica. O emprego da tecnologia prolonga a extensão da vida útil dos alimentos armazenados, e assim, preserva características físico-químicas e sensoriais, como por exemplo, a cor e o sabor dos alimentos, remetendo as condições de processamento mínimo e suprimindo as expectativas crescentes entre os consumidores por alimentos com uso reduzido de aditivos químicos (HUANG et al., 2017).

2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de microrganismos probióticos é determinante para a funcionalidade em alimentos, em virtude dos potenciais benefícios à saúde descrito destes microrganismos, contribuindo também para a extensão da vida útil dos produtos. Bebidas lácteas adicionadas de suco de frutas se destacam como produtos de excelente aceitação entre os consumidores devido às suas características nutricionais e sensoriais. Juntamente com os benefícios associados aos probióticos, a utilização da tecnologia de alta pressão hidrostática confere ao produto segurança microbiológica, preservando suas características sensoriais ao longo do armazenamento refrigerado, atendendo a demanda dos consumidores por alimentos mais saudáveis. Ressalta-se ainda, que o comportamento mercadológico assegura que a América Latina, e em especial o Brasil, ao longo da última década apresentou crescimento significativo no segmento de alimentos funcionais, sobretudo no segmento de lácteos, e que as empresas dos setores de laticínios continuamente investem em novas formulações e processos para suprirem a demanda contínua e exigente. Com base nessas diretrizes, é oportuno, o desenvolvimento da bebida láctea fermentada probiótica tratada por alta pressão hidrostática priorizando sua seguridade microbiológica, qualidade nutricional e dispensando o uso de aditivo.

CAPÍTULO II
BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA: FORMULAÇÃO E PROCESSO

RESUMO

Produtos lácteos são uma alternativa adequada como alimentos funcionais por apresentarem excelente valor nutricional, por serem amplamente aceitos e consumidos e potenciais matrizes para inoculação de microrganismos probióticos. O objetivo deste estudo foi desenvolver uma bebida láctea fermentada com frutas adicionada de cultura probiótica e avaliar sua aceitação entre os consumidores para definição da formulação ideal, bem como, foi realizada a contagem de *Lactobacillus acidophilus* para caracterização do produto como alimento probiótico. Para a formulação da bebida utilizou-se leite, soro de leite, açúcar e polpa de frutas pasteurizadas de mamão e laranja como principais ingredientes. A formulação das bebidas consistiu em misturar as polpas de frutas com uma base láctea à base de leite e soro de leite, previamente fermentada por cultura mista probiótica comercial ABT-5. Foram testadas 06 formulações mantendo a base láctea fixa em (70%), composta por (50%) de água mineral e (50%) de leite desnatado com a concentração de probióticos (0,5g/L), variando a concentração de açúcar em (4,7 ou 10%) e quanto à saborização, o suco foi composto por (70%) de mamão e (30%) de laranja ou (60%) de mamão e (40%) de laranja. As bebidas elaboradas foram armazenadas a 5 ± 1 °C e após 24h oferecidas a 90 provadores para caracterização sensorial. A aceitação das amostras variou de 5,1 até 6,9 em escala hedônica de nove pontos. Avaliou-se a enumeração de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 que variou de 7,83 a 8,09 log UFC/mL na 1ª semana de armazenamento refrigerado. Os resultados sugerem que as bebidas se mostraram adequadas para inoculação de probióticos e atenderam a exigência legislação, sendo portanto, um produto probiótico. As amostras com níveis de açúcar de (7) ou (10%) obtiveram baixa aceitação, enquanto as amostras com teores de açúcar de (4%) e (7%) e (60%) de suco de mamão e (40%) de suco de laranja em suas formulações foram as preferidas pelos consumidores.

Palavras-chave: Bebida láctea; probióticos; análise sensorial.

ABSTRACT

Dairy products are an adequate alternative as functional foods because they present excellent nutritional value, being widely accepted and consumed and potential matrices for inoculation of probiotic microorganisms. The objective of this study was to develop a fermented milk drink fermented with probiotic culture and to evaluate its acceptance among consumers to define the ideal formulation, as well as, the *Lactobacillus acidophilus* count was performed to characterize the product as a probiotic food. For the formulation of the beverage was used milk, whey, sugar and pulp of pasteurized fruits of papaya and orange as main ingredients. The beverage formulation consisted of blending the fruit pulps with a dairy base based on milk and whey, previously fermented by mixed commercial probiotic ABT-5 culture. Six formulations were tested maintaining the milk base fixed in (70%), composed of (50%) mineral water and (50%) skimmed milk with probiotic concentration (0.5 g / L), varying the sugar concentration (70%) of papaya and (30%) of orange or (60%) of papaya and (40%) of orange. The elaborated beverages were stored at 5 ± 1 ° C and after 24 hours offered to 90 tasters for sensorial characterization. Sample acceptance ranged from 5.1 to 6.9 on a nine-point hedonic scale. The enumeration of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 ranging from 7.83 to 8.09 log CFU / mL in the first week of refrigerated storage was evaluated. The results suggest that the beverages proved to be adequate for inoculation of probiotics and met the requirement legislation, thus being a probiotic product. Samples with sugar levels of 7 or 10% obtained low acceptance, while samples with sugar contents of (4%) and (7%) and (60%) of papaya juice and (40%) of orange juice in their formulations were preferred by consumers.

Keywords: Dairy beverage; probiotics; sensory analysis.

1 INTRODUÇÃO

Os produtos lácteos são boas matrizes para inoculação de probióticos (FERNANDES PEREIRA e RODRIGUES, 2018). Uma vez que suas composições são fontes de proteína, minerais e vitaminas que propiciam ambiente favorável para o desenvolvimento de probióticos (HE e HEKMAT, 2014; VAN HOOIJDONK e HETTINGA, 2015). Iogurtes, bebidas a base de leite e leites fermentados estão entre os principais alimentos probióticos consumidos no mundo. Contudo, os alimentos devem conter uma concentração adequada de probióticos, ou seja, 10^8 a 10^9 UFC/g quando consumidos, para ter um efeito benéfico para a saúde (LOURENS-HATTINGH e VILJOEN, 2001; JAYAMANNE e ADAMS, 2006; FERNANDES PEREIRA e RODRIGUES, 2018; PEREIRA et al., 2018). Estudos recentes assinalam que o consumo contínuo de alimentos probióticos promovem diversos benefícios, incluindo o equilíbrio da flora intestinal, bem como o incremento da resistência contra microrganismos patogênicos (ZHENG et al., 2014; ZOUMPOPOULOU et al., 2017). Usualmente em produtos lácteos são usados cepas de *Lactobacillus acidophilus* que através de sua produção de ácidos orgânicos (ácido láctico, ácido acético, etc) colaboram para o equilíbrio da flora intestinal (YERLIKAYA, 2014). Bem como, cepas de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* que promovem vários efeitos relacionados à saúde, incluindo resistência a microrganismos patogênicos (MOTA et al., 2015). E cepas de *Streptococcus thermophilus*, cultura starter na produção de iogurtes, tem sido descrita com potencial probiótico, e mostraram efeitos benéficos à saúde como a prevenção de gastrite e alívio da intolerância à lactose (KIANI, 2006; PRADO et al., 2008; MOKOENA et al., 2016; URIOT et al., 2017).

Estas potenciais propriedades funcionais múltiplas resultaram no aumento da produção de diferentes tipos de leite fermentado, incluindo com adição de frutas, nozes, ervas e fibras para atender a demanda crescente de consumidores (SHORI e BABA, 2013; ZHANG et al., 2016; SU et al., 2017).

Os sucos de frutas, assim como os produtos lácteos, oferecem diversas vantagens para os microrganismos probióticos (FERNANDES PEREIRA e RODRIGUES, 2018). Constituem uma rica fonte de nutrientes (antioxidantes, minerais e vitaminas) e seus açúcares naturais contribuem para o crescimento de probióticos. Os sucos cítricos, especialmente o suco de laranja, constituem fontes de vitamina C e compostos bioativos com ampla gama de atividades biológicas favoráveis à saúde (LI e SCHLUESENER, 2017). Auxilia na prevenção do câncer, a vitamina C e o betacaroteno conferem efeito protetor às células contra os danos causados pelos radicais livres, retardando o envelhecimento celular e podendo diminuir o risco de câncer. Os flavonoides contidos no suco atuam como antioxidantes e podem diminuir o LDL (*low density lipoproteins*) ou “colesterol ruim” relacionado a doenças cardiovasculares e aumentar o HDL (*high density lipoproteins*) ou “colesterol bom” que promove a redução dos cristais de colesterol que são acumulados nas artérias (CITRUSBR, 2017). O Brasil responde por 34% da laranja e mais da metade do suco produzido em todo o mundo, considerando a média das últimas cinco safras reportadas no levantamento mundial feito pelo Departamento da Agricultura dos Estados Unidos (USDA). De acordo com o mesmo órgão, o Brasil responde por 76% de participação no comércio mundial de suco de laranja, consolidando-se como o mais importante fornecedor global desse nobre produto. Por ser uma atividade que exige uma grande quantidade de mão de obra, especialmente durante a colheita, a citricultura também tem um impacto bastante forte na economia dos 350 municípios de São Paulo e Triângulo Mineiro onde a atividade é predominante e também em seus arredores. Ainda assim, apenas 3% da média das últimas cinco safras foram consumidas no mercado interno, os demais 97% foram destinados a exportação (FAVA NEVES e TROMBIN, 2017) Banana, mamão, manga e outras frutas são grandes culturas frutíferas de áreas tropicais e subtropicais (ALI et al., 2004; SAÚCO et al.,

2014), também com sucos com elevado valor nutricional (MEGÍAS-PÉREZ et al., 2014). O Brasil é o maior produtor e exportador de mamão, atendendo a mercados exigentes como os Estados Unidos e a Europa (SEBRAE, 2016). O mamão é consumido preferencialmente fresco, mas sua industrialização, por meio do aproveitamento integral do fruto, oferece extensa gama de produtos e subprodutos, que podem ser utilizados na indústria de alimentos, têxtil, farmacêutica e ração animal (SEBRAE, 2016). O mamoeiro é uma planta precoce, com início de florescimento e frutificação entre três e quatro meses após o plantio. A exploração comercial se estende até o terceiro ano de idade, quando a planta atinge altura elevada, que dificulta a colheita, e há perda de qualidade e produtividade (SEBRAE, 2016). De fruto muito perecível, o mamoeiro apresenta elevado nível de perda na fase pós-colheita, atribuída principalmente aos danos mecânicos provenientes de atrito e/ou compressão. Os danos ocorrem devido ao manuseio inadequado dos frutos, assim como no transporte destes. A polpa do fruto maduro é usada na indústria de alimentos para produção de conservas, geleias, sucos e néctares, combinados ou não com outras frutas tropicais, além de purê, pelo processo asséptico ou na forma congelada (SEBRAE, 2016). No Brasil, os principais métodos de industrialização são compotas, purê asséptico – em pequena escala – e fruta cristalizada. Do látex do fruto verde é extraída a papaína, enzima que quebra proteínas (proteolítica), utilizada para os mais variados fins nas indústrias têxteis, farmacêuticas, de alimentos e de cosméticos. Pode ser apresentada nas formas refinada, líquida ou purificada (SEBRAE, 2016). A indústria de cerveja é a principal consumidora de papaína, com cerca de 75% da demanda, utilizando-a na clarificação e estabilização de cerveja. Além da papaína, também se extrai das folhas, frutos e sementes do mamoeiro, um alcaloide denominado carpaína, utilizado como ativador cardíaco. Além disso, o mamão é uma boa fonte de cálcio e uma excelente fonte de provitamina A e de ácido ascórbico (Vitamina C). Do fruto integral "riscado", após a extração do látex, é extraída a pectina, usada na indústria de alimentos e componente peletizado para ração animal. Das sementes é extraído óleo para uso industrial e torta para ração animal (SEBRAE, 2016).

A análise descritiva tem sido a principal ferramenta da ciência sensorial para obter dados detalhados, confiáveis e reprodutíveis para descrever os perfis sensoriais de produtos alimentares (ALEXI et al., 2018). Dentro do perfil do produto, um passo fundamental é a seleção de uma formulação que esteja alinhada tanto quanto possível com as preferências sensoriais do consumidor (VAN KLEEF et al., 2006).

CATA ou “*check-all-that-apply*”, tem sido cada vez mais utilizado como um método rápido para obter perfis de alimentos e produtos não alimentícios (VARELA E ARES, 2014). O método foi utilizado pela primeira vez em pesquisa de mercado, para entender a percepção do consumidor em relação à determinada marca (GRYGORCZYK et al., 2017). Devido a sua aplicação simples, pequenos requisitos de esforço cognitivo e a resposta rápida das características sensoriais dos produtos examinados pelos avaliadores, o CATA, quando comparado aos diversos métodos existentes de análise sensorial, ganhou popularidade entre os pesquisadores (ALEXI et al., 2018). Além disso, o CATA é um método não holístico, uma vez que não requer uma avaliação simultânea de todas as amostras, o que o torna apropriado para grandes conjuntos de produtos e/ou quando a ordem de apresentação monádica das amostras é necessária (ARES, 2015).

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de bebida láctea fermentada sabor mamão e laranja adicionada de cultura probiótica mista e o estudo comparativo sobre as diferentes formulações do produto, com base na avaliação sensorial.

2 MATERIAL E METÓDOS

2.1 Matérias-primas

Para o processamento da bebida láctea fermentada adicionada de probióticos, inicialmente foi realizada a constituição da base láctea: com a utilização de soro de leite em pó (ALIBRA), leite UHT desnatado (REGINA), adquirido junto a supermercados locais e mantidos à temperatura ambiente até o momento de fabricação das bebidas, e água mineral Petrópolis adquirido junto a supermercados localizados na Barra da Tijuca – Rio de Janeiro, RJ e transportados para as instalações da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos A (Rio de Janeiro, RJ).

Foi utilizado cultura mista probiótica ABT-5 (Christian Hansen) em pó composta de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Streptococcus thermophilus*. Quanto à saborização, foram utilizadas polpas comerciais pasteurizadas, de sabor mamão (MAISFRUTA) e de sabor laranja (BELAISCHIA), ambas adquiridas na Central de Abastecimento do Estado do Rio de Janeiro (CEASA) e transportadas para EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, e mantido à temperatura de congelamento (-18 ± 1 °C) até o momento do processamento. Para adoçar a bebida, foi utilizado açúcar refinado comercial (Açúcar União).

2.1.1 Processo da bebida láctea

O processo de obtenção da bebida láctea fermentada, conforme estabelecido por Masson (2010), alterando-se a utilização de leite cru desnatado por leite UHT desnatado, assim como o tempo de fermentação que foi reduzido de 210min para 150min e adaptado aos objetivos do presente estudo, é apresentado na Figura 1.

Todos os equipamentos e utensílios utilizados para o processamento da bebida foram higienizados com água clorada (100 ppm). As polpas comerciais foram retiradas das embalagens com prévia lavagem externa.

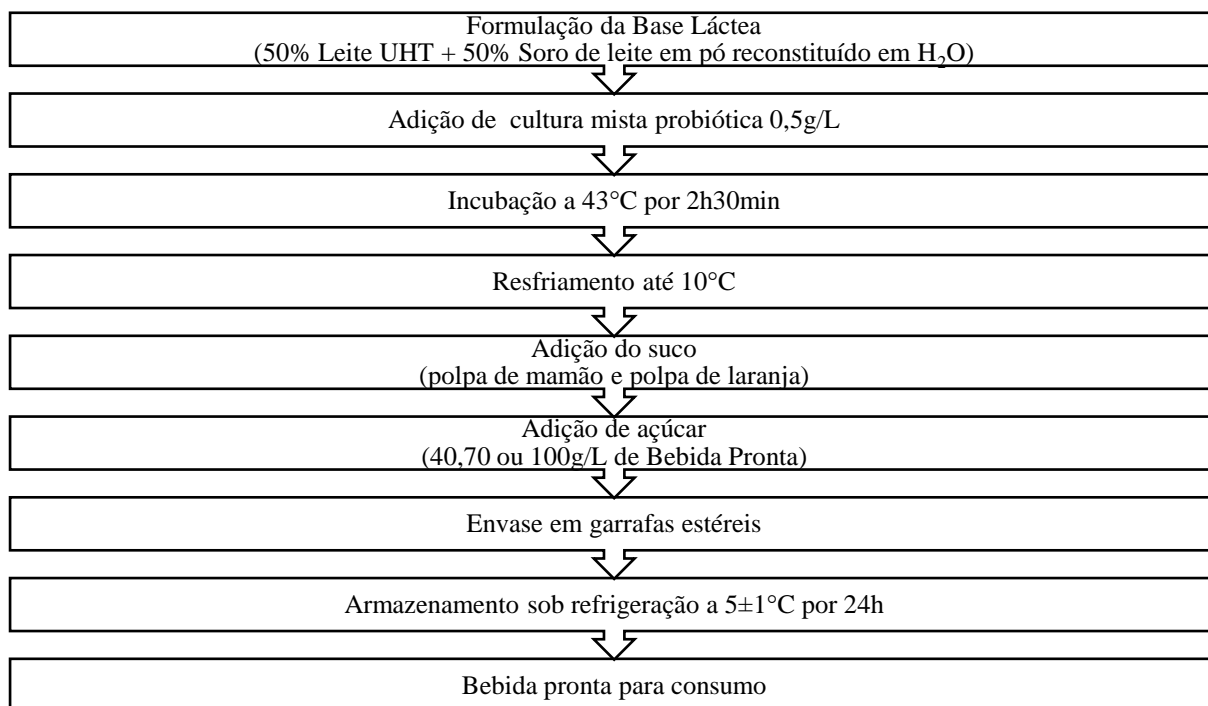


Figura 1. Fluxograma para o preparo das bebidas.

Para a obtenção da bebida, procedeu-se primeiramente o preparo da base láctea, que consiste na reconstituição do soro de leite em pó 9g/100mL em água mineral, adicionado de leite UHT, Procedendo-se em seguida o encaminhamento para estufa a temperatura de 43 °C por 150 minutos para fermentação, até atingir-se pH = 4,6 ± 0,2. Após a fermentação, a base láctea foi transferida para B.O.D até atingir a temperatura de 10 °C, e então se adicionou as polpas e açúcar de acordo com cada formulação a ser avaliada. Para todas as amostras foi adicionado 0,5g de cultura mista probiótica (ABT-5) para um litro da bebida pronta. Ou seja, em 700mL de base láctea, foi adicionado 0,5g do probiótico para proceder a fermentação. Foram preparadas seis formulações de bebida láctea fermentada sabor mamão e laranja cuja formulação específica é descrita na Tabela 1. Sendo utilizada, a seguinte codificação para identificação das formulações: A (180mL de polpa de mamão, 120mL de polpa de laranja e 40g de açúcar), B (150mL de polpa de mamão, 150mL de polpa de laranja e 40g de açúcar), C (180mL de polpa de mamão, 120mL de polpa de laranja e 70g de açúcar), D (150mL de polpa de mamão, 150mL de polpa de laranja e 70g de açúcar), E (180mL de polpa de mamão, 120mL de polpa de laranja e 100g de açúcar) e F(150mL de polpa de mamão, 150mL de polpa de laranja e 100g de açúcar). Posteriormente, a bebida foi envasada em garrafas estéreis e armazenada sob refrigeração a 5±1 °C por 24 horas.

Tabela 1. Formulações da bebida láctea fermentada sabor mamão e laranja.

Amostras	Polpa de mamão (mL/L)	Polpa de laranja (mL/L)	Adição açúcar (g)
A	180	120	40
B	150	150	40
C	180	120	70
D	150	150	70
E	180	120	100
F	150	150	100

A – Bebida láctea fermentada mamão e laranja com 4% de açúcar, 60% de polpa de mamão e 40% de polpa de laranja; B – Bebida láctea fermentada mamão e laranja com 4% de açúcar, 50% de polpa de mamão e 50% de polpa de laranja; C – Bebida láctea fermentada mamão e laranja com 7% de açúcar, 60% de polpa de mamão e 40% de polpa de laranja; D – Bebida láctea fermentada mamão e laranja com 7% de açúcar, 50% de polpa de mamão e 50% de polpa de laranja; E – Bebida láctea fermentada mamão e laranja com 10% de açúcar, 60% de polpa de mamão e 40% de polpa de laranja; F – Bebida láctea fermentada mamão e laranja com 10% de açúcar, 50% de polpa de mamão e 50% de polpa de laranja.

2.2 Análises Microbiológicas

As análises realizadas compreenderam, além da enumeração de *Lactobacillus* spp, a contagem de coliformes termotolerantes a 45°C, de acordo com Aoac (2000), utilizando-se placas Petrifilm™ CC (3M Company, St. Paul, MN, EUA), bolores e leveduras, contagem de *Estafilococos* coagulase positivo e determinação de *Salmonella* sp., realizado em laboratório de microbiologia, com metodologia adaptada de Tournas et al. (2001) e Hitchins et al. (1998), de acordo com a instrução normativa nº62 (BRASIL, 2003).

2.2.1 Enumeração de *Lactobacillus* spp.

As análises de *L. acidophilus* nas bebidas lácteas foram realizadas pela completa homogeneização manual de 25 mL de amostra com 225 mL de água peptonada. Pelo menos 3 diluições seriadas 1:10 da bebida láctea em água peptonada foram inoculadas em profundidade em duas placas de ágar De-Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (Sigma - Aldrich, St. Louis MO, USA). A enumeração foi conduzida após incubação em aerobiose a 37 °C por 72 h (ASHRAF E SHAH, 2011). Optou-se pela enumeração apenas do *Lactobacillus acidophilus*, em virtude de sua sensibilidade, de modo que identificada sua presença, seria indicativo da presença dos demais probióticos.

O processamento e análises microbiológicas, foram realizados em duplicata e, para cada diluição, o plaqueamento foi realizado em duplicata, com duas repetições de processo, a fim de elevar a confiabilidade dos resultados.

2.3 Análise sensorial

Os participantes avaliaram a aceitação global das amostras utilizando escalas hedônicas horizontais de 9 pontos, variando de “desgostei extremamente” (1) a “gostei extremamente” (9). Posteriormente, foram solicitados a marcar todos os termos CATA que consideravam adequados para descrever as amostras. A ordem de apresentação das amostras assim como dos termos CATA seguiu delineamento balanceado. Os termos CATA foram identificados em estudo preliminar com avaliadores treinados. Sendo estes: Acidez - *ácido, pouco ácido*; Doçura - *muito doce, doce, tem equilíbrio doce/ácido*; Consistência - *boa consistência, pouco consistente/aguada*; Cor - *cor atrativa*; Sabor: *sabor de fermentado, sabor de laranja e sabor de mamão*; Aroma: *aroma de fermentado, aroma doce e aroma suave*; Aparência: *aparência homogênea; e arenosa*.

Após avaliar as seis amostras de bebida láctea fermentada probiótica de mamão e laranja, os participantes foram solicitados a marcar os termos que consideravam apropriados para descrever a bebida láctea ideal. Os dados foram analisados por ANOVA, sendo que Mapa de Preferência Interno e a representação dos atributos obtidos pelo teste Q de Cochran foram utilizados para obter uma representação das amostras e a relação entre as mesmas e os termos das questões CATA.

2.3.1 Consumidores participantes da avaliação sensorial

Noventa consumidores voluntários não treinados, com idade entre 18 e 65 anos (sendo 58% homens e 42% mulheres) participaram do estudo de caracterização sensorial das bebidas lácteas fermentadas probióticas, o qual foi realizado na Embrapa Agroindústria de Alimentos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Enumeração de *Lactobacillus* spp.

Para ser considerado probiótico o produto deve apresentar a concentração de 10^7 a 10^8 (UFC.g⁻¹) de bactérias probióticas viáveis no momento do consumo (BRASIL, 2008). Em 100 g do produto no momento do consumo deve apresentar 10^6 UFC/g de probióticos viáveis (MARUYAMA et al., 2006). As enumerações de probióticos das amostras após o preparo das bebidas e após 7 dias de armazenamento refrigerado são dispostas na Tabela 2.

Tabela 2. Sobrevivência em UFC/mL de *Lactobacillus* spp. ao longo do armazenamento refrigerado 5±1 °C por 7 dias.

Tempo (dias)	A	B	C	D	E	F
1	7,94 ± (0,01) ^{Ba}	7,83 ± (0,01) ^{Ca}	8,05 ± (0,01) ^{Aa}	7,98 ± (0,01) ^{Ba}	8,12 ± (0,01) ^{Aa}	8,09 ± (0,01) ^{Aa}
7	7,71 ± (0,04) ^{Bb}	7,60 ± (0,01) ^{Cb}	7,87 ± (0,01) ^{Ab}	7,73 ± (0,01) ^{Bb}	7,88 ± (0,01) ^{Ab}	7,85 ± (0,02) ^{Ab}

(A) – Bebida láctea fermentada mamão e laranja com 4% de açúcar, 60% de polpa de mamão e 40% de polpa de laranja; (B) – Bebida láctea fermentada mamão e laranja com 4% de açúcar, 50% de polpa de mamão e 50% de polpa de laranja; (C) – Bebida láctea fermentada mamão e laranja com 7% de açúcar, 60% de polpa de mamão e 40% de polpa de laranja; (D) – Bebida láctea fermentada mamão e laranja com 7% de açúcar, 50% de polpa de mamão e 50% de polpa de laranja; (E) – Bebida láctea fermentada mamão e laranja com 10% de açúcar, 60% de polpa de mamão e 40% de polpa de laranja; (F) – Bebida láctea fermentada mamão e laranja com 10% de açúcar, 50% de polpa de mamão e 50% de polpa de laranja.

(*)Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p>0,05).

(**)Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p>0,05).

De acordo com análise estatística houve diferença significativa (p≤0,05) entre as formulações e ao longo do armazenamento refrigerado pelo teste de Tukey. Conforme o requisito legal, todas as amostras apresentaram concentração de 10^7 a 10^8 (UFC.g⁻¹) de bactérias probióticas viáveis, podendo serem consideradas probióticas.

Em sua contagem inicial, a amostra (E), com 8,12 log UFC/mL, e a amostra (F), com 8,09 log UFC/mL de microrganismos viáveis, são as que apresentaram maior enumeração de probióticos, sem diferença significativa entre ambas. Comportamento análogo também foi observado no 7º dia de armazenamento refrigerado, em que as mesmas amostras (E) e (F) apresentaram 7,88 e 7,85 log UFC/mL respectivamente, mantendo-se com a maior concentração de microrganismos viáveis. Costa et al. (2014), após a fermentação, obtiveram contagens elevadas para *S. thermophilus* (8,99 log UFC/mL), *L. delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* (7,83 log UFC/mL) e *L. acidophilus* (9,49 log UFC/mL) em iogurtes a base de leite de cabra. Resultados similares foram obtidos para *S. thermophilus* (9–11 log UFC/mL) e *L. bulgaricus* (8–9 log UFC/mL) em iogurtes preparados com leite de ovelhas (COSTA et al., 2014; BALTHAZAR et al., 2016). Machado et al. (2017), em estudo de iogurte produzido com leite de cabra e adicionado de mel, obtiveram, no primeiro dia de armazenamento refrigerado, aproximadamente 8,5 log UFC/mL para *L. acidophilus*. Todos os estudos citados atribuíram o desenvolvimento de *L. acidophilus* a uma quantidade mínima de açúcar nas formulações e, analogamente, os resultados apresentados na Tabela 2, sugerem que as formulações com

maiores níveis de açúcar obtiveram maior sobrevivência de *L. acidophilus* no D1 e no D7 do armazenamento refrigerado.

A alta concentração de açúcar adicionada ao leite antes do processo de fermentação, pode promover estresse osmótico, resultando em longo tempo de fermentação e também ao desenvolvimento de produtos com baixo teor de ácidos orgânicos, devido a uma menor atividade de água (SHAH E RAVULA, 2000).

Maganha et al. (2014) ao avaliarem a viabilidade de bactérias probióticas em leite fermentado desnatado produzido com diferentes níveis de açúcar (0% ou 10%) e leite em pó (0%, 5%, 10% e 15%), obtiveram contagens para *L. acidophilus* na faixa de 6,22 a 8,26 log UFC/mL ao longo do armazenamento de 21 dias. Sugerindo que maior conteúdo de sólidos totais não influenciou significativamente nas contagens *L. acidophilus* durante o armazenamento.

3.2 Perfil microbiológico deteriorante e patogênico

O regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos estabelece que o limite aceitável para coliformes 45 °C de $5,0 \times 10^3$ e para *Staphylococcus aureus* é de $1,0 \times 10^3$. Para *Salmonella* sp., a exigência é que o produto não apresente contagem deste microrganismo, devendo estar ausentes (BRASIL, 2001). Conforme disposto na Tabela 3, onde para as análises de Estafilococos coagulase positiva e Coliformes 45 °C que mantiveram-se dentro do padrão exigido, apresentando contagens inferiores a $1,0 \times 10^1$ para todas as amostras analisadas no primeiro dia de armazenamento refrigerado. O mesmo pode-se observar nas análises de amostras compostas para *Salmonella* sp., em que todos os resultados foram ausentes para todas as amostras em questão.

Com base nos dados apresentados na Tabela 3, as amostras foram consideradas aptas para o consumo, com qualidade microbiológica desejada e sem oferecerem riscos aos consumidores no estudo.

Tabela 3. Enumeração de fungos filamentosos e leveduras, *Salmonella* sp (amostra composta), Estafilococos coagulase positiva e Coliformes 45 °C para as amostras de bebida láctea fermentada adicionada de cultura probiótica mista ABT-5.

Microrganismo	Contagem
Fungos filamentosos e leveduras	$<1,0 \times 10^1$ UFC/g
<i>Salmonella</i> sp.	Ausente (em 25 mL)
Estafilococos coagulase positiva	$<1,0 \times 10^1$ UFC/g
Coliformes 45°C	$<1,0 \times 10^1$ UFC/g

(*) Resultados para todas as amostras;

3.3 Caracterização sensorial

Após avaliação microbiológica dos Coliformes 45 °C, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus* de acordo com a legislação brasileira, procedeu-se o estudo de aceitação, com participação de 90 consumidores não treinados.

As médias e desvio padrão da aceitação são apresentados na Tabela 4. As bebidas que apresentaram em suas formulações, maior porcentagem de polpa de mamão, com níveis de açúcar mais baixo e intermediário, foram as mais aceitas, enquanto as bebidas que possuíam maior nível de açúcar em suas formulações obtiveram médias baixas.

Tabela 4. Médias de aceitação[§] das amostras de Bebida Láctea Fermentada.

	Amostra					
	1	2	3	4	5	6
	A	B	C	D	E	F
Aceitação (n=90)	6,7 ± (1,9) ^{ab}	6,2 ± (1,7) ^b	6,9 ± (1,8) ^a	6,4 ± (1,8) ^{ab}	5,2 ± (1,8) ^c	5,1 ± (2,0) ^c

(§) avaliada em escala hedônica de 9-pontos, variando de 1: desgostei muitíssimo a 9: gostei muitíssimo. *Letras iguais na mesma linha não diferem entre si significativamente ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. **Letras diferentes na mesma linha diferem entre si significativamente ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey. (A) – Bebida láctea fermentada mamão e laranja com 4% de açúcar, 60% de polpa de mamão e 40% de polpa de laranja; (B) – Bebida láctea fermentada mamão e laranja com 4% de açúcar, 50% de polpa de mamão e 50% de polpa de laranja; (C) – Bebida láctea fermentada mamão e laranja com 7% de açúcar, 60% de polpa de mamão e 40% de polpa de laranja; (D) – Bebida láctea fermentada mamão e laranja com 7% de açúcar, 50% de polpa de mamão e 50% de polpa de laranja; (E) – Bebida láctea fermentada mamão e laranja com 10% de açúcar, 60% de polpa de mamão e 40% de polpa de laranja; (F) – Bebida láctea fermentada mamão e laranja com 10% de açúcar, 50% de polpa de mamão e 50% de polpa de laranja.

A amostra (C) alcançou média $6,9 \pm (1,8)$ e a (A) $6,7 \pm (1,9)$, tendo sido as melhores avaliadas pelos consumidores, e não diferiram significativamente ($p > 0,05$) entre si. Matos (2009) elaborou seis formulações de bebida láctea com 25% de polpa de graviola, variando a proporção de açúcar (12%; 14% e 16%). Os resultados mostraram que mais de 12% de açúcar nas bebidas diminuiu a preferência pelos consumidores, pois a doçura sobressai ao sabor e aroma da graviola. Por outro lado, as bebidas (E) e (F) obtiveram as menores médias de aceitação sendo, portanto, as menos preferidas pelos consumidores do estudo. Johansen et al. (2011) corroboraram em seu estudo “*Motivação para escolha e percepção de saudabilidade de produtos lácteos com calorias reduzidas. Um estudo transcultural*”, que os principais motivos dos consumidores para escolher iogurtes e queijos com baixo teor calórico estavam relacionados a baixo teor de gordura, saúde e bom gosto. Além disso, também influíram o controle de peso, aspectos nutricionais, disponibilidade e estilo de vida. O grupo de colaboradores do estudo, apresentado na Tabela 5 foi composto por consumidores masculinos (58%) e mulheres (42%), em sua maioria (54%) com faixa etária de 18-25 anos e 26-35 anos, jovens a adultos jovens, e com elevado nível de escolaridade (54%) (pós-graduação). A conscientização à respeito dos benefícios de dietas balanceadas orienta-se aos hábitos mais saudáveis de consumo e cuidados com a saúde, práticas de atividades físicas por exemplo, e conseguinte escolhas por produtos com características nutricionais diferenciadas. Evidentemente as características sensoriais das amostras pode elucidar em sua preferência, que nesse estudo houve predileção por amostras com nível de açúcar reduzido, em detrimento às amostras com elevado teor de açúcar (E) e (F).

Tabela 5. Perfil sócio demográfico dos consumidores (%).

	Total (%)	n
Gênero		
Feminino	42	38
Masculino	58	52
Idade		
18-25	23	21
26-35	31	28
36-45	17	15
46-55	19	17
56-65	8	7
>66	2	2
Escolaridade		
Fundamental	1	1
Médio incompleto	1	1
Médio	4	4
Superior incompleto	21	18
Superior	19	17
Pós-graduação	54	49

Os resultados do presente estudo expressam, assim, a preferência entre os consumidores pelas amostras com teores de açúcar mais baixos e intermendiários em contraponto às amostras mais doces, além da preferências das amostras com maior proporção de mamão em sua formulação, conforme observado pelo Mapa de Preferência Interno apresentado na Figura 2.

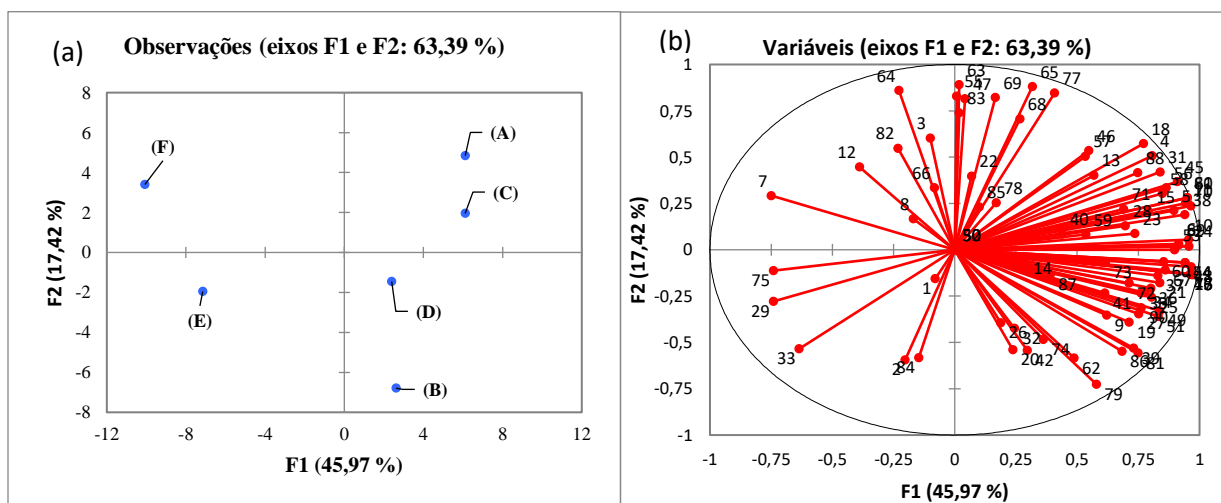


Figura 2. Mapa de Preferência Interno. Posicionamento das amostras de bebida láctea fermentada (a) e a posição dos avaliadores (b).

As seis amostras são apresentadas na Figura 2 (a) e a distribuição dos 90 consumidores na Figura 2 (b). A soma dos componentes 1 e 2 (F1 e F2) representou 63,39% da variação dos dados. Pela Figura 2a, é possível identificar a proximidade entre as amostras (A) e (C) confirmando, assim, a preferência entre os consumidores. Por outro lado, a amostra (F)

localizada no lado oposto denota correlação negativa com as amostras citadas anteriormente, sendo a menos preferida no estudo de aceitação entre as amostras. A distribuição apresentada na Figura 2(b) corrobora com a média de aceitação das amostras, de tal modo que evidencia a preferência dos consumidores pelas amostras com menores teores de açúcar, resultado esperado dentro da possível associação de alimento funcional com teor de açúcar reduzido, relativos a benefícios para a saúde. Espera-se que os consumidores rejeitem produtos com redução de açúcar que não atendam às suas expectativas sensoriais, mesmo que sejam mais saudáveis do que os produtos comuns (CIVILLE e OFTEDAL, 2012). Portanto, enfatizar os aspectos relacionados à saúde da redução de açúcar pode criar expectativas sensoriais negativas e diminuir a avaliação do produto (BRUNNER et al., 2010; LÄHTEENMÄKI et al., 2010). Por outro lado, considerando que a maioria dos consumidores não estão dispostos a desistir dos aspectos sensoriais dos produtos alimentícios, mesmo que seu consumo possa prejudicar a saúde, os consumidores podem reagir positivamente a alegações relacionadas sobre a redução do açúcar (VERBEKE, 2005; CIVILLE E OFTEDAL, 2012).

De acordo com a Tabela 6, os atributos que mais foram marcados pelos consumidores foram: Cor atrativa, sabor de laranja e boa consistência.

Tabela 6. Frequência (%) que cada um dos termos do questionário CATA foi marcado para descrição sensorial das amostras de bebida láctea fermentada.

Características	A	B	C	D	E	F
<i>Ácido</i>	8,64	22,22	18,52	14,81	45,68	38,27
<i>Pouco ácido</i>	20,99	22,22	19,75	22,22	23,46	25,93
<i>Muito doce</i>	27,16	7,41	30,86	7,41	0,00	1,23
<i>Doce</i>	38,27	35,80	32,10	33,33	7,41	4,94
<i>Tem equilíbrio</i>	46,91	28,40	40,74	56,79	27,16	30,86
<i>Boa consistência</i>	77,78	49,38	66,67	58,02	33,33	34,57
<i>Pouco consistente</i>	8,64	22,22	13,58	18,52	32,10	43,21
<i>Cor atrativa</i>	72,84	60,49	66,67	59,26	51,85	49,38
<i>Sabor de fermentado</i>	39,51	43,21	38,27	41,98	54,32	46,91
<i>Sabor de laranja</i>	54,32	76,54	71,60	59,26	53,09	44,44
<i>Sabor de mamão</i>	59,26	40,74	40,74	53,09	27,16	35,80
<i>Aroma de fermentado</i>	25,93	38,27	24,69	30,86	35,80	30,86
<i>Aroma doce</i>	29,63	17,28	23,46	17,28	9,88	9,88
<i>Aroma suave</i>	41,98	45,68	43,21	49,38	37,04	34,57
<i>Aparência homogênea</i>	55,56	35,80	49,38	43,21	38,27	33,33
<i>Arenosa</i>	3,70	14,81	4,94	6,17	8,64	9,88

Para as amostras melhores avaliadas (A), (C) e (D) os atributos relacionados aos sabores de frutas e boa consistência foram os mais citados, o que pode ter contribuído com as médias de aceitação obtidas. Por sua vez, as amostras com menores médias de aceitação, (E) e (F), os atributos mais citados foram sabor de fermentado, cor atrativa e ácido. A Figura 3 apresenta os principais atributos impactantes nas amostras de bebida láctea fermentada.

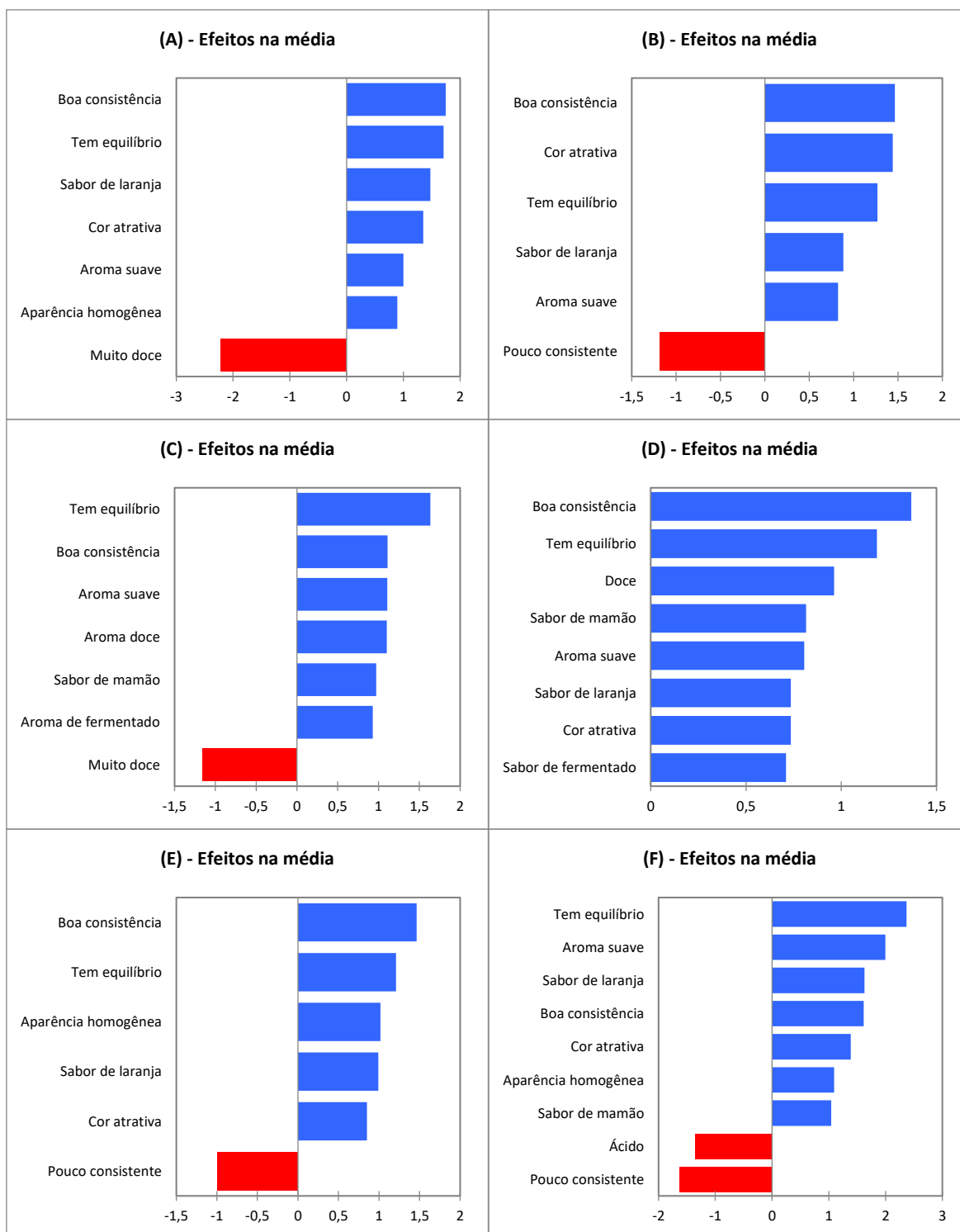


Figura 3. Representação dos atributos do questionário CATA e dos efeitos na média de aceitação das amostras submetidas ao teste Q de Cochran.

O teste Q de Cochran foi utilizado para determinar que atributos influenciaram nas médias de aceitação das amostras (MANOUKIAN, 1986).

Para amostra (A), segunda melhor avaliada no estudo, *boa consistência* e *tem equilíbrio* elevaram a média da amostra. Por sua vez, há menção ao atributo *muito doce* como fator negativo e diminuindo a média de aceitação. Na amostra (B), os atributos *boa consistência* e

cor atrativa; influenciaram na média de aceitação. No que lhe diz respeito, o atributo *muito doce* foi influenciador negativo para a amostra (C), ainda assim, foi a melhor avaliada entre todas as seis amostras do estudo. Assim como, a amostra (A), o atributo *tem equilíbrio* foi o principal colaborador positivo para a média da amostra. Atributo *boa consistência* e *tem equilíbrio* foram determinantes na média da (D) e demonstra ser a única que não apresenta um atributo em específico como impactante na queda da média de aceitação. As amostras (E) e (F), as de menores médias de aceitação apresentaram similaridade quanto ao atributo *pouco consistente*. Em 3 das 6 amostras do estudo, o atributo *pouco consistente* foi mencionado como fator negativo, influenciando, portanto, as médias de aceitação das amostras. Por outro lado, os atributos *boa consistência* e *tem equilíbrio* foram mencionados como positivos em todas as amostras.

4 CONCLUSÕES

A bebida láctea fermentada sabor mamão e laranja adicionada de cultura probiótica mista mostrou-se adequada quanto aos requisitos de seguridade microbiológicos no início do armazenamento refrigerado, sendo viável para propiciar as características funcionais concernentes à viabilidade e população requeridas de microrganismos probióticos. A utilização de probióticos em conjunto com as formulações com maiores níveis de açúcar, conforme igualmente constatado em outros estudos, apresentou as maiores enumerações de *L. acidophilus* e sensorialmente obtiverem as menores avaliações no tocante a aceitação global. As amostras (A) (40g de açúcar e 180mL de polpa de mamão e 120mL de polpa de laranja) e (C) (70g de açúcar, e 180mL de polpa de mamão e 120mL de polpa de laranja) foram descritas pela análise CATA como apresentando *boa consistência, tem equilíbrio, aroma suave, cor atrativa e aparência homogênea*. Por sua vez, as amostras (E) (100g de açúcar, e 180mL de polpa de mamão e 120mL de polpa de laranja) e (F) (70g de açúcar, e 150mL de polpa de mamão e 150mL de polpa de laranja) apresentaram correlação com atributos como *pouco consistente e ácido* e a maior concentração de açúcar utilizado nessas amostras pareceu determinante para a baixa média de aceitação, sugerindo que a rejeição pode ter sido influenciada por fatores extrínsecos as formulações, como por exemplo o local da análise. Deve-se considerar que estudos mais aprofundados sejam conduzidos relacionando-se o comportamento do consumidor a redução de açúcar nos alimentos. Tratando-se dos direcionamentos adotados para redução do teor de açúcar nas formulações dos alimentos, e conseqüentemente contribuindo para a queda contínua do consumo de açúcar, optou-se pela continuidade do experimento com a formulação com (40g) de açúcar, mesmo que estatisticamente não apresentasse diferença significativa com a amostra com (70g) de açúcar.

CAPÍTULO III

CARACTERIZAÇÃO DA BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA PRESSURIZADA ADICIONADA DE CULTURA MISTA PROBIÓTICA EM SEUS ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS, MICROBIOLÓGICOS E ACEITAÇÃO ENTRE CONSUMIDORES.

RESUMO

As tecnologias não convencionais de processamento de alimento, como a Alta Pressão Hidrostática, têm sido utilizadas no desenvolvimento de alimentos funcionais de alto valor agregado, que são apreciados pelos consumidores, que buscam por satisfação quanto à sabor, e benefícios nutricionais que são preservados com o emprego de métodos emergentes de conservação de alimentos. O objetivo desse estudo preconizou a caracterização da bebida láctea fermentada probiótica sabor mamão e laranja processada por alta pressão hidrostática, com baixo teor de açúcar quanto aos seus aspectos físico-químicos, microbiológicos e mensurar a aceitação entre os consumidores. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) para as análises de umidade, cinzas, nitrogênio total, proteína, extrato etéreo e pH. Foi observado que o tempo de incubação de 150 min a 43°C, foi suficiente para a base láctea das amostras atingir a faixa de pH desejada de 4,6-4,7. A análise instrumental de cor constatou prevalência do componente (b*) em relação ao componente (a*), o processo de alta pressão hidrostática aumentou os valores (b*) de todas as amostras pressurizadas. As análises microbiológicas de fungos filamentosos e leveduras mesmo no controle foi de $< 1,0 \times 10^1$ log UFC/mL não sendo possível avaliar o efeito do sorbato na conservação do produto. Estafilococos coagulase positiva, Coliformes 35 °C, Coliformes 45 °C e *Salmonella* sp. não apresentaram contagens durante os 35 dias de armazenamento. A enumeração de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 variou de 7,09 a 2,00 log UFC/mL durante ao armazenamento por 35 dias para amostra controle. As amostras pressurizadas 100MPa/5min, 200MPa/5min e 300MPa/5 min apresentaram contagem de 7,09 a 3,60 log UFC/mL, 7,06 UFC/mL a 3,46 log UFC/mL e 6,59 log UFC/mL, respectivamente durante o armazenamento por 35 dias. A enumeração de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 foram presentes em todos os 35 dias de armazenamento para todas as amostras. *Streptococcus thermophilus* mantiveram-se viáveis com aproximadamente 9 log UFC/mL ao longo de todo o período de armazenamento. A análise sensorial, em que foi avaliado a aceitação global das amostras foi realizada escala hedônica de 9 pontos com 51 consumidores. A aceitação global das amostras variou entre 6,1 para as amostras Sorbato e 200MPa e 6,3 para a amostra Controle. Todas as amostras satisfizeram as exigências legais e foram consideradas probióticas.

Palavras-chave: Alta pressão hidrostática, microbiologia, físico-química, probióticos.

ABSTRACT

Unconventional food processing technologies, such as Hydrostatic High Pressure, have been used in the development of high added value functional foods, which are appreciated by consumers, who seek for taste satisfaction, and nutritional benefits that are preserved with the employment of emerging methods of food conservation. The objective of this study was to characterize the probiotic fermented dairy beverage flavor papaya and orange processed by high hydrostatic pressure, with low sugar content in terms of its physicochemical and microbiological aspects and to measure acceptance among consumers. No significant differences ($p>0.05$) were observed for moisture, ash, total nitrogen, protein, ethereal extract and pH analyzes. It was observed that the incubation time of 150 min at 43 °C was sufficient for the dairy base of the samples to reach the desired pH range of 4.6-4.7. The instrumental color analysis verified the prevalence of component (b*) in relation to component (a*), the process of high hydrostatic pressure increased the values (b*) of all pressurized samples. Microbiological analyzes of filamentous fungi and yeasts even in the control were $<1.0 \times 10^1$ log CFU / mL and it was not possible to evaluate the effect of the sorbate on the conservation of the product. Coagulase positive Staphylococci, Coliforms 35 °C, Coliforms 45 °C and *Salmonella* sp. did not present counts during the 35 days of storage. The enumeration of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 ranged from 7.09 to 2.00 log CFU / mL during storage for 35 days for the control sample. The samples were pressurized 100MPa / 5min, 200MPa / 5min and 300MPa / 5min, counting from 7.09 to 3.60 log CFU / mL, 7.06 CFU / mL at 3.46 log CFU / mL and 6.59 log CFU / mL, respectively during storage for 35 days. The enumeration of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 were present in all 35 days of storage for all samples. *Streptococcus thermophilus* remained viable at approximately 9 log CFU / mL over the entire storage period. The sensorial analysis, in which the global acceptance of the samples was evaluated, was performed with 9 points hedonic scale with 51 consumers. The overall acceptance of the samples ranged from 6.1 for the Sorbato samples to 200MPa and 6.3 for the Control sample. All samples met the legal requirements and were considered probiotic.

Keywords: High pressure hydrostatic, microbiology, physicochemical, probiotics.

1. INTRODUÇÃO

Os consumidores nos dias atuais, mais conscientes com a saúde, são exigentes em relação a dieta, o que resulta em cada vez mais produtos inovadores, que se adequam às requisições, sobretudo com boas qualidades nutricionais e garantia de serem seguros quando consumidos. Em resposta, as indústrias oferecem várias opções a esses consumidores, buscando satisfazer essas demandas (BETORET et al., 2015; AVILA et al., 2018). E como consequência, há necessidade do desenvolvimento contínuo de novos processos alimentares, onde tecnologias não convencionais de processamento logram cada vez mais eficiência e competitividade nas pesquisas quanto ao desenvolvimento de novos produtos (AUGUSTO et al., 2018).

As tecnologias não convencionais de preservação de alimentos podem ser definidas como aquelas em que a temperatura não é o principal fator na inativação de microrganismos e enzimas (BARBA et al., 2012). O objetivo em aplicar essas tecnologias é inativar a atividade dos microrganismos deteriorantes e patogênicos presentes nos alimentos e também certas enzimas de interesse, sem destruir os componentes nutricionais e sensoriais que são normalmente afetados durante o tratamento térmico convencional (BARBA et al., 2012; CHIZOBA EKEZIE et al., 2018). A Alta Pressão Hidrostática é sugerida como método que pode contribuir para a melhoria de produtos lácteos, podendo ser aplicada ao leite cru para a produção de derivados lácteos ou ao produto final (TSEVDOU E TAOUKIS, 2011). Além da inativação microbiana, promove extensão da vida útil e pode ser aplicada as mais variadas matrizes alimentares (TRUJILLO et al., 2002).

Por sua vez, os conservantes são substâncias também utilizadas para promover a extensão da vida útil dos alimentos, inibindo a deterioração causada por microrganismos (SHEN et al., 2010). Sorbato de potássio ou ácido sórbico são aditivos químicos eficientes contra bactérias, bolores e leveduras e são comumente utilizados na indústria de alimentos. (DIBLAN E KAYA, 2018). Em 1999, a *Food and Drug Administration* - FDA reconhece os aditivos como seguros, e se declarado no rótulo, podem ser usados em alimentos (AMIRPOUR et al., 2015). Admitido seu uso em bebidas lácteas fermentadas desde que o limite máximo permitido não seja ultrapassado (BRASIL, 2005).

Produtos lácteos, principalmente produtos de fermentados de leite, podem ser suplementados com probióticos e prebióticos, devido sua estrutura coesiva, pH e teor de gordura, que exercem proteção aos probióticos durante a passagem pelo trato gastrointestinal (DA CRUZ et al., 2009). Leites fermentados apresentam modificações nutricionais, assim como suas características sensoriais e físico-químicas durante o processo de fermentação (AHTESH et al., 2017). Probióticos por definição são microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002). Usualmente, uma grande variedade de espécies e gêneros pode ser considerada potencial para inoculação em lácteos dentre essas cepas destaca-se as do gênero *Lactobacillus* (*Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. casei ssp. Rhamnosus*, *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lb. delbrueckii ssp. lactis*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*) e do gênero *Bifidobacterium* (*B. animalis*, *B. animalis ssp. lactis*, *B. infantis*, *B. longum*) (TRIPATHI E GIRI, 2014; KANDYLIS et al., 2016; SPERANZA et al., 2018).

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas lácteas assegura que o processo de fermentação durante o preparo das bebidas lácteas deve ser realizado por microrganismos específicos, tal como probióticos (BRASIL, 2005). As bebidas lácteas sabor mamão e laranja adicionada de cultura mista probiótica ABT-5 foram preparadas de acordo com a metodologia adaptada (MASSON, 2010). Após o preparo das amostras, foram realizadas análises microbiológicas de acordo com a Instrução Normativa nº 62, que oficializa os métodos analíticos para análises microbiológicas (BRASIL, 2003). Foram avaliadas as condições

microbiológicas, além da viabilidade microrganismos probióticos em triplicata e com três repetições das bebidas lácteas tratadas por alta pressão hidrostática e não tratadas por alta pressão hidrostática ao longo do armazenamento refrigerado a $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 35 dias.

As análises físico-químicas foram realizadas de acordo com a Normativa nº 68, em triplicata e com três repetições (BRASIL, 2006), para umidade, cinzas, nitrogênio total, extrato etéreo, pH e acidez total em ácido lácteo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo das Bebidas Lácteas

As bebidas lácteas fermentadas com probióticos sabor mamão e laranja foram preparadas, de acordo com o método apresentado no capítulo 2. Optou pela formulação com 70% de base láctea, 30% de suco de frutas e 4% de açúcar. O leite UHT foi substituído por leite pasteurizado (Figura 1). A produção foi realizada em planta piloto, em condições higiênico-sanitárias controladas, afim de minimizar a contaminação microbiológica.

A cultura probiótica mista em pó ABT-5 do tipo DVS *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Streptococcus thermophilus*, na concentração de 0,5g/L (Christian Hansen) foi inoculada na base láctea, em quantidade suficiente para que a bebida láctea fermentada apresentasse concentração mínima de 10^6 log UFC/g.

O Sorbato de potássio (MACALÉ) foi adicionado na concentração de 0,03g/L, conforme exigido pela legislação, logo após a adição da polpa de frutas a base láctea.

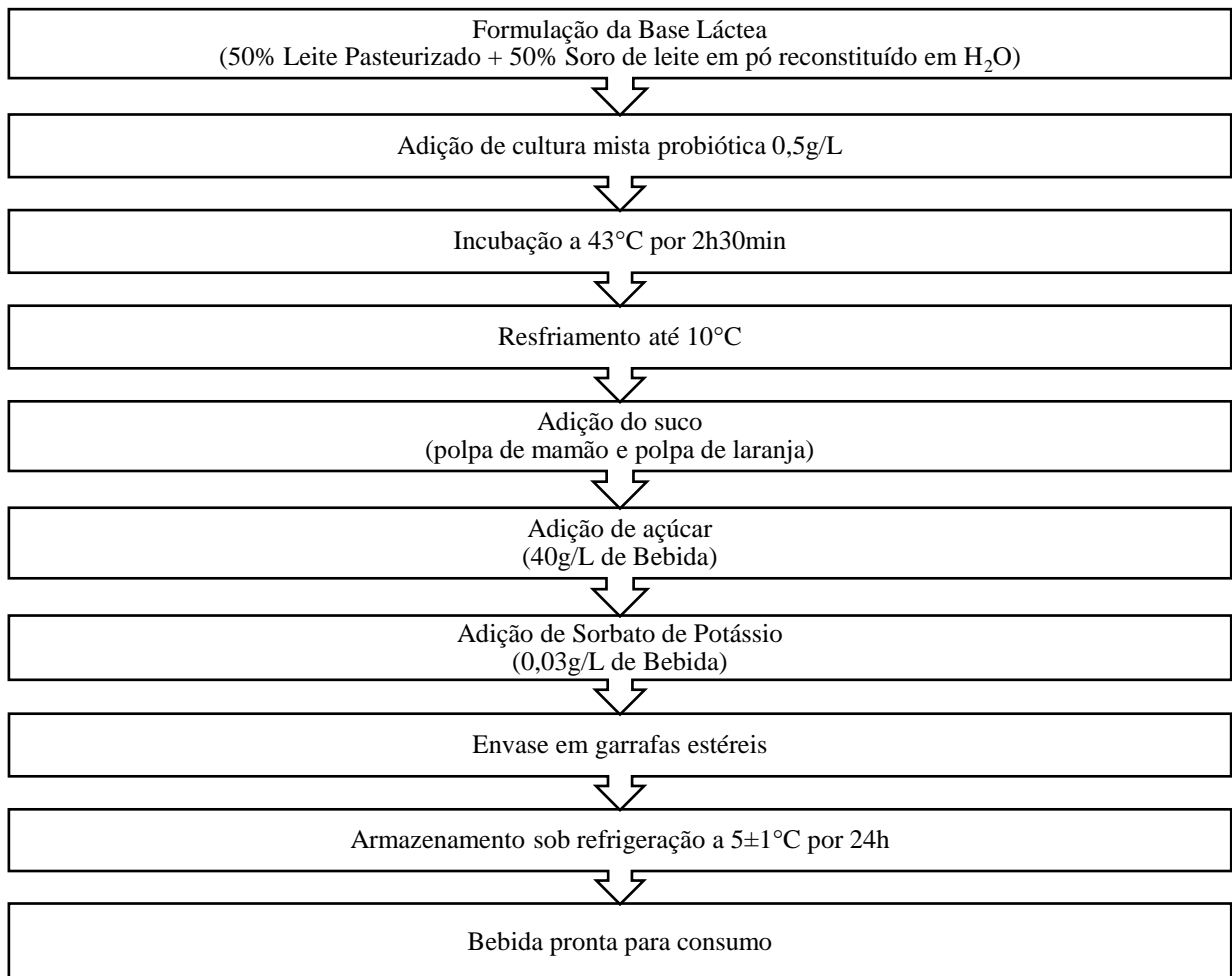


Figura 1. Fluxograma para o preparo das bebidas.

2.2 Aplicação da Alta Pressão Hidrostática

As bebidas lácteas fermentadas adicionadas de probióticas foram submetidas a três tratamentos de pressurização: 100MPa por 5 min, 200MPa por 5 min e 300MPa por 5min, apresentados na Tabela 1. O estudo foi conduzido em triplicata. A pressurização foi realizada no equipamento “*Fluid Power*” (“SFL-850-09-W, Stansted”, Reino Unido), com câmara de pressão de 180 mL e pressão de operação máxima nominal de 900 MPa. As bebidas lácteas pressurizadas e as amostras não pressurizadas (controle e sorbato) foram armazenadas a 5 ± 2 °C.

2.3 Design experimental

As bebidas lácteas pressurizadas e não pressurizadas foram armazenadas a 5 ± 2 °C e submetidas à análise físico-química com 1 dia, enumeração de probióticos e caracterização microbiológica com 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias.

Tabela 1. Design das seis amostras utilizadas no estudo.

Amostras	Tratamentos
Controle	Sem tratamento
Sorbato	Controle+Sorbato
100MPa	Amostra pressurizada a 100MPa/5min
200MPa	Amostra pressurizada a 200MPa/5min
300MPa	Amostra pressurizada a 300MPa/5min

2.4 Análises Físico-químicas

As análises físico-químicas das bebidas lácteas fermentada foram realizadas de acordo com a IN n° 68, em triplicata e com duas repetições (BRASIL, 2006), composta por umidade, cinzas, nitrogênio total, extrato etéreo, pH e acidez total em ácido láctico.

2.4.1 Umidade

Para a realização da análise de umidade, foram pesadas cerca de 2 mL da amostra de bebida láctea fermentada em pesa-filtro, com adição de areia e bastão, secos a 70 °C e devidamente tarados. A amostra foi aquecida durante 5 horas em estufa (vácuo a 70 °C), sob pressão de 70 mm de mercúrio (Hg). As amostras, resfriadas em dessecador até a temperatura ambiente, foram posteriormente pesadas. Esta operação de aquecimento e resfriamento foi repetida até obtenção de peso constante (AOAC, 1996). Foi adotada a seguinte fórmula para cálculo da umidade neste método:

(%) de *umidade* = $(100 \times N) / P$ onde:

N = massa de água evaporada (g) P = massa da amostra (g)

2.4.2 Cinzas

A determinação das cinzas foi feita em mufla, à temperatura de 550°C. As amostras, previamente secas em cadinhos, foram levadas à mufla e incineradas, sendo os cadinhos posteriormente resfriados em dessecador e pesados. Os resultados foram expressos em porcentagem de cinzas, de acordo com a seguinte fórmula (BRASIL, 2006):

$$\% \text{ de cinzas} = [(m2-m0)/(m1-m0)].100 \text{ onde:}$$

$m0$ = massa do cadinho vazio;

$m1$ = massa da amostra incinerada somada ao peso do cadinho;

$m2$ = massa da amostra úmida somada ao peso do cadinho.

2.4.3 Nitrogênio total

O método do Micro Kjeldahl nº 920.87 da Aoac (2000) foi utilizado para a realização da análise de nitrogênio total. As amostras foram digeridas em bloco digestor e destiladas. Após as amostras foram pesadas em balança analítica, com uma alíquota de 0,25 mL de amostra transferidos para o tubo de Kjeldahl. Em seguida 2,5 g de mistura catalítica [Sulfato de potássio p.a. e Sulfato de cobre penta-hidratado p.a., na proporção de 10+1] e 7 mL de ácido sulfúrico p.a foram adicionados à amostra. Em bloco digestor, a mistura foi aquecida elevando-se, gradativamente, a temperatura até chegar a 400 °C, até que o líquido estivesse límpido e transparente, com tonalidade azul-esverdeada, deixada em seguida esfriar e adicionado 10 mL de água destilada. Já na etapa de destilação, um erlenmeyer contendo 20 mL de solução de ácido bórico a 4% (m/v), com 8% de solução indicadora mista [0,132 g de vermelho de metila e 0,06 g de verde de bromocresol em 200 mL de solução de álcool etílico a 70 % (v/v)], foi adicionado ao frasco de coleta do destilado. Ao tubo de Kjeldahl foi adicionado cerca de 20 mL de uma solução de hidróxido de sódio a 50% (m/v), até que ela se tornasse negra e promovesse a reação e desprendimento do destilado. Para a titulação do destilado foi utilizado uma solução de ácido clorídrico 0,1 N até ocorrer a viragem do indicador. O resultado em percentual de nitrogênio total foi obtido pela seguinte fórmula (BRASIL, 2006):

$\% \text{ Nitrogênio total} = (V.N.F. 0,0014. 100) / m$ onde:

V = solução de ácido clorídrico 0,1N (utilizado na titulação);

N = normalidade teórica da solução de ácido clorídrico 0,1N;

f = fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1N;

m = massa da amostra em gramas.

Para obtenção do percentual de proteína bruta presente nas bebidas lácteas fermentadas, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Proteína bruta} = \% \text{ Nitrogênio total} . F, \text{ onde:}$$
$$F \text{ (Fator de conversão para leite e derivados)} = 6,38$$

2.4.4 Extrato etéreo

Para verificação de extrato etéreo presente nas amostras, foi utilizado o método de hidrólise ácida, de acordo com a Instrução Normativa Nº 68, de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006). Foram pesados 3mL de bebida láctea fermentada, alocada diretamente no copo do butirômetro. Adicionou-se 5 mL de água destilada a 65 °C, 10 mL de solução de ácido sulfúrico (d= 1,820) e 1 mL de álcool isoamílico. O butirômetro foi mantido em banho-maria (manutenção da temperatura a 65 °C) e agitado para que toda a amostra fosse dissolvida. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 1200 rpm em centrífuga por 5 min. Em seguida foi realizada diretamente a leitura do teor de gordura.

2.4.5 pH

Realizada conforme metodologia nº 981.12 estabelecida pela Aoac (2010), foram homogeneizados 10 g de amostra em 100 mL de água destilada aquecida a 25°C, sendo as leituras realizadas diretamente em potenciômetro digital previamente calibrado.

2.4.6 Acidez total

Para aferição de pH e análise de acidez, inicialmente foram pesados 10mL de amostra de bebida láctea fermentada em béquer e adicionado 50 mL de água destilada aquecida a 50 °C. A amostra foi agitada com bastão de vidro até que estivesse dissolvida. A solução foi transferida para balão volumétrico de 100 mL e avolumado com água destilada. Após esta etapa, uma alíquota de 50 mL foi transferida para um erlenmeyer, resfriada, acrescentadas de 0,15mL de solução alcoólica de fenolftaleína a 1% (m/v), sendo titulada com solução NaOH 0,1 mol/mL até obtenção da coloração rósea por 30 seg. Para o cálculo da acidez, foi utilizada a seguinte fórmula:

$\% \text{Ácido láctico} = (f \cdot V \cdot 0,09 \cdot n \cdot 100) / m$, onde:

V = volume de solução de hidróxido de sódio 0,1 N (utilizado para titulação, em mL);

m = massa da amostra (em gramas);

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

0,09 = fator de conversão do ácido láctico; e

N = normalidade de solução de hidróxido de sódio 0,1 N.

Após os cálculos, os resultados foram expressos em gramas de ácido láctico por 100g.

2.4.7 Análise Instrumental de Cor

A análise instrumental de cor dos diferentes tratamentos de bebida láctea fermentada foi realizada no tempo dia 1 de armazenamento. Foram determinados os parâmetros de cor por refletância no equipamento Color Quest XE, com escala CIELAB e CIELCh, com abertura de 0.375 mm de diâmetro, iluminante D65/10. Os parâmetros medidos foram luminosidade (L^*), na escala de 0 (preto) a 100 (branco), (a^*) na escala de verde (-80 até 0) a vermelho (0 até +100) e (b^*) na escala de azul (-100 até 0) a amarelo (0 até +70).

2.5 Caracterização microbiológica e enumeração de probióticos

Para certificar-se sobre os efeitos desejados sobre a saúde foram realizadas análises de viabilidade de probióticos em triplicata durante os 35 dias de armazenamento refrigerado a 5 ± 1 °C. Alíquotas de 25 g de cada amostra de bebida láctea fermentada foram assepticamente pesadas em sacos plásticos estéreis e homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1%. Diluições decimais a partir da diluição 10^{-1} foram preparadas em tubos contendo 9,0 mL de água peptonada 0,1%. Além da enumeração seletiva de probióticos, houve contagem de fungos filamentosos e leveduras, contagem de Estafilococos coagulase positivo, Coliformes termotolerantes a 35 °C e Coliformes a 45 °C Aoac (2002) e detecção de *Salmonella* sp realizada por amostras compostas em equipamento Minividas. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, conforme instrução normativa n°62 (BRASIL, 2003).

2.5.1 Preparo dos meios

MRS Agar foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. Logo após o meio foi autoclavado a 121 °C por 15 min. Para o preparo da solução de bile, 10g bile (B3883 – Sigma-Aldrich Co., St.Louis, USA) foram dissolvidas em 100 mL de água purificada, e a solução autoclavada a 121 °C por 15 min. Imediatamente antes do uso, 1,5 mL da solução de bile foi adicionada em 100 mL do meio MRS ágar (IDF, 1995). Para enumeração de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, o meio seletivo oligossacarídeo transgalactosilado (TOS) foi preparado assepticamente de acordo com as instruções do fabricante. Após a etapa de preparo foi autoclavado a 121 °C por 15min. Já para a contagem de *Streptococcus thermophilus* foi utilizado o M17 ágar, preparado de acordo com as recomendações do fabricante. O meio foi autoclavado a 121 °C por 15min. Para a solução de lactose, 10g de lactose foram dissolvidas em 100 mL de água purificada e autoclavada a 121 °C por min. Imediatamente antes do uso, 5 mL da solução de lactose foi adicionada a 95 mL de M17 ágar (ISO, 2002).

2.5.2 Enumeração seletiva de *Lactobacillus acidophilus* LA-5

Dentre as metodologias, o ágar MRS De Man Rogosa Sharpe (DE MAN et al., 1960) contendo bile e incubado a 37 °C por 72h em jarras de anaerobiose usando Anaerocult A (Merck, 1.13829, Germany) foi descrita por (IDF, 1995). A inoculação das placas ocorreu em superfície com a transferência de 0,1 mL das amostras e com auxílio da alça de drigalski foi realizada a distribuição homogênea em toda a superfície do meio solidificado nas placas de Petri.

2.5.3 Enumeração seletiva de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12

O método ISO 29981 foi utilizado para enumeração seletiva de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12. O método é aplicável a produtos lácteos, como leites fermentados e não fermentados, onde estes microrganismos estão presentes e viáveis, e em combinação com outras bactérias lácticas. As bifidobactérias usadas em produtos lácteos geralmente pertencem às espécies: *Bifidobacterium adolescentis*; *B. animalis* subsp. *animalis*; *B. animalis* subsp. *lactis*; *B. bifidum*; *B. breve*; *B. infantis*; *B. longum* (ISO, 2010).

Cerca de 1mL das amostras foram inoculadas em profundidade em meio de cultura contendo oligossacarídeo transgalactosilado (TOS) e homogeneizadas suavemente movendo-se as placas de Petri em movimentos circulares. Imediatamente após a solidificação dos meios, as placas foram incubadas em jarra de anaerobiose usando Anaerocult A (Merck, 1.13829, Germany) e incubadas a 37 °C por 72h.

2.5.4 Enumeração seletiva de *Streptococcus thermophilus*

As diluições foram inoculadas em profundidade em meio de cultura M-17 Ágar (Sigma - Aldrich, St. Louis MO, USA) suplementado com 5g/L de Lactose e homogeneizadas suavemente. Imediatamente após a solidificação dos meios, as placas foram incubadas em jarra de anaerobiose usando Anaerocult A (Merck, 1.13829, Germany) e incubadas a 37 °C por 72h.

O processamento e análises microbiológicas foram realizados em triplicata e, para cada diluição, o plaqueamento foi realizado em duplicata, com três repetições do processo, a fim de elevar a confiabilidade dos resultados.

2.6 Análise sensorial

Os participantes avaliaram a aceitação global das amostras utilizando escalas hedônicas horizontais de 9 pontos, variando de “desgostei extremamente” (1) a “gostei extremamente” (9). Os dados foram analisados por ANOVA. E as diferenças de médias comparadas pelo Teste de Tukey, ao nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

2.7 Análises estatísticas

Os resultados foram tratados estatisticamente por Análise de variância (ANOVA), e as diferenças de médias comparadas por teste de Tukey com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) para todas as análises, utilizando-se o *software* XLSTAT versão 2016.02.28451 (ADDINSOFT, 2016)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização Físico-químicas

O perfil físico-químico das amostras de bebida láctea fermentada, suas médias e os respectivos desvio-padrão das amostras Controle, Sorbato, 100MPa, 200MPa e 300MPa após o primeiro dia de armazenamento são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores médios obtidos das análises de Umidade, Cinzas, Nitrogênio Total, Proteína e Extrato Etéreo das amostras Controle, Sorbato, 100MPa, 200MPa e 300MPa de bebida láctea fermentada após o primeiro dia de armazenamento a 5 ± 1 °C.

Tratamento	Análise				
	Umidade (g/100g)	Cinzas (g/100g)	Nitrogênio Total (g/100g)	Proteína (g/100g)	Extrato Etéreo (g/100g)
Controle	86,34 ± (0,16) ^a	0,52 ± (0,06) ^a	0,30 ± (0,01) ^a	1,89 ± (0,05) ^a	1,25 ± (0,18) ^a
Sorbato	86,27 ± (0,24) ^a	0,54 ± (0,06) ^a	0,31 ± (0,01) ^a	1,97 ± (0,08) ^a	1,40 ± (0,42) ^a
100MPa	86,39 ± (0,25) ^a	0,56 ± (0,07) ^a	0,31 ± (0,01) ^a	1,99 ± (0,05) ^a	1,26 ± (0,29) ^a
200MPa	86,35 ± (0,19) ^a	0,52 ± (0,12) ^a	0,30 ± (0,02) ^a	1,94 ± (0,10) ^a	1,25 ± (0,12) ^a
300MPa	86,31 ± (0,18) ^a	0,56 ± (0,06) ^a	0,30 ± (0,01) ^a	1,89 ± (0,09) ^a	1,34 ± (0,12) ^a

Tratamentos: Controle – sem pressurização; Sorbato – adicionado de Sorbato de Potássio (0,03g/L) e sem pressurização; 100 – Pressurização a 100MPa/5min; 200 – Pressurização a 200MPa/5min; 300 Pressurização a 300MPa/5min.

(*) Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Pode-se observar que entre os tratamentos aplicados as bebidas, quanto ao teor de umidade, cinzas, nitrogênio total, proteínas e extrato etéreo por se tratarem de formulações idênticas entre si, exceto a amostra Sorbato, conforme esperado, não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$). Com relação ao percentual de umidade, os valores obtidos (86,27% a 86,39%) são superiores aos valores em estudo de Costa et al. (2013) que em suas formulações de bebidas lácteas fermentadas constituídas de leite pasteurizado e soro de leite obtiveram resultados (79,97% a 80,42% de umidade) e atribuíram os valores, a utilização de leite integral em suas formulações, o que seria determinante para o maior conteúdo de sólidos totais o que acarretaria em diminuição do teor de umidade. Em comum ao estudo anterior, Masson (2010) atribuiu a redução da umidade (93,26% a 84,19%), em estudo de bebida láctea fermentada tratada por alta pressão ao aumento significativo do teor de sólidos totais.

Nas amostras avaliadas os teores de cinzas oscilaram entre (0,52 a 0,56 g/100g). Resultado semelhante encontrado por Cunha et al. (2008) na avaliação físico-química de bebida láctea com 70% de leite de integral pasteurizado e 30% de soro de queijo que obtiveram (0,60%) de teores de cinzas. Thamer e Penna (2006) avaliaram a caracterização de bebidas lácteas fermentadas funcionais adicionadas de frutooligossacarídeos e cultura mista de probióticos (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus acidophilus*). Em suas formulações preparadas com 8% de açúcar obtiveram (0,53%) de teor de cinzas. Os valores apresentados na Tabela 2.1 encontram similaridade com estudo de Costa et al. (2013), que obtiveram teores de cinzas (0,59 a 0,62%).

A legislação brasileira, estabelece que valores acima de 1,0 g de proteínas/100g para bebidas lácteas fermentadas com adição, estão em conformidade com o padrão físico-químico estabelecido de proteína (BRASIL, 2005). Portanto, os valores médios de proteínas das amostras controle e 300MPa ambos iguais a (1,89 g/100g \pm 0,05), que no estudo foram os menores teores obtidos, estão de acordo com a legislação. Para os cálculos de proteínas, foi utilizado o fator de conversão para proteínas lácteas F=6,38. Resultados inferiores aos encontrados por Costa et al. (2013), que apresentaram valores de (2,21; 2,46; 2,58g/100g) que atribuíram à influência direta da utilização em suas formulações de estabilizantes/espessantes. Por sua vez, Thamer e Penna (2006), obtiveram em bebida láctea fermentada, com adição de 50% e 45% de soro, teores de proteínas de (1,93 a 2,46g/100g), respectivamente, e sugerem que esses estão diretamente relacionados a composição da bebida. Cunha et al. (2008) obtiveram valor igual (2,23g/100g), em bebida láctea formulada com 70% de leite integral e 30% de soro de leite, e atribuíram a adição de soro na formulação.

Os compostos de baixo peso molecular, responsáveis pelas características sensoriais e nutricionais dos alimentos, não são afetados pela pressurização, porém os componentes de alto peso molecular, como as proteínas, responsáveis pela estrutura e funcionalidade, são mais suscetíveis a alterações pela aplicação da Alta Pressão Hidrostática (CHAWLA et al., 2011; DE MORAIS et al., 2014). Quando submetidas a alta pressão hidrostática, as micelas de caseína se dissociam em partículas menores (sub-micelas) devido ao enfraquecimento das interações hidrofóbicas e eletrostáticas (LAW et al., 1998; HUPPERTZ et al., 2006; OLIVEIRA, 2013). Proteínas submetidas a pressões acima de 300MPa tendem a desnaturação irreversível, em comparação aos tratamentos a 100-300MPa em que a desnaturação é reversível (JAENICKE, 1981). Contudo, a adição de proteínas do soro promove proteção as micelas de caseína a ação da alta pressão (HARTE et al., 2007). Proteínas do soro, como β -lactoglobulina, são sensíveis a tratamentos de 100 a 200MPa, enquanto a α -lactoalbumina e albumina de soro bovino (BSA) são estáveis a pressões iguais ou até superiores a 400-500 MPa (DE MORAIS et al., 2014). Mesmo que estatisticamente não haja diferença significativa entre as amostras, o teor de proteínas foi aparentemente influenciado pela aplicação da alta pressão. Esse comportamento é demonstrado na Figura 2. A bebida láctea fermentada tratada a 100 MPa resultou no teor mais elevado de proteínas (1,99 g/100g), em seguida a bebida tratada a 200MPa com (1,94 g/100g) e com menor teor de proteínas, a bebida tratada a 300MPa com (1,86 g/100g). Corroborando com este estudo, Rodrigues (2016), em queijos pressurizados 300-500MPa/5min obteve maior teor de proteínas em queijos pressurizados quando comparados ao controle. Entre as amostras de maior teor de proteínas 100MPa e de menor teor 300MPa houve um decréscimo de aproximadamente 5%. Todas as amostras pressurizadas (100MPa, 200MPa e 300MPa) possuíram o mesmo tempo de processo de 5 min, e, portanto, o tempo não influenciou no estudo, sugerindo a possível influência do nível de pressão no teor de proteínas.

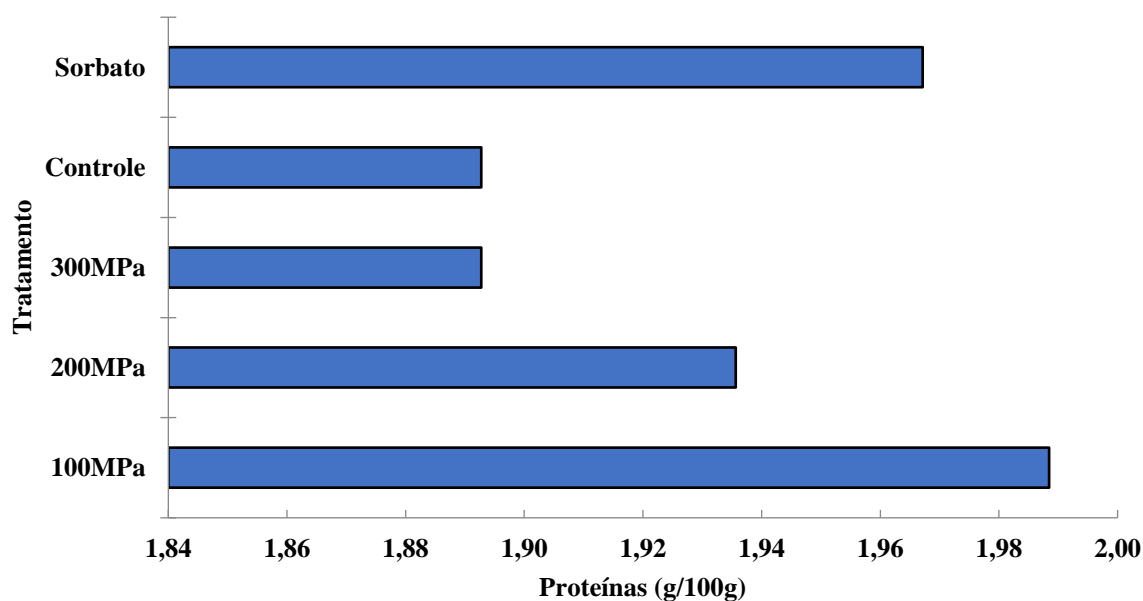


Figura 2. Perfil de proteínas em (g/100g) das bebidas lácteas fermentadas probióticas a base de laranja e mamão.

A análise de extrato etéreo em (g/100g) apresentou-se com valores variando de 1,25 a 1,40. O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea estabelece o padrão que as bebidas lácteas sem adições ou com adições devem ter no mínimo 2g/100g de matéria gorda de origem Láctea (BRASIL, 2005). E para a categoria de bebida lácteas fermentadas não há padrão estabelecido. Por sua vez, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Fermentado estabelece que os leites fermentados se classificam em: Integrais: aqueles cuja base láctea tenha um conteúdo de matéria gorda mínimo de 3,0 g/100g; Parcialmente desnatados: aqueles cuja base láctea tenha um conteúdo de matéria gorda máximo de 2,9 g/100g; Desnatados: aqueles cuja base láctea tenha um conteúdo de matéria gorda máximo de 0,5 g/100g (BRASIL, 2007). Thamer e Penna (2006) embasados pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Fermentado em seu estudo, sugerem que suas bebidas lácteas fermentadas com teores de gordura 0 e 0,10 % são classificadas como Bebidas Lácteas Fermentadas Desnatadas. Cunha et al. (2008) limitaram-se a citar que suas bebidas lácteas fermentadas com teores de 1,91 e 3,03%, estavam em similaridades com outros estudos. Enquanto Costa et al. (2013), obtiveram valores médios de 1,47 a 1,63% e ressaltam que o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea não estabelece o padrão para o teor de gordura de bebidas lácteas fermentadas.

Não são estabelecidos padrões para acidez total em ácido láctico e pH pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea. Já o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade Leites Fermentados descreve como padrão o teor de 0,6 a 2,0 g/100 g de ácido láctico. Os resultados de acidez total em ácido láctico e pH estão descritos na Tabela 3 e demonstrados na Figura 3.

Tabela 3. Acidez Total e pH das amostras Controle, Sorbato (0,03g/L), 100MPa/5min, 200MPa/5min e 300MPa/5min de bebida láctea fermentada após o primeiro dia de armazenamento a 5 ± 1 °C.

Tratamento	Análises	
	Acidez Total (em g Ácido Lático/100g)	pH
Controle	0,35 ± (0,01) ^{bc}	4,50 ± (0,20) ^a
Sorbato	0,35 ± (0,03) ^c	4,52 ± (0,18) ^a
100MPa	0,39 ± (0,01) ^a	4,44 ± (0,10) ^a
200MPa	0,37 ± (0,01) ^{abc}	4,45 ± (0,11) ^a
300MPa	0,38 ± (0,01) ^{ab}	4,50 ± (0,09) ^a

Tratamentos: Controle – sem pressurização; Sorbato – adicionado de Sorbato de Potássio (0,03g/L) e sem pressurização; 100MPa – Pressurização a 100MPa/5min; 200MPa – Pressurização a 200MPa/5min; 300MPa – Pressurização a 300MPa/5min.

(*) Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os tratamentos 100MPa/5min e 300MPa/5min apresentaram os maiores valores para acidez 0,39 e 0,38 g/100g respectivamente e o tratamento controle e sorbato apresentaram valores iguais a 0,35 g/100g. Há diferença significativa entre os tratamentos, de modo que as amostras pressurizadas não diferiram entre si, porém diferiram das amostras não pressurizadas (Controle e Sorbato). Apenas a amostra 200 MPa/5min não diferiu de nenhuma das outras amostras do estudo. Os valores de acidez das amostras de 0,35 a 0,39 g/100g são inferiores aos valores obtidos por Costa et al. (2013), que fermentaram suas amostras a 43 °C/5h e obtiveram variação na faixa de 0,55g/100 a 0,61g/100g de ácido lático, corroborando com a característica peculiar das bebidas lácteas fermentadas de acidez mais elevada e presença de metabólitos produzidos por bactérias ácido-láticas, que inibem o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis. Cunha et al. (2008) submetem as bases lácteas a fermentação a 40 °C até atingir pH 4,6, sem especificar o tempo. Suas bebidas lácteas obtiveram o teor de acidez de 0,72 e 0,70g/100g, também apresentaram resultados superiores ao estudo em questão e justificaram que os resultados obtidos foram influenciados pela adição de sacarose (10g/100g do volume de leite ou da mistura de leite e soro) nas formulações.

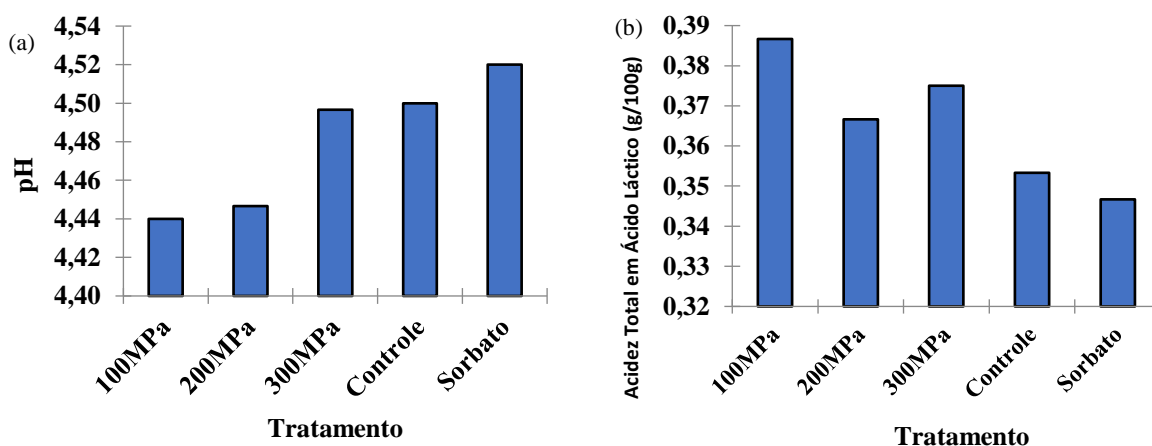


Figura 3. Perfil de pH (a) e Perfil de Acidez Total (expresso em Ácido Lático em (g/100g) (b) das bebidas lácteas fermentadas armazenadas sob refrigeração a 5 ± 1 °C.

A produção de ácido láctico deve ter contribuído para a desestabilização das micelas de caseína e, conseqüentemente, para evitar a formação do gel, além de proporcionar o seu sabor ácido característico, podendo também acentuar o aroma do produto. Durante a estocagem refrigerada das bebidas lácteas elaboradas pode ter também havido aumento da acidez titulável. Estas mudanças na acidez do produto ocorrem, em maior ou menor grau, dependendo da temperatura de refrigeração, do tempo de armazenamento, do poder de pós-acidificação das culturas utilizadas e também se relaciona às mudanças nos valores de pH (GURGEL e OLIVEIRA, 1995).

O tempo de incubação empregado para a fermentação a 43 °C, de 150 minutos, conforme mostrado na Figura 4, foi o suficiente para atingir o pH desejado de 4,69 definido como o ideal pela literatura (embora não o seja pela legislação para bebidas lácteas fermentadas), pois além do controle de microrganismos deteriorantes e patogênicos, interfere na viabilidade de culturas probióticas (VINDEROLA et al., 2000; THAMER E PENNA, 2006; CASAROTTI et al., 2014).

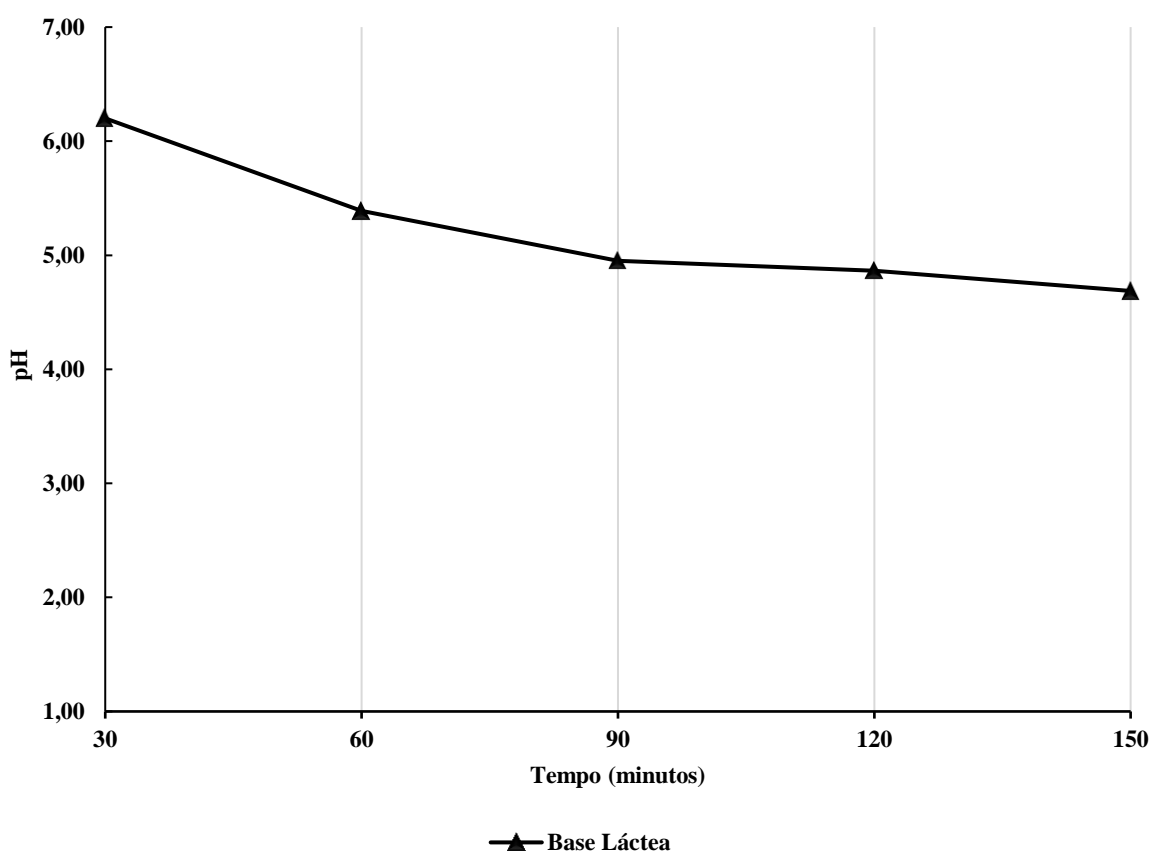


Figura 4. Curva de fermentação (pH vs. tempo) da base láctea utilizada para produção das bebidas lácteas fermentadas adicionadas de cultura mista probiótica: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus thermophilus*.

Thamer e Penna (2006) em seu trabalho de bebidas lácteas funcionais, incubaram suas amostras a 42 °C por 180 a 255 min quando o produto atingiu a faixa de pH 4,7-4,8. Sugeriram que as diferenças nos valores de pH e no tempo de fermentação condicionou-se ao tipo e porcentagem de cultura utilizada, à atividade desta cultura, ao valor estabelecido para finalizar fermentação, à quantidade de soro de leite utilizada na elaboração das bebidas lácteas, à adição de diferentes ingredientes, assim como o tempo de armazenamento. O período de fermentação, considerado ideal por Tamime e Deeth (1980), pode variar de 150 a 300 min, na faixa de 40-45 °C. O resultado obtido no experimento se assemelha aos trabalhos citados anteriormente. As

amostras de bebidas lácteas fermentadas foram avaliadas ao longo do armazenamento para verificar os valores de pH e suas respectivas variações. A amostra Sorbato aos 7 dias de armazenamento apresentou pH na faixa de 4,48 e aos 35 dias de armazenamento o valor de pH foi de 4,44. A amostra controle por sua vez aos 7 dias de armazenamento apresentou o pH na faixa de 4,44 e ao final do armazenamento o pH apresentou-se na faixa de 4,39. As amostras pressurizadas apresentaram o pH aos 7 dias na faixa de 4,45, 4,44 e 4,54 para as amostras 100/5min, 200/5min e 300/5min respectivamente. E aos 35 dias de armazenamento a faixa de pH obtida foi de 4,40, 4,34 e 4,51 para as amostras 100/5min, 200/5min e 300/5min respectivamente (Figura 5). Os valores de pH são cruciais para a sobrevivência dos probióticos, e ao longo do armazenamento a viabilidade de probióticos, dados apresentados no item 3.3, manteve-se satisfatória, caracterizando as amostras como bebidas probióticas.

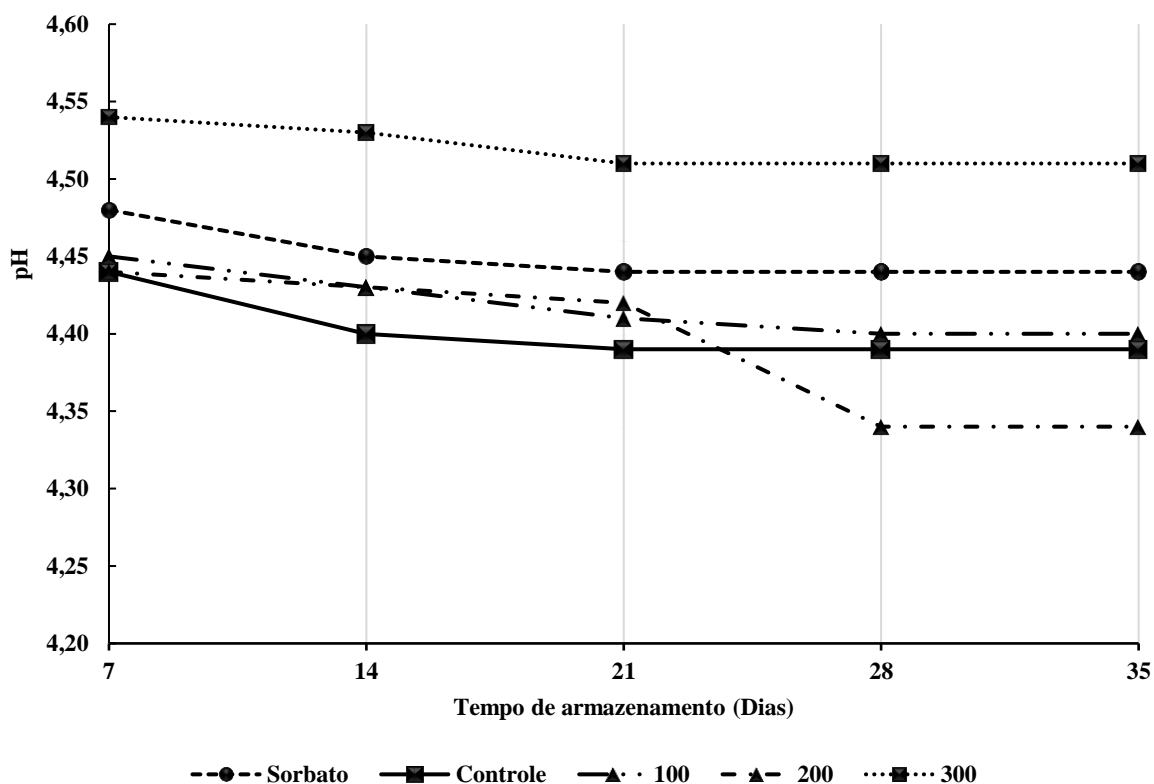


Figura 5. Perfil de pH das amostras de bebida láctea fermentada armazenadas sob refrigeração a 5 ± 2 °C durante 35 dias.

Às amostras pressurizadas pode-se atribuir a elevação do teor de ácido láctico a maior atividade metabólica das bactérias ácido lácticas, não verificado nas amostras não pressurizadas (Figura 5). A amostra 300MPa apresentou pH semelhante ao da amostra Controle, e possivelmente o nível de pressão aplicado acarretou na inibição parcial da atividade das culturas probióticas, exercendo controle na reação de pós acidificação. O fenômeno de pós acidificação pode ser descrito como uma diminuição nos valores de pH após a fermentação e durante o armazenamento refrigerado (LOURENS-HATTINGH, ANALIE e VILJOEN, BENNIE C, 2001). Tal decréscimo é de fundamental importância para viabilidade de microrganismos, principalmente para *Bifidobacteria* spp., que são mais sensíveis a faixas de pH mais ácidas (DA CRUZ et al., 2010). LANCIOTTI et al. (2004) sugerem que o tratamento por Alta Pressão Hidrostática em leite aumentou a viabilidade de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* durante o armazenamento refrigerado e favoreceu o crescimento de *Streptococcus thermophilus*, reduzindo o risco de pós-acidificação.

3.2 Análise instrumental de cor

Os valores médios da análise podem ser observados na Tabela 4. Foram observadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) para os parâmetros L^* , a^* e b^* entre os tratamentos.

Tabela 4. Análises instrumentais de cor nas amostras de Bebida Láctea Fermentada.

Tratamentos	Cor		
	L^*	a^*	b^*
100MPa	$72,77 \pm (0,19)^a$	$8,90 \pm (0,22)^b$	$25,52 \pm (0,24)^c$
200MPa	$69,74 \pm (0,04)^c$	$9,66 \pm (0,09)^a$	$27,51 \pm (0,08)^b$
300MPa	$70,17 \pm (0,43)^b$	$9,84 \pm (0,15)^a$	$28,31 \pm (0,30)^a$
Controle	$72,72 \pm (0,07)^a$	$8,71 \pm (0,05)^b$	$25,12 \pm (0,03)^d$
Sorbato	$72,68 \pm (0,05)^a$	$8,75 \pm (0,02)^b$	$25,02 \pm (0,07)^d$

Tratamentos: Controle – sem pressurização; Sorbato – adicionado de Sorbato de Potássio (0,03g/L) e sem pressurização; 100MPa – Pressurização a 100MPa/5min; 200MPa – Pressurização a 200MPa/5min; 300MPa Pressurização a 300MPa/5min.

(*) Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

O parâmetro L^* indica a luminosidade e a capacidade do objeto em refletir ou transmitir luz, com base em uma escala de 0 (preto) a 100 (branco). Assim, quanto maior o valor de L^* , mais claro o objeto. Os valores de L^* variaram de 69,74 a 72,77. Trujillo et al. (2002) condiz que o tratamento por alta pressão provoca alterações conformacionais nas micelas de caseína e a desintegração de micelas induzida pelo tratamento de alta pressão também afeta a cor do leite. O decréscimo no valor L^* pode ter sido principalmente devido à desintegração das micelas de caseína pela pressurização, que aumentam a translucidez do leite (JOHNSTON, 1995). Gervilla et al. (2001) contrasta com a afirmação, de modo que houve diminuição do parâmetro L^* e aumento do parâmetro (a^*) e parâmetro (b^*) quando leite de ovelha foi tratado por alta pressão. Em relação aos parâmetros (a^*) e (b^*), os quais representam os parâmetros de cor que varia de verde ao vermelho e azul ao amarelo, respectivamente, verifica-se uma maior influência do componente amarelo (b^*) em relação ao verde (a^*). O uso da Alta Pressão Hidrostática aumentou os valores (b^*) para todos os tratamentos. Houve diferença significativa entre os tratamentos e quando comparados ao controle. Assemelha-se ao observado por RODRIGUES (2016) em queijos tratados a 300MPa e 500MPa por 5 minutos. Juan et al. (2008) obtiveram maiores valores (b^*) em queijos tratados por alta pressão e sugerem que as mudanças estruturais produzidas pela alta pressão em proteínas da matriz poderiam explicar as diferenças de cor obtidas em queijos tratados a 300MPa durante 10 minutos. Em suco de laranja pressurizado a 520MPa por 6 minutos, Spira et al. (2018) observaram que os valores de (a^*) foram significativamente maiores para os sucos pressurizados em relação ao suco não processado. O mesmo foi observado para os valores (b^*), significando um aumento na cor amarela. Assim, como exemplificado na Figura 6, os resultados sugerem que as cores que mais contribuíram para as características das bebidas foram o branco e o amarelo.



Figura 6. Ilustração das diferenças de coloração das amostras de bebidas lácteas fermentadas. BLFB-S – Amostra Sorbato; BLFB-C – Amostra Controle; BLFB-1 – Amostra 100MPa; BLFB-2 – Amostra 200MPa; BLFB-3 – Amostra 300MPa.

3.3 Caracterização microbiológica e enumeração de probióticos

As análises microbiológicas foram realizadas afim de avaliar a conformidade das bebidas lácteas com a legislação, e a efetividade do tratamento de alta pressão em garantir a qualidade microbiológica do produto, ao longo do armazenamento. Os resultados das características microbiológicas dos tratamentos da bebida láctea fermentada são apresentados na Tabela 5. Para análise de *Salmonella* sp. foi realizada por amostras compostas, e observado ausência em todos os dias analisados. Foram conduzidas análises de Estafilococos coagulase positiva, que não foram detectados em todos os dias analisados. Igualmente, coliformes 35 °C e 45 °C não foram detectadas. Sendo assim, os resultados encontram-se dentro dos padrões microbiológicos exigidos pela legislação brasileira para bebida láctea fermentada refrigerada e com bactérias lácticas viáveis nos números mínimos (BRASIL, 2001). A alta pressão hidrostática e seus efeitos na qualidade microbiológica em produtos lácteos têm sido relatados (EVERT-ARRIAGADA et al., 2014; EVELYN e SILVA, 2015; PATRIGNANI e LANCIOTTI, 2016). Liu et al. (2017) em seus estudos com leite desnatado, relataram que o tratamento com alta pressão hidrostática a 500 MPa por 5 min reduziu as populações de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* de 6,5 log de UFC / mL ou superiores a menos de 1 log UFC / mL.

Tabela 5. Resultados das análises microbiológicas de Fungos filamentosos e leveduras, *Estafilococos* coagulase positiva, Coliformes 35 °C, Coliformes 45 °C e *Salmonella* sp., para as amostras de bebida láctea fermentada armazenadas durante 35 dias a 5 ±1 °C.

Análises microbiológicas	Tratamentos	Tempo (dias)					
		1	7	14	21	28	35
Fungos filamentosos e leveduras UFC/mL	Controle	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹
	Sorbato	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹
	100MPa	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹
	200MPa	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹
	300MPa	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹
Estafilococos coagulase positiva UFC/mL	Controle	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹
	Sorbato	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹
	100MPa	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹
	200MPa	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹
	300MPa	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹
Coliformes 35/45 °C UFC/mL	Controle	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹
	Sorbato	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹
	100MPa	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹
	200MPa	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹
	300MPa	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹	<1,0 x 10 ¹
<i>Salmonella</i> sp. em 25mL	Controle	Ausência	-	-	-	-	Ausência
	Sorbato	Ausência	-	-	-	-	Ausência
	100MPa	Ausência	-	-	-	-	Ausência
	200MPa	Ausência	-	-	-	-	Ausência
	300MPa	Ausência	-	-	-	-	Ausência

Tratamentos: Controle – sem pressurização; Sorbato – adicionado de Sorbato de Potássio (0,03g/L) e sem pressurização; 100MPa – Pressurização a 100MPa/5min; 200MPa – Pressurização a 200MPa/5min; 300MPa Pressurização a 300MPa/5min.

Já Arqués et al. (2006) observaram que pressões de 300 ou 400MPa melhoraram a qualidade e segurança microbiológica em queijo através da redução da contagem de microrganismos indesejáveis.

Resultados das análises dos probióticos, igualmente enumerados a cada 7 dias até os 35 dias de armazenamento refrigerado a 5 ± 1 °C. são apresentados na Tabela 6. As cepas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 exibiram maior resistência aos efeitos da alta pressão do que o *Lactobacillus acidophilus* LA-5. A média de viabilidade do BB-12 variou de 3,30 log UFC/mL aos 35 dias de armazenamento a 6,68 log UFC/mL no dia 1 de armazenamento. As amostras pressurizadas 100MPa e 200MPa se apresentaram com maiores níveis de contagem com a faixa de 6,68 log UFC/mL para a amostra 100MPa no início do armazenamento e 4,80 log UFC/mL aos 35 dias de armazenamento. Por sua vez, a amostra 200MPa mostrou-se inicialmente com 6,66 log UFC/mL e ao fim dos 35 dias de armazenamento com 5,40 log UFC/mL. Ambas as amostras demonstraram uma redução de menos de 2 log UFC/mL ao longo do armazenamento. Resultado equivalente foi obtido por Tsevdou e Taoukis (2011), que sugerem que o *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 em produtos lácteos tratados a 200MPa com tempo inferior a 20 min ou 300MPa com tempo de processo inferior a 10 min, manteve-se viável enquanto ao mesmo tempo contribuiu para a melhoria do sabor e da viscosidade. Em estudo de queijo Minas Frescal inoculado com BB-12 tratados a 200MPa/5 min e 350MPa/5min, Martins (2018), obteve contagem 7,38 log UFC/g e 6,26 log UFC/g respectivamente, no início do armazenamento, e 5,93 log UFC/g para amostra 200MPa e 4,52 log UFC/g para amostra 350MPa/5min ao final do armazenamento. Já a amostra 300MPa iniciou com 5,34 log UFC/mL e apresentou contagem aos 35 dias de 3,3 log UFC/mL.

As contagens de *Streptococcus thermophilus* apresentaram-se em aproximadamente 9 log UFC/mL ao longo de todo o período de armazenamento. Em estudo dos efeitos da subletalidade em probióticos inoculados em iogurtes, Mota et al. (2015) em suas amostras pressurizadas a 100MPa por 180 min obtiveram contagem de *Streptococcus thermophilus* de 7,82 log UFC/mL. Contrastando com os resultados apresentados, Pega et al. (2018), ao avaliarem o efeito da alta pressão hidrostática em bebidas fermentadas, obtiveram contagem após o primeiro dia de armazenamento a de aproximadamente 8 log UFC/mL para *Streptococcus thermophilus*. Já aos 30 dias de armazenamento as bebidas tratadas a 200MPa/10 min, similarmente apresentaram contagem de 7,9 log UFC/mL e as bebidas tratadas a 400MPa/1 min demonstraram uma redução de 5 log UFC/mL, e a contagem aproximada foi de 3 log UFC/mL. Os resultados apresentados na Tabela 2.5 mostram que todos os tratamentos aplicados as bebidas lácteas fermentadas foram eficazes para a sobrevivência do *Streptococcus thermophilus* e com contagem mínima de 8,17 log UFC/mL a exigência para alimento probiótico seria atendida. Uriot et al. (2017) enaltece que *Streptococcus thermophilus* é a única espécie de *Streptococcus* utilizada na indústria de alimentos.

Tabela 6. Enumeração de probióticos das bebidas lácteas fermentadas durante o armazenamento refrigerado a 5 ± 1 °C por 35 dias.

Análises	Tratamentos	Tempo (dias)					
		1	7	14	21	28	35
LA	Controle	7,09 ± (0,47) ^{Aa}	6,33 ± (0,76) ^{ABa}	4,93 ± (0,89) ^{Ba}	4,68 ± (1,02) ^{BCa}	2,20 ± (0,01) ^{BCa}	2,00 ± (0,01) ^{Ca}
	Sorbato	7,18 ± (0,71) ^{Aa}	6,25 ± (0,41) ^{ABa}	5,10 ± (0,98) ^{Ba}	4,90 ± (0,71) ^{BCa}	3,20 ± (1,70) ^{BCa}	<1,0 x 10 ¹ ± (0,01) ^{Ca}
	100MPa	7,09 ± (0,87) ^{Aa}	6,34 ± (0,21) ^{ABa}	5,57 ± (0,74) ^{Ba}	4,64 ± (0,92) ^{BCa}	3,83 ± (0,32) ^{BCa}	3,60 ± (0,01) ^{Ca}
	200MPa	7,06 ± (0,64) ^{Aa}	6,14 ± (0,01) ^{ABa}	5,29 ± (0,95) ^{Ba}	4,32 ± (0,11) ^{BCa}	3,81 ± (0,49) ^{BCa}	3,46 ± (0,01) ^{Ca}
	300MPa	6,59 ± (0,54) ^{Ab}	<1,0 x 10 ¹ ± (0,01) ^{ABb}	<1,0 x 10 ¹ ± (0,01) ^{Bb}	<1,0 x 10 ¹ ± (0,01) ^{BCb}	<1,0 x 10 ¹ ± (0,01) ^{BCb}	<1,0 x 10 ¹ ± (0,01) ^{Cb}
BB	Controle	6,63 ± (0,03) ^{Aab}	6,41 ± (0,35) ^{Aab}	6,24 ± (0,18) ^{ABab}	5,95 ± (0,54) ^{BCab}	5,65 ± (0,66) ^{Cab}	4,55 ± (0,01) ^{Dab}
	Sorbato	6,45 ± (0,23) ^{Ab}	6,43 ± (0,26) ^{Ab}	6,36 ± (0,11) ^{ABb}	6,03 ± (0,37) ^{BCb}	5,38 ± (1,27) ^{Cb}	4,12 ± (0,01) ^{Db}
	100MPa	6,68 ± (0,06) ^{Aab}	6,46 ± (0,25) ^{Aab}	6,36 ± (0,13) ^{ABab}	5,99 ± (0,58) ^{BCab}	5,88 ± (0,55) ^{Cab}	4,80 ± (0,01) ^{Dab}
	200MPa	6,66 ± (0,08) ^{Aa}	6,56 ± (0,22) ^{Aa}	6,53 ± (0,08) ^{ABa}	6,44 ± (0,05) ^{BCa}	5,98 ± (0,57) ^{Ca}	5,40 ± (0,01) ^{Da}
	300MPa	5,34 ± (0,17) ^{Ac}	4,83 ± (0,56) ^{Ac}	4,71 ± (0,73) ^{ABc}	4,07 ± (0,01) ^{BCc}	3,98 ± (0,01) ^{Cc}	3,30 ± (0,01) ^{Dc}
ST	Controle	8,42 ± (0,01) ^{Aa}	8,41 ± (0,01) ^{Aa}	8,43 ± (0,01) ^{Aa}	8,42 ± (0,01) ^{Aa}	8,41 ± (0,01) ^{Aa}	8,38 ± (0,04) ^{Aa}
	Sorbato	8,40 ± (0,01) ^{Ab}	8,35 ± (0,01) ^{Ab}	8,35 ± (0,01) ^{Ab}	8,32 ± (0,01) ^{Ab}	8,35 ± (0,01) ^{Ab}	8,34 ± (0,01) ^{Ab}
	100MPa	8,44 ± (0,01) ^{Aa}	8,42 ± (0,01) ^{Aa}	8,42 ± (0,01) ^{Aa}	8,43 ± (0,01) ^{Aa}	8,43 ± (0,02) ^{Aa}	8,43 ± (0,01) ^{Aa}
	200MPa	8,40 ± (0,01) ^{Ab}	8,39 ± (0,01) ^{Ab}	8,38 ± (0,01) ^{Ab}	8,37 ± (0,01) ^{Ab}	8,37 ± (0,01) ^{Ab}	8,35 ± (0,01) ^{Ab}
	300MPa	8,17 ± (0,01) ^{Ac}	8,21 ± (0,01) ^{Ac}	8,22 ± (0,01) ^{Ac}	8,20 ± (0,01) ^{Ac}	8,20 ± (0,02) ^{Ac}	8,20 ± (0,02) ^{Ac}

Tratamentos: Controle – sem pressurização; Sorbato – adicionado de Sorbato de Potássio (0,03g/L) e sem pressurização; 100MPa – Pressurização a 100MPa/5min; 200MPa – Pressurização a 200MPa/5min; 300MPa Pressurização a 300MPa/5min.

(*) Médias com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p>0,05).

(**) Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p>0,05).

Por ter sido consumida durante séculos sem causar qualquer doença, é também a única espécie de *Streptococcus* reconhecida como (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA). Usualmente utilizada como cultura ‘*starter*’ na produção de iogurtes, exerce interação com *Lb. Bulgaricus*, descrita como protocooperação (HOLS et al., 2005), onde o *Streptococcus thermophilus* promove rápida acidificação relacionada a produção de ácido láctico, mas também sintetiza produtos secundários, como acetaldeído ou diacetil contribuindo para características aromática e texturais do iorgute. A produção de CO₂ e ácido fórmico pelo *Streptococcus thermophilus* estimula o desenvolvimento *Lb. bulgaricus* que hidrolisa as proteínas do leite em peptídeos e aminoácidos que por sua vez, propiciam o desenvolvimento de *Streptococcus thermophilus* (PEREZ et al., 1991; HOLS et al., 2005; SIEUWERTS et al., 2008; URIOT et al., 2017). Estudos recentes apresentam evidências que o *Streptococcus thermophilus*, além de cultura ‘*starter*’ para o considerarem como microrganismo probiótico. Yerlikaya (2014) o apresenta como integrante de uma lista de microrganismos probióticos populares utilizados na produção de produtos lácteos funcionais. Uriot et al. (2017), elencam os possíveis benefícios de cepas de *Streptococcus thermophilus*, que apresentam a capacidade de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal e aderirem às células epiteliais intestinais, que é um dos critérios para seleção de cepa probiótica. O que aumentaria a colonização e consequente proteção do intestino do hospedeiro. Um grande número de estudos *in vivo* em animais e humanos mostrou efeitos benéficos, tais como, alívio da intolerância a lactose, prevenção da gastrite e prevenção de diarreia infecciosa (URIOT et al., 2017). Diante das informações supracitadas, com os dados obtidos e apresentados na Tabela 6, é notória a resistência do *Streptococcus thermophilus* aos tratamentos de alta pressão hidrostática aplicados, de modo que sugere-se grande potencial no desenvolvimento de lácteos pressurizados, como por exemplo, bebida láctea e iogurtes. A amostra Sobarto na enumeração de *Lactobacillus acidophilus* LA-5, não diferiu significativamente ($p > 0,05$) das demais amostras até os 28 dias de armazenamento, apresentando no primeiro dia de armazenamento 7,09 log UFC/mL, e $< 1,0 \times 10^1$ log UFC/mL aos 35 dias de armazenamento. Para *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 apresentou contagem no primeiro dia armazenamento 6,45 log UFC/mL e aos 35 dias de armazenamento, 4,12 log UFC/mL. E para *Streptococcus thermophilus* apresentou no primeiro dia de armazenamento 8,40 log UFC/mL, e aos 35 dias de armazenamento 8,34 log UFC/mL. A bebida láctea desenvolvida com a adição de sorbato pode ser considerada probiótica, ao longo de todo o período de armazenamento. O uso de conservantes, como sorbato, é umas das principais ferramentas para o controle de crescimento de microrganismos deteriorantes e extensão da vida útil de alimentos (EL-ZINEY, 2009). Porém, a busca por alimentos cada vez mais saudáveis, Augusto et al. (2018), com o mínimo de alterações sensoriais e seguros (BARBA et al., 2012), impulsionam o desenvolvimento de novos produtos com processos alternativos de conservação. A proposta de utilização desses processos, como a alta pressão hidrostática, é a inativação da atividade de microrganismos presentes nos alimentos, e também certas enzimas de interesse, sem comprometer os componentes nutricionais e sensoriais que normalmente são afetados pelo tratamento térmico (BARBA et al., 2013), atendendo a expectativa dos consumidores, e facultando o uso de conservantes nas formulações dos alimentos.

De acordo com a exigência da legislação, para o consumo em 100 g do alimento, deve-se apresentar 10⁶ a 10⁷ UFC/g de probióticos (BRASIL, 2008). As amostras se mantiveram com contagens de probióticos viáveis ao longo do armazenamento refrigerado. A alta pressão hidrostática mostrou-se promissora no desenvolvimento de bebidas lácteas fermentadas probióticas, de modo que, as amostras pressurizadas mantivera-se viáveis por 35 dias de armazenamento.

3.4 Teste de aceitação

Cinquenta e um consumidores voluntários não treinados, com idade entre 18 e 65 anos (sendo 35% homens e 65% mulheres) participaram do estudo de aceitação das bebidas lácteas fermentadas probióticas, o qual foi realizado na Embrapa Agroindústria de Alimentos.

Observa-se que as médias apresentadas na Tabela 7, não diferiram significativamente entre si ($p>0,05$), sendo a amostra controle com a maior média de aceitação (6,3). E as amostras Sorbato e 200MPa foram avaliadas com (6,1) igualmente.

Tabela 7. Médias de aceitação[§] das amostras de Bebida Láctea Fermentada Probiótica.

Aceitação (n=51)	Amostra		
	1 Controle	2 Sorbato	3 200MPa
	6,3 ± (1,96) ^a	6,1 ± (1,72) ^a	6,1 ± (1,58) ^a

(§) avaliada em escala hedônica de 9-pontos, variando de 1: desgostei muitíssimo a 9: gostei muitíssimo. Tratamentos: Controle – sem pressurização; Sorbato – adicionado de Sorbato de Potássio (0,03g/L) e sem pressurização; 100MPa – Pressurização a 100MPa/5min; 200MPa – Pressurização a 200MPa/5min; 300MPa Pressurização a 300MPa/5min.

(*) Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p>0,05$) pelo teste de Tukey.

O grupo de avaliadores foi composto por consumidores femininos (65%) jovens a adultos jovens e com elevado nível de escolaridade (pós-graduação). Característica íntinseca ao local da avaliação do estudo.

Tabela 8. Perfil sócio demográfico dos consumidores (%).

	Total (%)	n
Gênero		
Feminino	65	33
Masculino	35	18
Idade		
18-25	6	3
26-35	29	15
36-45	33	17
46-55	16	8
56-65	16	8
>66	0	0
Escolaridade		
Fundamental incompleto	0	0
Fundamental	0	0
Médio incompleto	4	2
Médio	4	2
Superior incompleto	8	4
Superior	12	6
Pós-graduação	73	37

4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos sobre a aplicação do processo de alta pressão hidrostática na bebida láctea fermentada, as condições de pressurização de 100MPa e 200MPa mantiveram a contagem de probióticos em níveis exigidos pela legislação, caracterizando o produto como potencialmente funcional, condicionado à sobrevivência dos microrganismos em tais níveis de contagens ao longo da passagem pelo trato gastrointestinal. As amostras apresentaram enumeração de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 ao longo do armazenamento refrigerado. Assim como, para *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 e *Streptococcus thermophilus*. Portanto, é a princípio possível a utilização desses microrganismos no desenvolvimento de produtos lácteos probióticos. As variáveis utilizadas no estudo da alta pressão hidrostática em comparação a utilização de conservante sorbato, sugerem que o emprego da tecnologia é viável para extensão da vida útil de lácteos funcionais, além do efetivo controle microbiológico em todos os níveis utilizados, dispensando o uso do aditivo sorbato. O processo também atenuou a pós acidificação, permitindo o desenvolvimento e viabilidade de cultura probiótica mista ao longo do armazenamento. As amostras estão dentro dos limites estabelecidos para proteínas e pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Fermentado são amostras de Bebida Láctea Fermentada parcialmente desnatada, além de possuírem o teor reduzido de açúcar em sua formulação. Mais pesquisas são necessárias para determinar se o processo alta pressão hidrostática pode ser aplicado em lácteos funcionais que utilizem culturas probióticas mistas e esclarecer as interações entre esses microrganismos e a viabilidade de ambos, a fim de alcançar produtos lácteos funcionais pressurizados com características adequadas para suprirem as demandas legais e mercadológicas.

CONCLUSÕES GERAIS

Bebidas lácteas fermentadas probióticas sabor mamão e laranja com teor de açúcar reduzido é um produto funcional desenvolvido com a utilização de tecnologia de processamento de alimentos não convencional, a alta pressão hidrostática. As bebidas mostraram-se excelente matrizes para inoculação de cultura mista probiótica apresentando contagens de microrganismos benéficos viáveis até aos 35 dias de armazenamento refrigerado.

A alta pressão hidrostática foi eficiente no controle de microrganismos deteriorantes e patogênicos. Condicionando todas as amostras às exigências estabelecidas pela legislação brasileira para segurança quanto ao consumo, e padrão higiênico-sanitário quanto ao processo de fabricação das bebidas. A utilização da alta pressão influenciou na coloração das amostras pressurizadas, de modo que a amostra 300MPa apresentou coloração mais acentuada quando comparada as amostras não pressurizadas. Além do controle microbiológico, a alta pressão hidrostática retardou a reação de pós acidificação, propiciando ambiente mais favorável ao desenvolvimento de probióticos.

Sugere-se que novos estudos sejam conduzidos, afim de se compreender o impacto da alta pressão nas características de produtos lácteos fermentados inoculados com culturas mistas e ou culturas isoladas de probióticos e entender a percepção dos consumidores ao potencial produto funcional desenvolvido. Deve-se considerar ainda, que estudos mais aprofundados sejam conduzidos relacionando-se o comportamento do consumidor a redução de açúcar nos alimentos, e dispensado sobretudo, a utilização de aditivos químicos e priorizando o desenvolvimento de novos produtos com elevada qualidade nutricional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADÍA-GARCÍA, L. et al. Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. **International Dairy Journal**, v. 33, n. 2, p. 191-197, 2013. ISSN 09586946.

ABRAS. Cresce disputa em lácteos funcionais. 2009. Disponível em: < www.abras.com.br/clipping.php?area%415&clipping%45854 >. Acesso em: 30 de Abril de 2018.

ADDINSOFT, S. XLSTAT software, version 2016.02.28451. **Paris, France**, 2016.

AHTESH, F. B.; STOJANOVSKA, L.; APOSTOLOPOULOS, V. Processing and sensory characteristics of a fermented low-fat skim milk drink containing bioactive antihypertensive peptides, a functional milk product. **International Journal of Dairy Technology**, 2017. ISSN 1471-0307. Disponível em: < <http://https://doi.org/10.1111/1471-0307.12479> >.

ALEXI, N. et al. Check-All-That-Apply (CATA) with semi-trained assessors: Sensory profiles closer to descriptive analysis or consumer elicited data? **Food Quality and Preference**, v. 64, p. 11-20, 2018/03/01/ 2018. ISSN 0950-3293. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0950329317302483> >.

ALI, Z. M.; CHIN, L.-H.; LAZAN, H. A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits. **Plant Science**, v. 167, n. 2, p. 317-327, 2004/08/01 2004. ISSN 0168-9452. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945204001530> >.

ALMEIDA, F.; DE PAULA, N.; PESSALI, H. Institutional entrepreneurship in building the Brazilian market of functional yogurts. **British Food Journal**, v. 116, n. 1, p. 2-15, 2014. ISSN 0007-070X.

ALVAREZ-SIEIRO, P. et al. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 7, p. 2939-2951, 2016. ISSN 1432-0614. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9> >.

AMIRPOUR, M. et al. Sodium benzoate and potassium sorbate preservatives in food stuffs in Iran. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 8, n. 2, p. 142-148, 2015/04/03 2015. ISSN 1939-3210. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/19393210.2015.1021862> >.

ANDRÉS, V.; VILLANUEVA, M.-J.; TENORIO, M.-D. Influence of high pressure processing on microbial shelf life, sensory profile, soluble sugars, organic acids, and mineral content of milk- and soy-smoothies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 98-105, 2016. ISSN 00236438.

ANDRES, V.; VILLANUEVA, M. J.; TENORIO, M. D. The effect of high-pressure processing on colour, bioactive compounds, and antioxidant activity in smoothies during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 192, p. 328-335, Feb 1 2016. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26304355> >.

ANVISA. Relatório de Gestão do Exercício de 2011. 2012. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/8ff3e1004ad59ec1a490afa337abae9d/RGp2011.pdf?MOD=AJPERES> >.

AOAC. **Official Methods of Analysis**. Arlington, EUA: Association of Official Analytical Chemists 1996.

_____. **Official Methods of Analysis**. EUA: Association of Official Analytical Chemist, 17 ed., 2ª rev. 2000.

_____. **Official Methods of Analysis**. EUA: Association of Official Analytical Chemists 2002.

_____. **Official Methods of Analysis**. EUA: Association of Official Analytical Chemists, 18 ed., 3ª rev, 2010.

ARES, G. Methodological challenges in sensory characterization. **Current Opinion in Food Science**, v. 3, p. 1-5, 2015/06/01/ 2015. ISSN 2214-7993. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799314000058> >.

ARQUÉS, J. et al. Inactivation of microbial contaminants in raw milk La Serena cheese by high-pressure treatments. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 3, p. 888-891, 2006. ISSN 0022-0302.

ASHRAF, R.; SHAH, N. P. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt — A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 3, p. 194-208, 2011/10/03/ 2011. ISSN 0168-1605. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160511004004> >.

ASIOLI, D. et al. Making sense of the “clean label” trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. **Food Research International**, v. 99, p. 58-71, 2017. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85024134494&doi=10.1016%2fj.foodres.2017.07.022&partnerID=40&md5=12d3d18ffa0d3896a8e9f4bb16a1e74d> >.

AUGUSTO, P. E. D.; TRIBST, A. A. L.; CRISTIANINI, M. Chapter 20 - High Hydrostatic Pressure and High-Pressure Homogenization Processing of Fruit Juices A2 - Rajauria, Gaurav. In: TIWARI, B. K. (Ed.). **Fruit Juices**. San Diego: Academic Press, 2018. p.393-421. ISBN 978-0-12-802230-6.

AVILA, J. A. D. et al. Use of nonthermal technologies in the production of functional beverages from vegetable ingredients to preserve heat-labile phytochemicals. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 2, p. e13506, 2018. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfpp.13506> >.

AZEDO, S. Alimentos funcionais aumentam espaço nas gôndolas. **Gazeta Mercantil**, v. 29, p. 6, 2007.

BALTHAZAR, C. et al. Physicochemical evaluation of sheep milk yogurts containing different levels of inulin. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 6, p. 4160-4168, 2016. ISSN 0022-0302.

BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRIGOLA, A. Physicochemical and nutritional characteristics of blueberry juice after high pressure processing. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 545-549, 2013/03/01/ 2013. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996911001402> >.

BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. High Pressure Treatment Effect on Physicochemical and Nutritional Properties of Fluid Foods During Storage: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 3, p. 307-322, 2012. ISSN 15414337.

BECH-LARSEN, T.; SCHOLDERER, J. Functional foods in Europe: consumer research, market experiences and regulatory aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 4, p. 231-234, 2007. ISSN 0924-2244.

BENKOUIDER, C. The world's emerging markets. **Functional Foods and Nutraceuticals**, v. 44, p. 8-11, 2005.

BETORET, E. et al. Strategies to improve food functionality: Structure–property relationships on high pressures homogenization, vacuum impregnation and drying technologies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 46, n. 1, p. 1-12, 2015. ISSN 09242244.

BIGLIARDI, B.; GALATI, F. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 31, n. 2, p. 118-129, 2013. ISSN 09242244.

BONIFAIT, L.; CHANDAD, F.; GRENIER, D. Probiotics for oral health: myth or reality? **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 75, n. 8, 2009. ISSN 0709-8936.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos., Diário Oficial da República Federativa do Brasil., 2001.

_____. Resolução RDC Nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde., Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2002.

_____. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. D.O.U. - Diário Oficial da República Federativa do Brasil, p. 14, 2003.

_____. Instrução Normativa Nº16. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea. Brasília: D.O.U. - Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2005.

_____. Instrução Normativa Nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos., Brasília: D.O.U. - Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2006.

_____. Instrução Normativa Nº46. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados., Brasília: D.O.U. - Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2007.

_____. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos., Brasília, 2008. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm >.

BRUNNER, T. A.; VAN DER HORST, K.; SIEGRIST, M. Convenience food products. Drivers for consumption. **Appetite**, v. 55, n. 3, p. 498-506, 2010. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-78649425536&doi=10.1016%2fj.appet.2010.08.017&partnerID=40&md5=d9fd87dade565d897fe382b636b4db6b> >.

CASAROTTI, S. N. et al. Influence of the combination of probiotic cultures during fermentation and storage of fermented milk. **Food Research International**, v. 59, p. 67-75, 2014. ISSN 09639969.

CEBRIÁN, G.; MAÑAS, P.; CONDÓN, S. Comparative resistance of bacterial foodborne pathogens to non-thermal technologies for food preservation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAY, 2016. ISSN 1664302X (ISSN). Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84973460193&partnerID=40&md5=776ba64fa3ff877f183516fd9d311b35> >.

CHAWLA, R.; PATIL, G. R.; SINGH, A. K. High hydrostatic pressure technology in dairy processing: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 3, p. 260-268, Jun 2011. ISSN 0022-1155. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23572744> >.

CHIZOBA EKEZIE, F.-G.; CHENG, J.-H.; SUN, D.-W. Effects of nonthermal food processing technologies on food allergens: A review of recent research advances. **Trends in Food Science & Technology**, v. 74, p. 12-25, 2018/04/01/ 2018. ISSN 0924-2244. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092422441730688X> >.

CILLA, A. et al. Bioaccessibility of tocopherols, carotenoids, and ascorbic acid from milk- and soy-based fruit beverages: influence of food matrix and processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 29, p. 7282-90, Jul 25 2012. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22738607> >.

CILLA, A. et al. Bioaccessibility of Tocopherols, Carotenoids, and Ascorbic Acid from Milk- and Soy-Based Fruit Beverages: Influence of Food Matrix and Processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 29, p. 7282-7290, 2012/07/25 2012. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf301165r> >.

CITRUSBR; ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS EXPORTADORES DE SUCOS CITRÍCOS. Benefícios do Suco de Laranja. 2017. Disponível em: < <http://www.citrusbr.com/laranjaesuco/?ins=17> >. Acesso em: 30 Abril 2018.

CIVILLE, G. V.; OFTEDAL, K. N. Sensory evaluation techniques - Make "good for you" taste "good". **Physiology and Behavior**, v. 107, n. 4, p. 598-605, 2012. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84870986356&doi=10.1016%2Fj.physbeh.2012.04.015&partnerID=40&md5=80cd42faa8d740b2da92e8eff8a8e599> >.

CODINA-TORRELLA, I. et al. Potential application of ultra-high pressure homogenization in the physico-chemical stabilization of tiger nuts' milk beverage. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 2016. ISSN 1466-8564. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S146685641630128X> >.

COSTA, A. V. S. et al. Development and physical-chemical, microbiological and sensory characterization of fermented dairy beverage prepared with different stabilizers/thickener. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 209-226, 2013. ISSN 1679-0359.

COSTA, M. et al. Changes on expected taste perception of probiotic and conventional yogurts made from goat milk after rapidly repeated exposure. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 5, p. 2610-2618, 2014. ISSN 0022-0302.

CUNHA, T. M. et al. Avaliação físico-química, microbiológica e reológica de bebida láctea e leite fermentado adicionados de probióticos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 103-116, 2008. ISSN 1676-546X.

DA CRUZ, A. G. et al. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 8, p. 344-354, 2009. ISSN 0924-2244.

DA CRUZ, A. G. et al. High pressure processing and pulsed electric fields: potential use in probiotic dairy foods processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 10, p. 483-493, 2010. ISSN 09242244.

DE ANCOS, B.; CANO, M. P.; GÓMEZ, R. Characteristics of stirred low-fat yoghurt as affected by high pressure. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 1-2, p. 105-111, 2000. ISSN 0958-6946.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, n. 1, p. 130-135, 1960.

DE MORAIS, A.; FERREIRA, E. D. R.; ROSENTHAL, A. High Isostatic Pressure application in dairy products: a review. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 5, p. 357-374, 2014. ISSN 0100-3674.

DENOYA, G. et al. Biochemical and microstructural assessment of minimally processed peaches subjected to high-pressure processing: Implications on the freshness condition. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 36, p. 212-220, 2016. ISSN 1466-8564.

DIBLAN, S.; KAYA, S. Potassium sorbate diffusion in multilayer polymer films: Effects of water activity and pH. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 3, 2018. ISSN 1745-4549. Disponível em: < <http://doi.org/10.1111/jfpp.13544> >.

EGAN, K. et al. Bacteriocins: Novel Solutions to Age Old Spore-Related Problems? **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 461, 2016-April-08 2016. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00461> >.

EL-ZINEY, M. G. GC-MS analysis of benzoate and sorbate in saudi dairy and food products with estimation of daily exposure. **Journal of Food Technology**, v. 7, n. 4, p. 127-134, 2009. ISSN 1684-8462.

ÉPOCA. Vigor e Aurora querem desafiar a liderança da Danone no Brasil. **Época Negócios**, 2015. Disponível em: < <https://epocanegocios.globo.com/Empresa/noticia/2015/11/vigor-e-aurora-querem-desafiar-lideranca-da-danone-no-brasil.html> >. Acesso em: 30/04/2018.

EUROMONITOR. **Euromonitor Global Market Information Database**. Euromonitor International 2013.

EVELYN; SILVA, F. V. M. High pressure processing of milk: Modeling the inactivation of psychrotrophic *Bacillus cereus* spores at 38–70°C. **Journal of Food Engineering**, v. 165, p. 141-148, 2015. ISSN 02608774.

EVERT-ARRIAGADA, K. et al. Commercial application of high-pressure processing for increasing starter-free fresh cheese shelf-life. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 2, p. 498-505, 2014. ISSN 00236438.

FAVA NEVES, M.; TROMBIN, V. G. **Anuário da Citricultura**. São Paulo: 60 p. 2017.

FERNANDES PEREIRA, A. L.; RODRIGUES, S. Chapter 15 - Turning Fruit Juice Into Probiotic Beverages A2 - Rajauria, Gaurav. In: TIWARI, B. K. (Ed.). **Fruit Juices**. San Diego: Academic Press, 2018. p.279-287. ISBN 978-0-12-802230-6.

GERVILLA, R.; FERRAGUT, V.; GUAMIS, B. High Hydrostatic Pressure Effects on Color and Milk-Fat Globule of Ewe's Milk. **Journal of food Science**, v. 66, n. 6, p. 880-885, 2001. ISSN 1750-3841.

GOUVEA, F. D. S. **Desenvolvimento e processamento por alta pressão hidrostática de queijo minas frescal incorporado com cenoura**. 2017. 91f (Mestrado). Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

GRANATO, D. et al. Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 3, p. 292-302, 2010. ISSN 1541-4337. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00110.x> >.

GRYGORCZYK, A. et al. Applying appeal ratings and CATA for making word choices in messaging about food technology. **Food Quality and Preference**, v. 62, p. 237-245, 2017/12/01 2017. ISSN 0950-3293. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0950329317301386> >.

GURGEL, M.; OLIVEIRA, A. Avaliação das características físico-químicas do iogurte. **Leite & derivados**, v. 4, n. 22, p. 38-43, 1995.

HARDY, G. Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning. **Nutrition**, v. 16, n. 7, p. 688-689, 2000/07/01/ 2000. ISSN 0899-9007. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900700003324> >.

HARTE, F. M. et al. Effect of high hydrostatic pressure and whey proteins on the disruption of casein micelle isolates. **Journal of Dairy Research**, v. 74, n. 4, p. 452-458, 2007. ISSN 1469-7629.

HE, S.; HEKMAT, S. Sensory Evaluation of Non-Dairy Probiotic Beverages. **Journal of Food Research**, v. 4, n. 1, p. 186, 2014-12-28 2014. ISSN 1927-0895. Disponível em: < <http://www.ccsenet.org/journal/index.php/jfr/article/view/40910/23903> >.

HE, Z. et al. High pressure homogenization processing, thermal treatment and milk matrix affect in vitro bioaccessibility of phenolics in apple, grape and orange juice to different extents. **Food Chemistry**, v. 200, p. 107-116, 6/1/ 2016. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814616300395> >.

HEANEY, R. P. Dairy Intake, Dietary Adequacy, and Lactose Intolerance. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 4, n. 2, p. 151-156, March 1, 2013 2013. Disponível em: < <http://advances.nutrition.org/content/4/2/151.abstract> >.

HENNESSY, M. **What's driving growth in functional food and beverages? A convergence of nutrition, convenience and taste.** 2013.

HERNANDEZ-CARRION, M. et al. High hydrostatic pressure treatment provides persimmon good characteristics to formulate milk-based beverages with enhanced functionality. **Food & Function**, v. 5, n. 6, p. 1250-1260, 2014. ISSN 2042-6496. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C3FO60625B> >.

HITCHINS, A. et al. Escherichia coli and the coliform bacteria. **FDA Bacteriological Analytical Manual**, p. 4.01-4.29, 1998.

HOLS, P. et al. New insights in the molecular biology and physiology of Streptococcus thermophilus revealed by comparative genomics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 435-463, 2005. ISSN 1574-6976.

HUANG, H.-W. et al. Current status and future trends of high-pressure processing in food industry. **Food Control**, v. 72, p. 1-8, 2017. ISSN 09567135.

HUPPERTZ, T.; KELLY, A.; FOX, P. High pressure-induced changes in ovine milk. 2. Effects on casein micelles and whey proteins. **Milchwissenschaft-Milk Science International**, v. 61, n. 4, p. 394-397, 2006. ISSN 0026-3788.

IDF. **Fermented and non-fermented milk products – detection and enumeration of Lactobacillus acidophilus – culture media.** FEDERATION, I. D.: Bulletin of the IDF., v. 306 1995.

ISO. **ISO/FDIS 7889 IDF 117 Yogurt—Enumeration of characteristic microorganisms—Colony count technique at 37 °C.** Geneva, Switzerland: International Organisation for Standardization, 2002.

_____. **ISO 29981|IDF 220. Milk Products – Enumeration of Presumptive Bifidobacteria – Colony Count Technique at 37 Degrees**: International Organization for Standardization 2010.

JAENICKE, R. Enzymes under extremes of physical conditions. **Annual Review of Biophysics and Bioengineering**, v. 10, n. 1, p. 1-67, 1981. ISSN 0084-6589.

JAYAMANNE, V. S.; ADAMS, M. R. Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 189-194, 2006. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1472-765X.2006.01843.x> >.

JOHANSEN, S. B.; NÆS, T.; HERSLETH, M. Motivation for choice and healthiness perception of calorie-reduced dairy products. A cross-cultural study. **Appetite**, v. 56, n. 1, p. 15-24, 2011/02/01/ 2011. ISSN 0195-6663. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195666310006847> >.

JOHNSTON, D. High pressure effects on milk and meat. **High Pressure Processing of Foods**, p. 99-121, 1995.

JUAN, B. et al. The effect of high-pressure treatment at 300 MPa on ripening of ewes' milk cheese. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 2, p. 129-138, 2008. ISSN 0958-6946.

KAILASAPATHY, K. Commercial sources of probiotic strains and their validated and potential health benefits-a review. **International Journal of Fermented Foods**, v. 2, n. 1, p. 1, 2013.

KANDYLIS, P. et al. Dairy and non-dairy probiotic beverages. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 58-63, 2// 2016. ISSN 2214-7993. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799315001411> >.

KIANI, L. Bugs in our guts—not all bacteria are bad: how probiotics keep us healthy. **Ulster, UK: CSA Discovery Guides**, p. 1-21, 2006.

KORE, K. et al. Effect of feeding traditionally prepared fermented milk dahi (curd) as a probiotics on nutritional status, hindgut health and haematology in dogs. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v. 11, p. 35-39, 2012. ISSN 0975-1068.

KWAK, N.-S.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. **Food Control**, v. 12, n. 2, p. 99-107, 2001/03/01/ 2001. ISSN 0956-7135. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713500000281> >.

LÄHTEENMÄKI, L. et al. Impact of health-related claims on the perception of other product attributes. **Food Policy**, v. 35, n. 3, p. 230-239, 2010. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-77952543722&doi=10.1016%2fj.foodpol.2009.12.007&partnerID=40&md5=601732cfd04df8eae0ff5f6bd060c86d> >.

LANCIOTTI, R. et al. Suitability of high-dynamic-pressure-treated milk for the production of yoghurt. **Food Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 753-760, 2004. ISSN 0740-0020.

LAW, A. J. et al. Comparison of the effects of high pressure and thermal treatments on the casein micelles in goat's milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 2523-2530, 1998. ISSN 0021-8561.

LI, C.; SCHLUESENER, H. Health-promoting effects of the citrus flavanone hesperidin. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 3, p. 613-631, 2017/02/11 2017. ISSN 1040-8398. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.906382> >.

LIMA, S.; MADUREIRA, F.; PENNA, A. Bebidas lácteas: nutritivas e refrescantes. **Milkbizz Tecnologia Temático**, v. 1, n. 3, p. 4-11, 2002.

LIU, H. B. et al. Inhibitor-Assisted High-Pressure Inactivation of Bacteria in Skim Milk. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 7, p. 1672-1681, 2017. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1750-3841.13737> >.

LÓPEZ-FANDIÑO, R. High pressure-induced changes in milk proteins and possible applications in dairy technology. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 10, p. 1119-1131, 2006. ISSN 0958-6946.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. **Food Research International**, v. 34, n. 9, p. 791-796, 2001/11/01/ 2001. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996901000850> >.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **International dairy journal**, v. 11, n. 1-2, p. 1-17, 2001. ISSN 0958-6946.

MACHADO, T. A. D. G. et al. Impact of honey on quality characteristics of goat yogurt containing probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **LWT-Food and Science Technology**, v. 80, p. 221-229, 2017/07/01/ 2017. ISSN 0023-6438. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643817301123> >.

MAGANHA, L. C. et al. Viability of probiotic bacteria in fermented skim milk produced with different levels of milk powder and sugar. **International Journal of Dairy Technology**, v. 67, n. 1, p. 89-94, 2014. ISSN 1364727X. Disponível em: < <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fsr&AN=93629915&lang=pt-br&site=ehost-live&authtype=ip.cookie,uid> >.

MAGUIRE, S.; HARDY, C. Discourse and deinstitutionalization: The decline of DDT. **Academy of Management Journal**, v. 52, n. 1, p. 148-178, 2009. ISSN 0001-4273.

MANOUKIAN, E. B. *Mathematical nonparametric statistics*. 1986.

MARK-HERBERT, C. Innovation of a new product category — functional foods. **Technovation**, v. 24, n. 9, p. 713-719, 2004/09/01/ 2004. ISSN 0166-4972. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166497202001311> >.

MARTINS, T. R. **Queijo tipo minas frescal probiótico processado por alta pressão hidrostática: Aspectos microbiológicos e físico-químicos**. 2018. 67f (Dissertação de Mestrado). Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

MARUYAMA, L. Y. et al. Textura instrumental de queijo petit-suisse potencialmente probiótico: influência de diferentes combinações de gomas. **Food Science and Technology**, v. 26, p. 386-393, 2006. ISSN 0101-2061. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612006000200022&nrm=iso >.

MASSON, L. M. P. **Desenvolvimento de bebida láctea fermentada submetida ao processamento térmico e/ou à homogeneização à ultra-alta pressão**. 2010. 123f (Tese de Doutorado). - Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos em Engenharia Química, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MATOS. **Desenvolvimento e mapa de preferência externo de bebida láctea a base de soro e polpa de graviola (*Annona muricata*)**. 2009. 79f (Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos). - Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

MCKINSEY. **Ag2020: Growth Opportunities and Investment Themes**. SURVEY, I. A. F. 2012.

MEGÍAS-PÉREZ, R. et al. Survey of quality indicators in commercial dehydrated fruits. **Food Chemistry**, v. 150, p. 41-48, 2014. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84887923313&doi=10.1016%2fj.foodchem.2013.10.141&partnerID=40&md5=653ce9a4a7a815500c2c1caeb1ec71a7> >.

MELLENTIN, J. **Danone Actimel: Innovation builds a probiotic mega-brand.** New Nutrition Business, 2007. ISBN 1906297010.

MENRAD, K. Market and marketing of functional food in Europe. **Journal of Food Engineering**, v. 56, n. 2, p. 181-188, 2003/02/01/ 2003. ISSN 0260-8774. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877402002479> >.

MILKPOINT. Aumenta a disputa no mercado de lácteos funcionais. 2009. Disponível em: < <https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/aumenta-a-disputa-no-mercado-de-lacteos-funcionais-52724n.aspx> >. Acesso em: 30 Abril 2018.

MOKOENA, M. P.; MUTANDA, T.; OLANIRAN, A. O. Perspectives on the probiotic potential of lactic acid bacteria from African traditional fermented foods and beverages. **2016**, v. 60, 2016-03-08 2016. ISSN 1654-661X. Disponível em: < <http://www.foodandnutritionresearch.net/index.php/fnr/article/view/29630> >.

MOKOONLALL, A.; NÖBEL, S.; HINRICHS, J. Post-processing of fermented milk to stirred products: Reviewing the effects on gel structure. **Trends in Food Science & Technology**, v. 54, p. 26-36, 8// 2016. ISSN 0924-2244. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224416301509> >.

MOTA, M. J. et al. Probiotic yogurt production under high pressure and the possible use of pressure as an on/off switch to stop/start fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 6, p. 906-911, 2015. ISSN 1359-5113.

OECD/FAO. **Dairy and Dairy Products.** Paris: OECD Publishing, 2016. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2016-11-en >.

OLIVEIRA, M. M. D. Avaliação de leite fermentado probiótico preparado com leite submetido à alta pressão dinâmica. 2013.

PATRIGNANI, F.; LANCIOTTI, R. Applications of High and Ultra High Pressure Homogenization for Food Safety. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1132, 2016-August-03 2016. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01132> >.

PEGA, J. et al. Effect of High-Pressure Processing on Quality and Microbiological Properties of a Fermented Beverage Manufactured from Sweet Whey Throughout Refrigerated Storage. **Food and Bioprocess Technology**, February 22 2018. ISSN 1935-5149. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2078-5> >.

PEREIRA, R. N. et al. Ohmic heating for the dairy industry: a potential technology to develop probiotic dairy foods in association with modifications of whey protein structure. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 95-101, 2018/08/01/ 2018. ISSN 2214-7993. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799318300109> >.

PEREZ, P. F.; DE ANTONI, G. L.; AÑÓN, M. C. Formate production by *Streptococcus thermophilus* cultures. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 9, p. 2850-2854, 1991. ISSN 0022-0302. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78465-8](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78465-8) >. Acesso em: 2018/04/06.

PRADO, F. C. et al. Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**, v. 41, n. 2, p. 111-123, 2008. ISSN 0963-9969.

RAUD, C. **O mercado dos alimentos lácteos funcionais no Brasil e na Holanda**. Florianópolis, Brasil: I Seminário Nacional de Sociologia Econômica 19-22 Maio 2009.

RODRIGUES, F. M. **Efeito da alta pressão hidrostática sobre as propriedades físico químicas, microbiológicas e sensoriais de queijo Minas Frescal com redução de sódio**. 2016. (Tese de Doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J. et al. Impact of food matrix and processing on the in vitro bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 33-43, 2015/04/01/ 2015. ISSN 1756-4646. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464615000249> >.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J. et al. Changes in Vitamin C, Phenolic, and Carotenoid Profiles Throughout in Vitro Gastrointestinal Digestion of a Blended Fruit Juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 8, p. 1859-1867, 2013/02/27 2013. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf3044204> >.

SAÚCO, V. G.; HERRERO, M.; HORMAZA, J. I. Tropical and Subtropical Fruits. In: (Ed.). **Horticulture: Plants for People and Places, Volume 1**: Springer, 2014. p.123-157.

SEBRAE. O cultivo e o mercado do mamão. 2016. Disponível em: < <http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-cultivo-e-o-mercado-do-mamao,937a9e665b182410VgnVCM100000b272010aRCRD> >. Acesso em: 01 Maio 2018.

SHAH, N.; RAVULA, R. Influence of water activity on fermentation, organic acids production and viability of yogurt and probiotic bacteria. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 55, n. 3, p. 127, 2000. ISSN 0004-9433.

SHEN, X. L. et al. Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 4, p. 285-290, 2010. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-75149126682&doi=10.1016%2fj.foodhyd.2009.10.003&partnerID=40&md5=10955b5821ba55bbefe953a90e97d21e> >.

SHORI, A. B. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. **Food Bioscience**, v. 13, p. 1-8, 2016. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84946903165&partnerID=40&md5=f8b820ed11c6b36167bd0c41db221a68> >.

SHORI, A. B.; BABA, A. S. Antioxidant activity and inhibition of key enzymes linked to type-2 diabetes and hypertension by Azadirachta indica-yogurt. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, n. 3, p. 295-301, 2013/07/01/ 2013. ISSN 1319-6103. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319610311000755> >.

SIDE, C. Overview on marketing functional foods in Europe. **Functional Food Network General Meeting**, 2006. p.8-10.

SIEUWERTS, S. et al. Unraveling Microbial Interactions in Food Fermentations: from Classical to Genomics Approaches. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 16, p. 4997-5007, August 15, 2008 2008. Disponível em: < <http://aem.asm.org/content/74/16/4997.short> >.

SPERANZA, B. et al. Functional cream cheese supplemented with Bifidobacterium animalis subsp. lactis DSM 10140 and Lactobacillus reuteri DSM 20016 and prebiotics. **Food Microbiology**, v. 72, p. 16-22, 2018. ISSN 07400020.

SPIRA, P. et al. Effects of high hydrostatic pressure on the overall quality of Pêra-Rio orange juice during shelf life. **Food Science and Technology International**, v. 0, n. 0, p. 1082013218768997, 2018. Disponível em: < <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1082013218768997> >.

SU, N. et al. Antioxidant activity and flavor compounds of hickory yogurt. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 8, p. 1894-1903, 2017/08/03 2017. ISSN 1094-2912. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1223126> >.

SYED, Q. A. et al. Effect of compression and decompression rates of high hydrostatic pressure on inactivation of Staphylococcus aureus in different matrices. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 4, p. 1202-1207, 2014. ISSN 1935-5130.

TAMIME, A.; DEETH, H. Yogurt: technology and biochemistry. **Journal of Food Protection**, v. 43, n. 12, p. 939-977, 1980. ISSN 0362-028X.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 589-595, 2006.

TOMA, M. M.; POKROTNIEKS, J. Probiotics as functional food: microbiological and medical aspects. **Acta Universitatis Latviensis**, v. 710, p. 117-129, 2006.

TOURNAS, V. et al. Yeasts, molds and mycotoxins. **Bacteriological analytical manual. 8th ed. Revision A. US Food and Drug Administration, Washington, DC**, 2001.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 225-241, 2014. ISSN 17564646.

TRUJILLO, A. J. et al. Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products: a review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 3, n. 4, p. 295-307, 2002/12/01/ 2002. ISSN 1466-8564. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856402000498> >.

TSEVDOU, M. S.; TAOUKIS, P. S. Effect of non-thermal processing by High Hydrostatic Pressure on the survival of probiotic microorganisms: Study on Bifidobacteria spp. **Anaerobe**, v. 17, n. 6, p. 456-458, 2011/12/01/ 2011. ISSN 1075-9964. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996411001156> >.

URIOT, O. et al. Streptococcus thermophilus: From yogurt starter to a new promising probiotic candidate? **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 74-89, 2017/10/01/ 2017. ISSN 1756-4646. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464617304267> >.

VAN HOOIJDONK, T.; HETTINGA, K. Dairy in a sustainable diet: a question of balance. **Nutrition Reviews**, v. 73, n. suppl_1, p. 48-54, 2015. ISSN 0029-6643. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/nutrit/nuv040> >.

VAN KLEEF, E.; VAN TRIJP, H. C.; LUNING, P. Internal versus external preference analysis: An exploratory study on end-user evaluation. **Food Quality and Preference**, v. 17, n. 5, p. 387-399, 2006. ISSN 0950-3293.

VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probiotics: an update. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, v. 91, n. 1, p. 6-21, 2015. ISSN 22555536.

VARELA, P.; ARES, G. **Novel Techniques in Sensory Characterization and Consumer Profiling**. CRC Press, 2014. ISBN 9781466566309.

VERBEKE, W. Consumer acceptance of functional foods: Socio-demographic, cognitive and attitudinal determinants. **Food Quality and Preference**, v. 16, n. 1, p. 45-57, 2005. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-5744238395&doi=10.1016%2fj.foodqual.2004.01.001&partnerID=40&md5=0e38f0fcb300775071f895ddd01781c> >.

VICENTINI, A.; LIBERATORE, L.; MASTROCOLA, D. Functional foods: Trends and development of the global market. **Italian Journal of Food Science**, v. 28, n. 2, 2016. ISSN 1120-1770.

VINDEROLA, C.; BAILO, N.; REINHEIMER, J. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. **Food Research International**, v. 33, n. 2, p. 97-102, 2000. ISSN 0963-9969.

VOIGT, D. D.; KELLY, A. L.; HUPPERTZ, T. High-Pressure Processing of Milk and Dairy Products. In: (Ed.). **Emerging Dairy Processing Technologies**: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. p.71-92. ISBN 9781118560471.

WANG, C. Y. et al. Recent Advances in Food Processing Using High Hydrostatic Pressure Technology. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 4, p. 527-540, 2016. ISSN 10408398 (ISSN). Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84961574637&partnerID=40&md5=91c2bfbb30cb32397eeedddc4132fb53> >.

WILLIAMS, M.; PEHU, E.; RAGASA, C. Functional foods: opportunities and challenges for developing countries. **Agriculture and Rural Development**, n. 19, 2006.

YAKULT. **Yakult around the world** 2011.

YANG, S.-C. et al. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 241, 2014. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4033612/> >.

YERLIKAYA, O. Starter cultures used in probiotic dairy product preparation and popular probiotic dairy drinks. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 34, p. 221-229, 2014. ISSN 0101-2061. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612014000200001&nrm=iso >.

ZAMORA, A.; GUAMIS, B. Opportunities for Ultra-High-Pressure Homogenisation (UHPH) for the Food Industry. **Food Engineering Reviews**, v. 7, n. 2, p. 130-142, 2015. ISSN 1866-7929. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12393-014-9097-4> >.

ZHANG, R. et al. Physico-chemical properties and hypoglycaemic activity of fermented milks prepared with *Anemarrhena asphodeloides* water extracts. **Journal of the Science of Food and**

Agriculture, v. 96, n. 2, p. 492-496, 2016. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.7115> >.

ZHENG, X. et al. Comparing product stability of probiotic beverages using litchi juice treated by high hydrostatic pressure and heat as substrates. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 23, p. 61-67, 2014/06/01/ 2014. ISSN 1466-8564. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856414000253> >.

ZOUMPOPOULOU, G. et al. Dairy probiotics: Beyond the role of promoting gut and immune health. **International Dairy Journal**, v. 67, p. 46-60, 2017/04/01/ 2017. ISSN 0958-6946. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694616303077> >.