

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE
PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

VINICIUS MODESTO DE OLIVEIRA

FORMULAÇÃO DE BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA COM
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SORO DE QUEIJO,
ENRIQUECIDA COM FERRO: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA,
ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS E SENSORIAIS

UNIVERSIDADE
FEDERAL
FLUMINENSE

NITERÓI- RJ
2006

VINICIUS MODESTO DE OLIVEIRA

**FORMULAÇÃO DE BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA COM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE SORO DE QUEIJO, ENRIQUECIDA COM FERRO:
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS E
SENSORIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária - Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCO ANTONIO SLOBODA CORTEZ

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. MÔNICA QUEIROZ DE FREITAS

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ROBSON MAIA FRANCO

Niterói - RJ

2006

VINICIUS MODESTO DE OLIVEIRA

FORMULAÇÃO DE BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA COM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE SORO DE QUEIJO, ENRIQUECIDA COM FERRO:
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS E
SENSORIAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária - Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovado em 21 de fevereiro de 2006

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Antonio Sloboda Cortez
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Mônica Queiroz de Freitas
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Robson Maia Franco
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Marco Antônio Moreira Furtado
Universidade Federal de Juiz de Fora

Niterói - RJ
2006

Dedico este trabalho à minha família: meus pais e irmão. Os maiores incentivadores na minha busca pelos meus objetivos. São pessoas que nunca mediram esforço para me ver feliz.

AGRADECIMENTOS

À minha família - por todo o apoio em todos os momentos desta jornada acadêmica.

Ao Marco Antonio Sloboda Cortez - meu orientador, que me guiou durante a realização deste experimento sempre de forma competente e flexível, tornando-se um amigo que merece todo o meu respeito.

Aos professores Mônica Queiroz de Freitas e Robson Maia Franco - meus co-orientadores, que não mediram esforços para me auxiliar em momentos de dúvidas.

Ao professor Teófilo Pimentel da Silva - pelas conversas que tivemos desde antes de eu ingressar no mestrado, seus direcionamentos me foram muito úteis na realização deste trabalho.

Aos amigos Agostinho Sérgio Scofano e Priscila Firmino - pelo companheirismo durante todo o período do curso, tão fundamental para a realização deste projeto.

À colega Lucimar Martins - colaborou sempre e de forma fundamental durante a realização das análises microbiológicas.

Aos demais amigos e professores que participaram junto comigo na realização deste projeto - a contribuição de cada pessoa foi única, insubstituível e a união de nossas

forças fez deste programa de pós-graduação um lugar excelente para aprender e trabalhar.

Aos amigos Leandro Marinho e André Ferreira da Silva - suas colaborações foram imprescindíveis para os contatos realizados durante a fase de experimento.

Aos senhores Otávio, Geraldo e Tanan do laticínio Cia. do Leite - que me receberam e ajudaram no que foi preciso, possibilitando a realização deste projeto, oferecendo suas dependências para a fabricação da bebida láctea e contribuindo para a minha experiência profissional.

Aos professores André e Lúcia, dentre outros que acreditaram na importância do projeto e me ofereceram a oportunidade de realizar as análises sensoriais num ambiente escolar.

À estudante de iniciação científica Carla da Silva - colaborou muito durante a fase de experimento, onde me ajudou com as análises sensoriais.

Aos senhores Dráusio e José Luiz - secretários do programa de pós graduação, sempre prontos para resolver qualquer pendência administrativa e também excelentes companhias para um bate papo.

Ao Frederico - químico, sua colaboração foi imprescindível para a realização das análises físico-químicas.

Todos têm um propósito de vida... um dom singular
ou um talento único para dar aos outros.

E quando misturamos esse talento singular com
benefícios aos outros, experimentamos o êxtase da
exultação de nosso próprio espírito – entre todos, o
supremo objetivo.

DEEPAK CHOPRA

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p. 11

LISTA DE TABELAS, p. 13

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS, p. 14

RESUMO, p. 16

ABSTRACT, p. 17

1 INTRODUÇÃO, p. 18

2 REVISÃO DE LITERATURA, p. 20

2.1 SORO DE QUEIJO, p. 20

2.1.1 Lactose, p. 20

2.1.2 Proteínas do soro, p. 21

2.1.3 O soro de queijo como poluente, p. 23

2.2 BEBIDAS FERMENTADAS, p. 25

2.2.1 *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus*, p. 26

2.2.2 *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, p. 26

2.3 IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL DOS PRODUTOS LÁCTEOS FERMENTADOS, p. 27

2.4 BEBIDA LÁCTEA, p. 29

2.5 IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DO FERRO, p. 30

2.6 DEFICIÊNCIA NUTRICIONAL DE FERRO, p. 31

2.7 BIODISPONIBILIDADE E ABSORÇÃO DO FERRO, p. 34

2.8 FORTIFICAÇÃO DE LEITE E DERIVADOS COM FERRO, p. 35

2.9 ANÁLISE SENSORIAL, p. 38

2.9.1 Métodos de diferença – discriminativos, p. 38

2.9.1.1 Método Triangular, p. 39

2.9.2 Métodos sensoriais afetivos, p. 39

2.9.2.1 Testes de Preferência, p. 40

2.9.2.2 Testes de Aceitação, p. 40

3 MATERIAL E MÉTODOS, p. 42

3.1 ELABORAÇÃO DE BEBIDA LÁCTEA, p. 42

3.2 ANÁLISE BACTERIOLÓGICA, p. 48

3.2.1 Enumeração de Coliformes Totais, p. 49

3.2.2 Enumeração de Coliformes Fecais, p. 50

3.2.3 Isolamento de *Salmonella* spp., p. 50

3.2.4 Provas de lactofermentação e bacterioscopia, p. 51

3.3 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA, p. 51

3.3.1 Determinação de pH, p. 51

3.3.2 Determinação de umidade, p. 52

3.3.3 Determinação de proteínas, p. 52

3.3.4 Determinação de lipídios, p. 52

3.4 ANÁLISE SENSORIAL, p. 52

3.4.1 Teste de Preferência, p. 53

3.4.2 Teste de Diferença, p. 54

3.4.3 Teste de Aceitação, p. 55

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA, p. 56

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO, p. 57

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, p. 57

4.1.1 Variação do pH ao longo da estocagem, p. 58

4.2 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS, p. 60

4.3 ANÁLISES SENSORIAIS, p. 64

5 CONCLUSÃO, p. 68

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 70

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fig. 1** Fluxograma de produção da bebida láctea fermentada e fortificada com ferro quelato aminoácido utilizado durante experimento, f. 45
- Fig. 2** Tanque de dessoragem, f. 46
- Fig. 3** Coleta do soro de queijo Minas Frescal realizada no Laticínio, f.46
- Fig. 4** Enchimento da fermentadeira com a mistura de soro e leite, f. 47
- Fig. 5** Fermento láctico utilizado na fabricação da bebida láctea fermentada, f. 47
- Fig. 6** Quebra da coalhada ao atingir 50°D, f. 47
- Fig. 7** Produto pronto para o envase após adição de polpa, corante, aroma e ferro, f. 47
- Fig. 8** Desarticulação de PCCs realizada durante higienização, f. 48
- Fig. 9** Imersão das peças em solução com hipoclorito de sódio, f. 48
- Fig. 10** Ficha de avaliação empregada na análise sensorial de bebidas lácteas contendo 10, 30 e 50% de soro de queijo pelo teste de ordenação da preferência, f. 53
- Fig. 11** Ficha de avaliação empregada na análise sensorial de bebidas lácteas contendo 50% de soro de queijo com adição de ferro ou não ao produto pelo teste triangular de diferença, f. 54

- Fig. 12** Análise sensorial em “local central” realizada por provadores com idade entre quatro e sete anos, estudantes de escola pública municipal do Rio de Janeiro, f. 55
- Fig. 13** Idem Fig. 12, f. 55
- Fig. 14** Ficha de avaliação empregada na análise sensorial de bebidas lácteas contendo 50% de soro de queijo com adição de ferro ou não ao produto pelo teste hedônico de aceitação, f. 56
- Fig. 15** Variação do pH das amostras de bebida láctea nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35 de estocagem a 4°C, f. 59
- Fig. 16** NMP de Coliformes Totais nas amostras em análises realizadas nos dias 1, 7, 14, 21, 28 e 35 de estocagem a 4°C, f. 61
- Fig. 17** Demonstração da viabilidade qualitativa da cultura láctica nas amostras de bebida láctea produzidas, f. 64
- Fig. 18** Visualização da característica morfotintorial de *Lactobacillus* spp. presente nas amostras de bebida láctea produzidas, f. 65
- Fig. 19** Frequência das posições das amostras A10, A30 e A50 quanto à preferência dos julgadores obtida pelo Teste de Ordenação da Preferência, f. 65
- Fig. 20** Frequência de acertos quanto à percepção ou não do ferro quelato aminoácido na amostra A50 obtida pelo Teste de Diferença pelo Método Triangular, f. 66

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Distribuição de proteínas no leite de vaca, f. 23
- TABELA 2** - Valores médios das análises físico-químicas realizadas na matéria-prima empregada na produção de bebida láctea fermentada, f. 43
- TABELA 3** - Formulações da bebida láctea fermentada, como base; a variação de soro e leite empregadas, f. 43
- TABELA 4** - Ingredientes e quantidades utilizados na elaboração da bebida láctea, f. 44
- TABELA 5** - Ingestão Diária Recomendada (IDR) para lactentes e crianças, f. 44
- TABELA 6** - Resultados das determinações físico-químicas das bebidas lácteas, f. 57
- TABELA 7** - Resultados do NMP de Coliformes Totais nas amostras em análises realizadas durante os dias 1, 7, 14, 21, e 28 de estocagem a 4°C , f. 60
- TABELA 8** - Diferença de soma de ordens entre as amostras A10, A30 e A50 quanto à preferência dos julgadores obtida pelo Teste de Ordenação da Preferência, f. 64

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A10	Amostra de bebida láctea formulada com 10% de adição de soro
A30	Amostra de bebida láctea formulada com 30% de adição de soro
A50	Amostra de bebida láctea formulada com 50% de adição de soro
A50F	Amostra de bebida láctea formulada com 50% de adição de soro e adicionada com ferro quelato aminoácido
ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias de Queijo
APT	Água Peptonada Tamponada
DBO ⁵	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
DMS	Diferença Mínima Significativa
DTA	Doença Transmitida por Alimentos
EC	Caldo <i>Escherichia coli</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPS	Exopolissacarídeos
FAO	Food and Agriculture Organization
IDR	Ingestão Diária Recomendável
LST	Caldo Lauril Sulfato Triptose

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NMP	Número Mais Provável
NMSC	Número Mínimo de Seleções Corretas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCC	Ponto Crítico de Controle
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SIF	Serviço de Inspeção Federal
UHT	Ultra High Temperature
VBBL	Caldo Verde Brilhante Bile Lactose
WPC	Whey Protein Concentrate

RESUMO

O presente estudo objetivou a elaboração de três diferentes formulações de bebida láctea fermentada com adição de polpa de frutas (morango), com diferentes concentrações de soro de queijo (10, 30 e 50%) e enriquecidas com ferro quelato aminoácido. Determinação de seus parâmetros físico-químicos e realização de análises bacteriológicas e sensoriais. As determinações físico-químicas realizadas foram: proteína, gordura, umidade e pH. Em relação às análises bacteriológicas foram realizadas Número Mais Provável de Coliformes Totais e Fecais e Isolamento de *Salmonella* spp. nos seguintes dias de estocagem (1, 7, 14, 21, 28 e 35) a 4°C. A análise sensorial foi realizada com provadores adultos e crianças. Os testes de análise sensorial em adultos foram ordenação da preferência entre os diferentes tratamentos (10, 30 e 50%) e a percepção da presença ou não de ferro quelato aminoácido no produto, através de teste de diferença triangular. Os testes sensoriais com provadores em idade entre 4 e 7 anos, estudantes de escola pública municipal do Rio de Janeiro, foram: determinação da aceitação do produto com a adição de ferro e sem a sua adição utilizando-se uma escala hedônica facial de cinco pontos. Os resultados obtidos levaram as seguintes conclusões: a utilização do soro de queijo na elaboração de bebidas lácteas fermentadas é uma das formas de aproveitar as características nutricionais e funcionais deste subproduto. As formulações contendo 10 e 30% de soro foram consideradas aptas para a produção pela indústria, entretanto a amostra contendo 50% teve parâmetro inferior ao estipulado na determinação de gordura exigida pela legislação pertinente, não podendo, portanto receber a denominação de bebida láctea fermentada com adição de polpa de frutas. Enquanto que a amostra com 30% de soro foi considerada a ideal para a produção, pois além de se enquadrar nos parâmetros físico-químicos estabelecidos, apresentou percentual de proteína elevado e não diferiu significativamente ($p < 0,05$) da amostra adicionada com 50% de soro quanto à preferência dos julgadores, que consideraram as amostras formuladas com 30 e 50% de soro as mais preferidas.

Palavras chave: bebida láctea, soro de queijo, enriquecimento com ferro, análise sensorial.

ABSTRACT

The present study objectified the elaboration of three different formulations of fermented dairy beverage, with strawberry flavor, different concentrations of cheese whey (10, 30 and 50%) and enriched with iron. Physical-chemical parameters, bacteriological and sensorial analyses were carried out to determine beverage identity and quality. The physical-chemistries determinations were: protein, fat, water content and pH. During storage period (days 1, 7, 14, 21, 28 and 35), enumeration of Total and Fecal Coliform and determination of *Salmonella* spp. were accomplished. Sensorial analyses were accomplished with adult (preference among the different treatments and triangular difference test to the perception of the iron presence or not) and children (acceptance) panelists. The children, in age between 4 and 7 years, were students of public school of Rio de Janeiro; and the test used a scale facial of 5 points. The obtained results lead to the following conclusions: the use of the cheese whey to the elaboration of fermented beverages is a proper way to take advantage of nutritional characteristic and functional properties of the whey. Formulations with 10 and 30% of whey were considered capable to be commercialized, but sample with 50% had an inferior fat content than the stipulated by Brazilian legislation (2,0%*m/m*). The sample with 30% of whey was considered ideal for the production, because it fit in the established physical-chemical parameters and presented an elevated protein content (2,02%*m/m*). According to sensorial judges, the samples prepared with 30 and 50% of whey were the most preferred.

Key words: dairy beverage, cheese whey, enrichment with iron, sensorial analyses.

1 INTRODUÇÃO

O soro de queijo é o líquido residual obtido a partir da coagulação do leite destinado à fabricação de queijos ou de caseína (BRASIL, 2005a). É considerado o principal subproduto da indústria de laticínios e em sua composição existe boa quantidade de excelentes nutrientes como a lactose (5,0%) e proteínas de elevado valor biológico (0,9%), tornando-se uma excelente fonte de proteínas a um baixo custo (MAWSON, 1994). No Brasil, tal subproduto vem sendo produzido em quantidades cada vez maiores devido ao incremento do consumo de queijos.

Entretanto, o soro de queijo no Brasil, parece não ser visto como uma matéria-prima com excelentes propriedades nutricionais, visto que um grande volume do soro produzido não recebe o tratamento adequado, sendo ainda desperdiçado sob a forma líquida em efluentes, gerando prejuízos sociais, econômicos e ambientais. Uma importante fonte de proteínas e lactose a um baixo custo poderia ser mais bem aproveitada gerando empregos diretos e indiretos, aumentando a renda dos empresários do ramo e criando maior circulação de capitais, além de diminuir os custos com tratamentos de efluentes e danos ambientais.

Atualmente, novas formas de utilização do soro de queijo vêm sendo desenvolvidas pela indústria em geral, entretanto ainda é na indústria de alimentos que este produto é mais empregado. Dentre as variadas formas de utilização do soro de queijo na indústria de laticínios está a formulação de novos produtos a partir de sua utilização na forma líquida, como por exemplo, a bebida láctea fermentada.

Os produtos lácteos fermentados são descritos desde a antiguidade como uma forma de preservar os nutrientes do leite da deterioração causada por microrganismos, entretanto nas últimas décadas houve um incremento no setor de laticínios por conta do

desenvolvimento da tecnologia e a maior aceitabilidade do consumidor que busca adquirir produtos com características funcionais e de alto valor nutritivo.

Em relação às anemias nutricionais, a anemia ferropriva representa 50% das ocorrências em todo o mundo, atingindo as mais diversas faixas etárias. A deficiência de ferro pode causar diminuição da atividade cognitiva, comprometimento do desempenho físico, favorecimento da instalação de numerosas infecções, dentre outros males. A busca de alternativas para o combate à carência de ferro, que melhor se adaptem às condições de cada região, tem sido motivo de estudo.

Devido a grande oferta de soro de queijo no Brasil, suas características nutricionais, potencial poluidor e baixo custo, o soro torna-se uma importante matéria-prima que pode ser utilizada na produção de bebida láctea. Esta por sua vez pode ser utilizada como veículo de ferro, quando enriquecida por este oligoelemento, no combate à anemia ferropriva.

Sendo assim, o objetivo geral do presente trabalho foi a elaboração de bebida láctea fermentada com três diferentes concentrações de soro de queijo (10, 30 e 50%) enriquecida com ferro quelato aminoácido. Os objetivos específicos foram a determinação físico-química das três formulações de bebida láctea e realização de análises bacteriológicas de forma a classificá-las de acordo com a legislação vigente. Além de análises sensoriais das três formulações de bebida láctea realizadas por adultos e crianças, sendo elas: teste de ordenação da preferência quanto às três formulações, teste de diferença pelo método triangular para a percepção da presença ou não do ferro quelato aminoácido na bebida, ambos realizados com provadores adultos e teste de aceitação com utilização de escala hedônica facial de cinco pontos por crianças entre 4 e 7 anos de idade, estudantes da rede pública municipal de ensino da cidade do Rio de Janeiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SORO DE QUEIJO

O soro de queijo é um subproduto da indústria de laticínios, de cor amarelo-esverdeada, obtido pela coagulação do leite. O seu sabor, ligeiramente ácido ou doce, e a sua composição dependem do tipo e do processo de fabricação do queijo. Sua composição é de aproximadamente 93% de água, 5% de lactose, 0,9% de proteínas, 0,3% de gordura, 0,2% de ácido láctico e pequenas quantidades de vitaminas (BEM-HASSAN; GHALY, 1994) e seu volume representa em torno de 85 a 95% do leite, retendo 55% dos seus nutrientes (SISO, 1996).

As proteínas do soro, principalmente α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, que representam de 70 a 80% do total de proteínas do soro podem ser separadas do soro originando um produto denominado concentrado protéico de soro ou Whey Protein Concentrate (WPC) de grande valor comercial (DI GIACOMO, 1996).

2.1.1 Lactose

A lactose é um carboidrato característico do leite, presente no soro de queijo na concentração de aproximadamente 5%. Trata-se de um dissacarídeo, sendo desdobrado em glicose e galactose, tendo sua utilização na fabricação de produtos derivados do leite.

Suas principais utilizações na indústria de alimentos estão relacionadas ao uso como ingrediente em fórmulas infantis e na indústria farmacêutica, como excipiente de medicamentos. Na forma natural, a lactose é muito utilizada como substrato para a

fermentação por microrganismos selecionados, originando diversos produtos, tais como a bebida láctea fermentada. Entretanto, a lactose encontra aplicação limitada em produtos alimentícios devido à sua baixa digestibilidade e solubilidade, evidenciada pela tendência a cristalização (HARPER, 1992). Desta forma, a indústria de alimentos utiliza apenas uma pequena fração da lactose que é produzida anualmente, sendo a sua utilização em produtos não comestíveis a principal demanda deste produto.

Considerando a alta DBO⁵ (Demanda Bioquímica de Oxigênio) da lactose, 35-45 mg/ L de soro, a indústria de laticínios necessita de novos usos para o soro de queijo produzido, de forma que o impacto sobre o meio ambiente seja amenizado. Neste sentido, muitos produtos originados a partir da utilização da lactose vêm sendo propostos como forma de reduzir o lançamento do soro de queijo em efluentes (AUDIC et al., 2003).

2.1.2 Proteínas do soro

As características nutricionais e funcionais das proteínas do soro de leite estão relacionadas com a sua estrutura e função biológica. Nas últimas décadas observou-se crescente interesse pela qualidade nutricional dessas proteínas, visando o seu uso na formulação de alimentos infantis e dietéticos (DE WITH, 1998)

A utilização do soro de queijo, além das características nutricionais baseia-se na sua “funcionalidade”, que se refere às propriedades não-nutritivas que conferem aos alimentos maior conveniência no manuseio, melhor aparência na apresentação e melhor aceitação pelos consumidores. A maioria das propriedades funcionais influencia o caráter sensorial de um alimento, em especial a textura (SGARBIERI, 1998).

Tais proteínas vêm sendo extensivamente incorporadas em alimentos industrializados ou formulados, fórmulas infantis, alimentos ditos saudáveis e congelados porque melhoram a estrutura e textura desses alimentos. Suas funcionalidades, tal como a formação de espuma, emulsificação e geleificação, têm sido amplamente estudadas (FOEGEDING et al., 2002). Além disso, possui alto valor nutricional, conseqüência da quantidade relativamente alta de cadeias de átomos com ramificações e aminoácidos essenciais (HÁ; ZEMEL, 2003).

As proteínas do soro também são descritas como tendo vastas aplicações em pesquisa de funções biológicas e fisiológicas incluindo imunomodulação (MERCIER et al., 2003) e atividades anticancerígenas (MCINTOSH et al., 1998).

Siso (1996) salientou que 50% da produção mundial de soro é tratada e transformada em vários produtos alimentares, sendo que deste total quase metade é usada diretamente na forma líquida, como na produção de bebida láctea. Como destaca Almeida (2000), a utilização de soro de queijo na elaboração de bebidas lácteas constitui-se numa forma racional de aproveitamento deste produto secundário que apresenta excelente valor nutritivo.

O WPC pode ser utilizado na fortificação de nitrogênio de sucos de frutas e outras bebidas devido à boa solubilidade das proteínas do soro em pH ácido (CAYOT; LORIENT, 1997), como um ingrediente funcional em produtos cárneos por causa de suas propriedades de geleificação e emulsificação (EL-MAGIOLI et al., 1996; YETIM et al., 2001).

As proteínas do soro correspondem a 20% das proteínas do leite sendo que a α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina representam de 70 a 80% do total de proteínas do soro. No soro são encontradas também a albumina de soro bovino, imunoglobulinas, protease-peptonas, lactoferrina, lactoperoxidase e outras enzimas (MORR; HÁ, 1993).

Tabela 1: Distribuição de proteínas no leite de vaca

Proteínas	Conteúdo em g.L ⁻¹	Proporção relativa em %
Caseína	25,00	100
α -Caseína	12,00	48
β -Caseína	9,00	36
K-Caseína	3,25	13
Constituintes menores	0,75	3
Proteínas do soro	5,4	100
β -lactoglobulina	2,70	50
α -lactoalbumina	1,20	22
Soro-albumina	0,65	12
Proteases-peptonas	0,60	10
Imunoglobulinas	0,25	5

Fonte: J.-L. Audic et al., 2003.

A adição do soro de queijo em fórmulas infantis, dietas especiais, produtos de panificação, produtos lácteos e misturas em pó revela sua ampla aplicação na indústria alimentícia, o que resulta, conseqüentemente, no aumento de sua demanda e na positiva contribuição para o estado nutricional da população, além do favorecimento da redução do custo destes produtos em relação aos seus similares (SEVERO, 1995). Na década de 90, as proteínas do soro de queijo foram largamente empregadas na formulação de preparados antianêmicos ricos em ferro e proteínas (DALEV, 1994).

Outra importância é a diversificação da ingestão de proteínas compostas por aminoácidos essenciais em proporções equilibradas e de alta digestibilidade (RENNER, 1989; TOSI et al., 1997).

Para os laticínios, a conversão do soro líquido em bebidas fermentadas é uma das mais atrativas opções, para a utilização do soro para consumo humano, devido à simplicidade do processo, utilização dos mesmos equipamentos de beneficiamento do leite, além das excelentes propriedades funcionais da proteína do soro (GANDHI; PATEL, 1994).

2.1.3 O soro de queijo como poluente

Na fabricação de queijo, o soro é a maior preocupação pela sua significativa taxa de matéria orgânica e pelo grande volume produzido (REIS, 1999). Cada 1.000 litros de soro contém, em média, 50 Kg de lactose, 8 Kg de sais minerais, 8 Kg de proteínas (albuminas e globulinas de alto valor nutricional), 4 Kg de gordura, além de outros componentes em baixa concentração (MOSQUIM, 1996).

Segundo a ABIQ (Associação Brasileira das Indústrias de Queijo), em 2005 somente nos estabelecimentos registrados no SIF/ DIPOA do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) foram produzidas aproximadamente 500.000 toneladas de queijo, estimando representar apenas 60% do mercado total brasileiro (ABIQ, 2005), visto que grande quantidade de queijos ainda é produzida sem o conhecimento das autoridades sanitárias responsáveis no Brasil, são os queijos ditos “informais”.

Ao se considerar que para a fabricação de 1 Kg de queijo são gerados aproximadamente 9 Kg de soro (KOSIKOWSKI, 1979), conclui-se que nas indústrias registradas pelo MAPA foram produzidas em 2005 cerca de 4.500.000 toneladas de soro de queijo. Entretanto, apesar da alta produção nacional, de acordo com levantamento realizado pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), o Brasil importou cerca de 24.000 kg de soro de leite no período compreendido entre 1998 e 2004 (EMBRAPA, 2005).

No Brasil, alguns laticínios ainda lançam o soro de queijo em rios ou o empregam na alimentação de animais como sucedâneo lácteo do leite bovino representando uma opção de baixo custo para o criador na alimentação de suínos e bovinos (UGIETTE, 1990; SILVA, 2000). Segundo o próprio RIISPOA, Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária (BRASIL, 1997), o soro de leite em pó é definido como “produto destinado à alimentação de animais, resultante da evaporação e secagem do soro proveniente da fabricação de queijos ou de caseína”.

O seu lançamento em rios é considerado uma solução ineficaz para resolver os problemas decorrentes de sua eliminação, pois do ponto de vista biológico, o soro é um dos resíduos mais poluentes, apresentando um Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) entre 30.000 e 60.000 ppm (MOSQUIM, 1996).

A DBO⁵ é a forma mais utilizada para se medir a quantidade de matéria orgânica presente em águas residuárias. Esta determinação, padronizada pelos “Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater”, mede a quantidade de oxigênio necessária para estabilizar biologicamente a matéria orgânica presente numa amostra, após um determinado tempo (5 dias) e a uma dada temperatura (20°C) (PESSOA; JORDÃO, 1982). Desta forma, quanto maior a DBO⁵, maior será a necessidade de oxigênio dissolvido na água para neutralizar biologicamente a matéria orgânica residual, ou seja; a DBO⁵ é diretamente proporcional ao potencial poluidor de um resíduo ou substância.

A poluição gerada com o processamento de 100 toneladas de leite por dia produz aproximadamente a mesma quantidade de compostos orgânicos produzidos em uma cidade com 55.000 habitantes (SIENKIEWICZ; RIEDEL, 1990).

Devido ao alto custo de implantação e instalação de tratamentos biológicos para o soro, considerando o alto valor nutricional de suas proteínas e suas capacidades funcionais (solubilidade, estabilidade, formação de espuma, retenção de ar, emulsificação, retenção de água e formação de gel) é aconselhável o emprego de todas as alternativas viáveis para o aproveitamento do soro (MOSQUIM, 1996), o que contribui de maneira considerável com a redução do volume de efluentes gerado por um laticínio.

Desta forma, a elaboração de bebidas lácteas com a utilização de soro de queijo como ingrediente é uma importante forma de se utilizar um subproduto da indústria de laticínios que apresenta elevado valor nutricional e grande potencial poluidor a um baixo custo.

2.2 BEBIDAS FERMENTADAS

A fermentação do leite é uma antiga prática do homem. A maioria dos leites fermentados é produzida utilizando-se como matéria-prima o leite de vaca, entretanto leites de outras espécies animais também têm sido utilizados. O seu consumo vem aumentando, o que incentiva a melhoria de tecnologia e da qualidade desses produtos.

Segundo o Regulamento de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea (BRASIL 2005a) os leites fermentados são obtidos por coagulação e diminuição do pH do leite por fermentação láctica mediante a ação de cultivo de microrganismos específicos, que devem permanecer viáveis durante o seu prazo de validade. Um dos leites fermentados mais conhecidos é o iogurte, que além de ser vendido como produto final, pode ser utilizado como ingrediente para elaboração de bebidas lácteas fermentadas.

Desta forma, entende-se por iogurte o produto resultante da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por fermentos lácticos próprios cuja fermentação se realiza com cultivos protosimbióticos de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* aos quais podem acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-lácticas. (BRASIL, 2005a).

Diversas bactérias ácido lácticas produzem exopolissacarídeos (EPS), ou ligados a parede celular ou excretados para o meio ambiente como uma substância viscosa. O EPS produzido pelo *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* tem uma importante função na textura e estabilidade do iogurte, além de prevenir a sinérese (CERNING, 1990;

NAKAJIMA et al. 1990). A quantidade e composição de EPS produzida pela bactéria ácido láctica dependem de alguns fatores, como a temperatura, pH inicial, fonte de carbono e da disponibilidade de minerais, vitaminas e outros meios de cultura.

As culturas lácticas são utilizadas para aumentar a vida-de-prateleira do leite, devido à formação de componentes metabólicos como ácido láctico, ácido propiônico, diacetil e substâncias antagonísticas que exercem efeito inibitório nas bactérias Gram-negativas responsáveis pela deterioração do produto (MARTINS; LUCHESE, 1998; VEDAMUTHU, 1991; VOSNIAKOS, 1991).

Na produção dos iogurtes, normalmente emprega-se cultura mista de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*. Estas bactérias se mantêm em crescimento associado ou com culturas separadas que são inoculadas no leite em proporções definidas (ALAIS, 1985; VEISSEYRE, 1988). Geralmente, utiliza-se a proporção de 1:1 (cocos para bacilos), que definem as características reológicas e aromáticas ideais (PORTER, 1981).

2.2.1 *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus*

É um coco, Gram positivo e termófilo. Cresce entre 20 e 50°C, mas não se desenvolve a 10°C. Resiste à pasteurização e para destruí-lo é necessário aquecer a temperatura de 90°C durante 20 segundos. Apresenta grande sensibilidade ao sal, sendo inibido em meios que contenham mais de 2,0%. É homofermentador, pode fermentar a lactose e glicose produzindo ácido. Não é capaz de fermentar a galactose. Produz ácido láctico rapidamente, mas só até concentrações de aproximadamente 1,1%. Cresce bem em simbiose com *L. bulgaricus* devido aos produtos de aminoácidos gerados que o estimulam; por sua vez, o *S. thermophilus* também ajuda o crescimento de *L. bulgaricus*, iniciando a produção de ácido e reduzindo o nível de oxigênio (FERREIRA, 1996).

2.2.2 *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*

É um bastão, Gram positivo e termófilo. É homofermentador, produz ácido láctico a partir da lactose e resiste a elevadas concentrações deste produto e a longa duração da maturação de queijos duros. Produz acetaldeído que confere sabor típico ao iogurte. Tem pouca resistência ao sal, não crescendo em concentrações superiores a 2,0%. É destruído no aquecimento a 65°C por 30 minutos (KANDLER; WEISS, 1986).

2.3 IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL DOS PRODUTOS LÁCTEOS FERMENTADOS

A formação do ácido láctico em produtos lácteos fermentados é desejável, pois este é um conservante natural, o que torna o produto biologicamente seguro, além de favorecer a digestibilidade dos componentes do leite. Os produtos lácteos fermentados geralmente contêm a mesma quantidade de nutrientes do leite do qual é obtido, mas o processo fermentativo torna os nutrientes mais disponíveis para absorção, além de favorecer o aumento de vitaminas do complexo B, a digestibilidade das proteínas do leite e a assimilação do cálcio (RASIC; KURMANN, 1993).

As bactérias ácido-láticas são utilizadas para a produção e preservação de alimentos. A fermentação do leite, além de aumentar o seu período de conservação, proporciona maior biodisponibilidade dos seus nutrientes. Alguns microrganismos possuem ainda a capacidade de alterar a microbiota intestinal e de promover alterações benéficas à saúde humana e animal (KROGER et al., 1989; KIM; GILLILAND, 1993).

Durante a fermentação, a proteína, a gordura e a lactose sofrem hidrólise parcial, tornando o leite facilmente digerível, sendo considerado, portanto, o processo fermentativo por bactérias lácticas como um agente regulador das funções digestivas (ALAIS, 1985; VEISSEYRE, 1988). A acidez gerada no processo estimula as enzimas digestivas pelas glândulas salivares, além disso, certas características do processo de fermentação láctea são benéficas para indivíduos com intolerância à lactose e tendências à hiperglicemia pós-prandial (MANZANARES, 1996). Outras propriedades também se relacionam aos iogurtes, como os efeitos anticolesterolêmicos, anticarcinogênicos, inibitórios de agentes patógenos, entre outros (PERDIGON et al., 1995).

As bactérias lácticas, em convívio simbiótico, estimulam-se mutuamente, complementando o crescimento uma da outra. No início da fermentação, o pH do leite

favorece o desenvolvimento do *S. thermophilus*. Com o aumento da acidificação, ou seja, do teor de ácido láctico a partir da lactose, crescem os *L. bulgaricus*. Estes são proteolíticos, obtêm aminoácidos a partir da caseína (glicina, histidina, valina) e ativam o crescimento dos estreptococos que, por sua vez, estimulam o crescimento dos lactobacilos, com a produção de ácido fórmico e gás carbônico (MARTINS; LUCHESE, 1988; VEISSEYRE, 1988).

A atividade metabólica das bactérias está relacionada com o valor de pH, que pode favorecer um determinado grupo em detrimento de outro. Em se tratando de fermentação com o uso da cultura de iogurte, após a inoculação, as bactérias do gênero *Lactobacillus* spp. crescem mais devagar no início, mas permanecem viáveis por tempos maiores que as do gênero *Streptococcus* spp. (FERREIRA, 1996).

Os produtos lácteos fermentados podem apresentar alterações no decorrer do período de armazenamento, relacionadas à mudança dos valores de pH e acidez, além do consumo de lactose, das modificações no aroma e da consistência. As variações como diminuição do pH e aumento da acidez são conseqüências da cultura iniciadora utilizada, do tempo e da temperatura de armazenamento e do metabolismo residual dos microrganismos, assim como de técnicas empregadas durante o processamento para produção, acondicionamento e estocagem do fermentado (MOREIRA et al., 1999).

A acidez torna os iogurtes, alimentos relativamente estáveis por inibir o crescimento de bactérias Gram-negativas, onde o pH pode variar de 3,6 a 4,2 (VEDAMUTHU, 1991).

De acordo com Silva (1997), o aumento da acidez é determinado pela transformação da lactose por enzimas microbianas, com formação de ácido láctico, conferindo acidez característica ao produto. Procura-se manter o equilíbrio adequado das bactérias, para que o produto permaneça suficientemente ácido e aromático (VEISSEYRE, 1988).

Desta forma, a acidez desenvolvida pelos microrganismos utilizados na fabricação dos produtos lácteos fermentados auxilia a absorção e utilização dos nutrientes pelo organismo do consumidor, o que pode ser utilizado pela indústria como uma forma de oferecer produtos com maiores valores nutricionais, além de prevenir possíveis DTA (Doenças Transmitidas por Alimentos).

2.4 BEBIDA LÁCTEA

O Regulamento de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea (BRASIL, 2005a) define bebida láctea como o produto obtido a partir de leite ou leite reconstituído e/ ou derivados de leite, fermentado ou não, com ou sem adição de outros ingredientes, onde a base láctea representa pelo menos 51% do total de ingredientes do produto.

A bebida láctea fermentada é produto lácteo resultante da mistura do leite (in natura, pasteurizado, esterilizado, UHT, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semi-desnatado, ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado e em pó) fermentado mediante ação de microrganismos específicos e que não poderá ser submetido a tratamento térmico após a adição.

Desta forma, a bebida láctea fermentada deve conter no mínimo 51% de base láctea em sua formulação, considerando-se como componentes obrigatórios: o leite, o soro de queijo e cultivos de bactérias lácticas. A contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC/ g, no produto final, para o cultivo láctico específico empregado, durante todo o prazo de validade. A classificação de bebida láctea fermentada com adição refere-se ao produto adicionado de leite fermentado na sua formulação, tal condição deverá apresentar um teor de proteínas de origem láctica mínimo da ordem de 1,6 g para cada 100 g de bebida láctea (BRASIL, 2005a).

O referido instrumento normativo definiu que bebida láctea à base de soro pode apresentar variações quanto ao tratamento térmico, fermentação e adição de produtos originando uma gama de diferentes produtos. Assim, bebidas lácteas fermentadas à base de soro são basicamente uma mistura de iogurte e soro (PENNA, 1997).

A tecnologia de fabricação de bebidas lácteas baseia-se na mistura de iogurte e soro em proporções adequadas, seguida da adição de ingredientes como aromatizantes, corantes, edulcorantes, polpa de frutas e outros, de acordo com a formulação do produtor.

Normalmente os equipamentos para a secagem e obtenção do soro em pó não estão disponíveis nos laticínios de pequeno e médio porte, por necessitar de alto investimento para compra de equipamento e mão-de-obra especializada para a operação. Por outro lado, a elaboração de bebidas com soro líquido envolve equipamentos e acessórios comuns, encontrados na maioria dos laticínios. Portanto, a

fabricação de bebidas lácteas no Brasil usando soro líquido tornou-se uma opção atrativa (SIVIERI; OLIVEIRA, 2002).

Tamine e Robinson (1991) e Otero et al. (1995) consideram que nos últimos anos tem-se incrementado de maneira notável o consumo de bebidas lácteas fermentadas que se caracterizam por apresentar baixa viscosidade e são consumidas como bebidas suaves e refrescantes.

Entretanto, Teixeira et al. (2005) em estudo realizado no mercado varejista do município do Rio de Janeiro, constataram que o consumidor desconhece os produtos que contém soro de queijo, não sabendo a diferença entre iogurte e bebida láctea fermentada, assim como entre requeijão e especialidade láctea. Além disso, os referidos autores sugerem que para o consumidor adquirir um produto lácteo com adição de soro de queijo por opção e não por engano, é necessário reavaliar a forma na qual estes são comercializados e o quanto o consumidor é informado sobre a existência e composição destes produtos.

2.5 IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DO FERRO

O ferro é um dos oligoelementos mais estudados e o seu papel nutricional para o homem já é conhecido de longa data. Sabe-se que o conteúdo corpóreo de ferro é de 3 a 5 gramas, sendo que cerca de 80% deste ferro desempenha funções metabólicas e oxidativas (hemoproteínas) e outra parte encontra-se armazenada, sob a forma de ferritina e hemossiderina, no fígado, baço e medula (QUEIROZ, 2001).

O requerimento fisiológico de ferro pode ser definido como a quantidade de ferro de origem alimentar biodisponível, suprida pela dieta, suficiente para compensar as perdas diárias de ferro e para manter o equilíbrio fisiológico do mineral no organismo. A perda diária do ferro pode chegar a 2 mg/ dia através da urina, suor, descamação celular e fezes. Durante o primeiro ano de vida, a necessidade de ferro está relacionada com as alterações no metabolismo deste elemento e com a velocidade da eritropoiese pós-natal (ANGELIS; CTENAS, 1993).

Como forma de regulação do ferro corporal, no intestino, a absorção pode ser modificada, conforme a condição das reservas do organismo: quando baixas, ocorre

aumento considerável de sua absorção e quando há excesso de ferro, ocorre inibição da absorção. A idade também tem importância, assim, crianças com cerca de 12 meses têm absorção quatro vezes maior do que outras de diferentes grupos etários (QUEIROZ, 2001). Segundo o mesmo autor, o ferro apresenta grande importância na nutrição de crianças principalmente menores de 24 meses, pois tem grande importância no desenvolvimento neurológico destes indivíduos. A fase rápida do crescimento cerebral ocorre nos dois primeiros anos de vida, as membranas do Sistema Nervoso Central são mais permeáveis ao ferro, sendo, portanto, o período mais crítico para a sua utilização. A falta desse elemento entre os 9 e os 12 meses, foi associada com escores baixos de QI, em crianças com cinco anos de vida.

Sendo assim, na primeira infância, alguns fatores, conjuntamente, determinam a suficiência das reservas de ferro no organismo, sendo estes fatores a reserva desse mineral ao nascer, a velocidade relativa do crescimento, a perda oculta de sangue e a ingestão e absorção de ferro (SIGULEM, 1998).

2.6 DEFICIÊNCIA NUTRICIONAL DE FERRO

A anemia nutricional tem sido relatada como altamente prevalente em todo o mundo, atingindo as mais diversas faixas etárias (KAHN et al. 1990; BATISTA FILHO; FERREIRA, 1996) e levando à diminuição da atividade cognitiva, comprometimento do desempenho físico e favorecimento da instalação de numerosas infecções (GUTIÉRREZ-SIGLER et al., 1992; LESHAN et al., 1995). É consenso entre os estudiosos que a deficiência de ferro é o principal responsável pelas anemias nutricionais (OMS, 1975; VITERI et al., 1993; SUHARNO et al., 1993).

A anemia ferropriva tem como característica principal a concentração de hemoglobina abaixo do nível mínimo estabelecido (OMS, 2001), trata-se de um problema mundial de saúde pública com grandes conseqüências para a saúde do homem e para o desenvolvimento social e econômico. A deficiência nutricional de ferro ocorre como resultado de um desequilíbrio no balanço entre a quantidade de ferro biologicamente disponível e as exigências orgânicas.

Apesar das estimativas de prevalência de anemia variar muito e informações corretas serem muitas vezes deficientes, é correto afirmar que em áreas pobres, grande parte das crianças e mulheres grávidas são anêmicas e que pelo menos 30 a 40% são acometidas nos países desenvolvidos. Na América Latina e Caribe a prevalência de anemia em mulheres grávidas e não grávidas é em torno de 40% e 30% respectivamente (OMS, 1992)

A OMS (2001) estimou um número surpreendente de pessoas anêmicas no mundo, em torno de 2,0 bilhões, e que aproximadamente 50% das ocorrências de anemia são devidas à deficiência de ferro.

No Brasil não existem informações de âmbito nacional sobre a extensão e a distribuição geográfica da prevalência da anemia ferropriva. Com base em resultados de vários estudos locais realizados na última década, a maioria referente à clientela de serviços de saúde, observa-se que as prevalências variam de 28,6% em Vitória no Espírito Santo (ALMEIDA, 2000) a 73,2% em quatro municípios da zona da Mata Meridional de Pernambuco (PISCOYA, 2001). Dados de aumento da prevalência advêm da cidade de São Paulo, a qual passou de 35,6% entre 1984 para 46,9% em 1995 em crianças menores de cinco anos de idade e em Pernambuco, onde a prevalência aumentou em 100% entre crianças de 7 a 12 anos, estudantes de escolas públicas de Recife, durante o período compreendido entre 1982 e 2001 (BATISTA FILHO, 2004). Segundo Almeida et al. (2004) as prevalências de anemia em creche encontradas em São Paulo (62,5%) e em Cuiabá (63,0%) foram elevadas. Em creches na Paraíba a prevalência foi 36,4% (OLIVEIRA et al. 2002) e em Porto Alegre foi de 47,8% segundo Silva et al. (2001). No município do Rio de Janeiro, Matta et al. (2005) concluíram que a prevalência de anemia foi elevada (47,3%) em crianças menores de 5 anos que freqüentam creches públicas do município.

Segundo Monteiro et al.(2000), vários fatores podem contribuir para a anemia, tais como doenças genéticas, infecções e deficiências de diversos nutrientes. No entanto, admite-se que sua ocorrência endêmica na infância seja decorrente, principalmente, da combinação de necessidades excepcionalmente elevadas de ferro, impostas pelo crescimento, com dietas pobres no mineral, sobretudo de ferro hemínico.

Sendo assim, as evidências indicam que o meio ambiente, permeado pelas condições materiais de vida e pelo acesso aos serviços de saúde e educação, determina padrões característicos de saúde e doença na criança (ASSIS; BARRETO, 2000). Variáveis como renda familiar, escolaridade, entre outras, estão condicionadas, em última instância, à forma de inserção das famílias no processo de produção, refletindo na aquisição de alimentos (MONTEIRO, 2000) e, conseqüentemente, no estado nutricional. Segundo Queiroz (2001), entre os fatores de risco associados que favorecem a instalação da anemia estão: a injusta distribuição de renda, o baixo nível sócio-econômico, o abandono do aleitamento materno sem suplementação de ferro, a desnutrição energético-protéica, as infecções freqüentes, a alta morbidade, dietas pobres em oferta de ferro, o fraco vínculo mãe-filho, a carência de saneamento básico, a prematuridade e a desnutrição intra-uterina.

A busca de alternativas para o combate à carência de ferro, que melhor se adaptem às condições de cada região, tem sido motivo de estudo. Torres et al. (1996) concluíram pela viabilidade e eficácia da fortificação do leite fluido como medida de intervenção no combate à carência de ferro em pré-escolares.

Segundo Cardoso e Penteado (1994), a deficiência de ferro e suas múltiplas conseqüências podem ser corrigidas através de medidas simples, de baixo custo e comprovada eficácia. Além disso, a fortificação de alimentos e orientações sobre modificações da dieta representam medidas complementares no combate à anemia ferropriva e devem ser incrementadas. Segundo os referidos autores, a abordagem mais usual é fornecer ferro suplementar a gestantes, nutrízes e lactentes em programas de assistência primária à saúde. O principal objetivo das intervenções nutricionais é aumentar as reservas orgânicas de ferro de uma população-alvo, dentro das limitações de recursos disponíveis (DE MAEYER et al., 1989).

Torres et al. (1996) observaram em trabalho realizado a eficácia da fortificação do leite fluido com 3,0 mg de ferro aminoácido quelato no combate à carência de ferro em crianças menores de quatro anos, concluindo-se pela viabilidade e eficiência da fortificação do leite fluido como medida de intervenção no combate à carência de ferro em pré-escolares.

Silva (2000) avaliou o efeito de uma bebida láctea fermentada e fortificada com ferro no estado nutricional em pré-escolares, concluindo que a inclusão da bebida na alimentação diária das crianças elevou o consumo de ferro em 100%, sendo portanto a bebida láctea fermentada considerada um veículo adequado para a fortificação com ferro, por apresentar um pH baixo, o que favorece a sua absorção.

Em estudo realizado Castrol et al. (2005) analisaram o consumo alimentar, o ambiente socioeconômico e o estado nutricional de pré-escolares em creches municipais de Viçosa, Minas Gerais. Concluíram que crianças assistidas nas creches municipais apresentavam estados nutricionais satisfatórios com baixa prevalência de anemia, quando comparadas às crianças de outros municípios.

Segundo os autores, os fatores que, possivelmente, contribuíram para essa melhor situação de saúde foram: nível razoável de escolaridade dos pais, número pequeno de filhos, condições adequadas de saneamento dos domicílios onde viviam os pré-escolares e a baixa frequência de parasitas envolvidos na gênese da anemia ferropriva. Além disso, a baixa prevalência de anemia nas crianças pode ser devida à proteção que, teoricamente, o serviço institucionalizado (creche) deve proporcionar.

No entanto, os autores alertam que a baixa renda per capita da maioria das famílias e a dieta deficiente dessas crianças podem, futuramente, vir a deteriorar a situação de saúde dos pré-escolares.

2.7 BIODISPONIBILIDADE E ABSORÇÃO DO FERRO

Um dos fatores que interferem na biodisponibilidade dos minerais diz respeito às interações que ocorrem entre os mesmos (BREMNER; BEATTIE, 1995; COZZOLINO, 1997). De acordo com Couzi et al. (1993), as interações entre minerais podem ocorrer de forma direta ou indireta. As interações diretas são geralmente fenômenos competitivos que ocorrem durante a absorção intestinal ou utilização tecidual, enquanto que as indiretas ocorrem quando um mineral está envolvido no metabolismo do outro, de modo que a deficiência de um acarreta num prejuízo de função do outro.

A absorção do ferro no duodeno é dependente da natureza do complexo do ferro presente no lúmen intestinal, da presença de fatores favorecedores ou inibidores da

dieta, além da condição fisiológica do indivíduo. A maior solubilidade dos sais ferrosos sobre os férricos é, em parte responsável pela elevada biodisponibilidade dos íons ferrosos no trato gastrointestinal (BIANCHI et al., 1992).

O ferro dietético é classificado de acordo com o seu mecanismo de absorção, em ferro heme e ferro não-heme. O ferro heme encontra-se na estrutura do anel porfirínico, ligado à hemoglobina e à mioglobina, representando cerca de 40% do ferro do tecido animal. Tendo elevada absorção e não é influenciada por fatores inibidores (ANGELIS; CTENAS, 1993).

O ferro não-heme está presente principalmente em alimentos de origem vegetal como: feijões, soja, verduras de folhas verdes escuras. Encontram-se sob a forma de complexo férrico que, durante a digestão, é parcialmente reduzida à forma ferrosa, que é mais facilmente absorvida. A presença de ácido clorídrico e outras secreções como bile e bicarbonato, ao reduzirem o ferro, facilitam sua absorção (QUEIROZ, 2001).

A biodisponibilidade do ferro é influenciada por fatores dietéticos facilitadores e inibidores da absorção, quais sejam os primeiros: frutose, lactose, ácido cítrico, aminoácidos (histidina, lisina, cisteína), carnes em geral e principalmente ácido ascórbico, possuindo a capacidade de converter o ferro dietético do estado férrico para o ferroso, aumentando a sua biodisponibilidade. Já os inibidores, são representados pelos oxalatos, pelos fitatos, pelas fibras e pelos taninos (BIANCHI et al., 1992).

Outras considerações de importância também devem ser observadas como as interações do ferro dietético com outros minerais-traço, como o cobre, o zinco, o manganês e o cobalto, que prejudicam a biodisponibilidade do ferro. O processamento de alimentos, o tratamento térmico, a refinação, a fermentação e a ação de enzimas podem reduzir a biodisponibilidade de ferro (BIANCHI et al., 1992; SANT'ANA, 1997).

2.8 FORTIFICAÇÃO DE LEITE E DERIVADOS COM FERRO

Como estratégias de combate a algumas deficiências nutricionais inclui-se a fortificação de alimentos com minerais e mesmo o uso de suplementação, em populações de risco. As possíveis interações entre estes micronutrientes devem ser consideradas a fim de não comprometer o estado de saúde com relação a um outro mineral (LOBOL; TRAMONTELL, 2004).

Há um consenso de que o enriquecimento de alimentos em longo prazo é um caminho para o nível de ferro saudável da população. Uma vez que para se estabelecer um programa de fortificação de alimentos deve-se conhecer o seu custo efetivo e a sua sustentabilidade a fim de alcançar o seu objetivo. Um programa de fortificação de alimentos com ferro necessita da cooperação de esforços entre governo, indústrias (produtor, processador e vendedor) e consumidores, além de alimentos que sirvam como veículos e fontes de ferro com boa biodisponibilidade (OMS, 2001).

Segundo Brasil (1998) considera-se alimento fortificado ou enriquecido todo alimento ao qual for adicionado um ou mais nutrientes essenciais contidos naturalmente ou não no alimento, com o objetivo de reforçar o seu valor nutritivo e ou prevenir ou corrigir deficiências demonstradas em um ou mais nutrientes, na alimentação da população ou em grupos específicos da mesma. Para que um produto seja considerado alimento enriquecido ou fortificado é necessário que 100mL ou 100g do produto, pronto para o consumo, forneçam no mínimo 15% da IDR (Ingestão Diária Recomendável) de referência, no caso de líquidos e 30% da IDR de referência, no caso de sólidos.

Brasil (2005b) define Ingestão Diária Recomendável como a quantidade de proteína, vitaminas e minerais que deve ser consumida diariamente para atender às necessidades nutricionais da maior parte dos indivíduos e grupos de pessoas de uma população sadia. Desta forma define a IDR de ferro para gestantes e lactantes como 27mg e 15 mg respectivamente; para crianças de um a três anos, quatro a seis anos e de sete a 10 anos como 6mg, 6mg e 9 mg respectivamente e de adultos como 14mg, quando forem utilizadas fontes de ferro com 10% de biodisponibilidade.

Os produtos lácteos são apreciáveis fontes de proteínas, cálcio, vitaminas e outros nutrientes, porém são pobres em vitamina C e ferro. O ferro no leite é principalmente encontrado ligado à caseína, à membrana do glóbulo de gordura e como constituinte da lactoferrina. O leite, principal componente da alimentação infantil, é considerado uma pobre fonte de ferro. No entanto, há diferenças entre crianças amamentadas naturalmente e artificialmente. No leite materno, a concentração de ferro é baixa, variando de 0,1 a 0,6 mg/ L, porém com elevada biodisponibilidade, já o conteúdo médio de ferro no leite bovino é de aproximadamente 0,5mg/ L, mas contém este elemento numa forma pouco disponível (ANGELIS; CTENAS, 1993).

Soglia (1995), em estudo para testar a eficácia do enriquecimento do leite com ferro aminoácido quelato, observou que o valor biológico deste composto, adicionado ao leite tipo C, foi equivalente ao do sulfato ferroso, indicando que a sua ingestão diária nos níveis de 12 e 24 mg/ L é capaz de proporcionar concentração suficiente de ferro disponível para rapidamente estabelecer os níveis de hemoglobina em ratos anêmicos.

O sucesso da fortificação com ferro depende tanto do composto a ser utilizado como do veículo ao qual será adicionado. A fortificação de leite com ferro é tecnicamente mais difícil em relação a outros nutrientes porque as formas mais absorvidas são muito reativas e produzem efeitos indesejáveis quando acrescentadas ao leite. Compostos reativos de ferro catalisam reações oxidativas que resultam em sabor, odor e cor indesejáveis. Substâncias de alta densidade, como ferro elementar, podem requerer medidas especiais para uma distribuição uniforme estável. Logo, a composição estrutural do sal ou mineral influi muito na escolha da fonte de ferro a ser utilizada no enriquecimento de leite, assim como o custo, solubilidade, reatividade, granulometria, cor, gosto, densidade e aroma, além da biodisponibilidade que também é de grande importância nesta avaliação (SOGLIA et al., 2001).

Na cidade de Tupã, Estado de São Paulo, 185 crianças das quais 87% apresentavam alguma deficiência de ferro (menos de 11g de hemoglobina/ mL de sangue), receberam diariamente, durante 222 dias, leite fluido fortificado com ferro aminoácido quelato (Ferrochel®) na dosagem de 3 mg de ferro/ L. Após este período 57% das crianças exibiam níveis normais de hemoglobina e aquelas com níveis inicialmente normais, não apresentaram mudanças significativas, sugerindo a possibilidade de regulação absorptiva desta forma de ferro (IOST et al., 1998).

No Chile, é comum na alimentação de crianças maiores de seis meses, a utilização de leite de vaca diluído a 8%, adicionado de açúcar e cereais, entretanto tal diluição aumenta o risco de deficiência de micronutrientes. Então, desde 1999 o Programa Alimentar Nacional Complementar vem substituindo o tradicional leite de vaca da alimentação de crianças maiores de 18 meses por um similar suplementado com ferro (10mg/ L), Zinco (5mg /L), cobre (0.5mg /L) e vitamina C (70 mg/ L) para prevenir a deficiência destes minerais na dieta das crianças. Torrejón et al. (2004) realizaram estudo em Santiago com 42 crianças maiores de 18 meses, alimentadas

com leite fortificado desde os 6 meses de idade e puderam observar que todas apresentavam peso normal para sua estatura. O estudo concluiu que o leite além de excelente veículo para suplementação de minerais e vitaminas para crianças, pode ser utilizado em programas nacionais na prevenção de anemias carenciais.

2.9 ANÁLISE SENSORIAL

Análise sensorial é a disciplina científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações às características dos alimentos e materiais, como são percebidos pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição. A evolução da análise sensorial está intimamente ligada ao desenvolvimento do controle de qualidade dos alimentos que, por sua vez, se desenvolve com a evolução tecnológica da indústria de produtos de consumo, pela necessidade de rapidez no julgamento de lotes de matéria-prima, ingredientes e produto acabado, bem como pela facilidade de sua execução e por não necessitar de equipamentos ou materiais sofisticados (STONE; SIDEL, 1995).

A análise sensorial é um campo muito importante na indústria de alimentos, pois contribui direta ou indiretamente para inúmeras atividades, como desenvolvimento de novos produtos, controle de qualidade, reformulação e redução de custos de produtos, relações entre condições de processo, ingredientes, aspectos analíticos e sensoriais (PAL, SACHDEVA, SINGH, 1985).

De acordo com o objetivo do teste, com o critério de seleção dos julgadores e com a tarefa específica de cada julgador, os métodos sensoriais são classificados em quatro grupos: discriminativos, descritivos, afetivos e de qualidade (STONE; SIEDEL, 1995).

2.9.1 Métodos de diferença - discriminativos

Os métodos de diferença em análise sensorial formam um grupo de técnicas indispensáveis ao analista sensorial de alimentos, bebidas e outros produtos de consumo. Estes métodos, cujo objetivo é medir efeitos específicos pela simples discriminação, baseiam-se na diferença percebida entre dois produtos, o que justifica o prosseguimento para uma análise descritiva, de modo a identificar as razões da diferença. Os métodos de diferença são um dos mais sensíveis, sendo, portanto,

aplicáveis quando as diferenças entre os tratamentos, formulações ou marcas são pequenas. De modo geral, estes testes são aplicáveis em controle de qualidade, pesquisa e desenvolvimento de produtos e processos, melhoramento e reprodução de produtos, entre outros (CHAVES, 1993).

Os métodos mais freqüentemente utilizados são os de diferença pareada, duo-trio, triangular e ordenação.

2.9.1.1 Método triangular

Normalmente são utilizadas equipes pequenas, entre 24 e 40 julgadores, em ambiente de laboratório para se obter resultados confiáveis (SIDEL et al, 1981).

O método triangular é o mais comumente utilizado dentre os testes discriminatórios, três amostras codificadas com números de três dígitos são apresentadas ao provador, sendo duas delas idênticas. Ao julgador cabe analisar as três amostras e identificar a amostra diferente com base em alguma característica específica ou na qualidade global.

O método triangular é muito utilizado em controle de qualidade, a fim de garantir que amostras ou lotes de produções diferentes sejam semelhantes. É também utilizado para determinar se a substituição de ingredientes, a mudança no processamento, o tipo de embalagem e as condições de armazenamento resultam em diferença detectável no produto (CHAVES; SPROESSER, 1993).

2.9.2 Métodos sensoriais afetivos

São testes em que atitudes subjetivas, tais como preferência ou aceitação de um produto, são medidas. Nos testes afetivos, a tarefa do provador é indicar a preferência ou aceitação por meio de seleção, ordenação ou pontuação das amostras. Os julgadores são normalmente consumidores atuais ou potenciais do produto podendo ser realizados em laboratórios ou em estudo de campo (CHAVES, 1993).

Os testes afetivos são utilizados quando se necessita conhecer o "status afetivo" dos consumidores com relação ao(s) produto(s), e para isso são utilizadas escalas hedônicas. Dos valores relativos de aceitabilidade pode-se inferir a preferência, ou seja, as amostras mais aceitas são as mais preferidas e vice-versa (FERREIRA, 2000),

sendo a utilização da escala hedônica ou da escala de atitude um exemplo deste tipo de teste.

2.9.2.1 Testes de preferência

Os testes de preferência determinam reações subjetivas do consumidor ao fazer com que este prefira um produto a outro. Os métodos mais empregados para avaliação de preferência são comparação pareada e ordenação. O teste de ordenação é usado quando o objetivo é comparar várias amostras em relação a um simples atributo (como doçura, frescor) ou para avaliar a preferência; neste caso, duas ou mais amostras codificadas são apresentadas simultaneamente. Os julgadores são solicitados a ordená-las de acordo com sua preferência. Como os julgadores não são treinados, não se deve apresentar mais de quatro ou cinco amostras para serem ordenadas (CHAVES; SPROESSER, 1993; MEILGARD et. al., 1999).

2.9.2.2 Testes de aceitação

A determinação da aceitação pelo consumidor é parte crucial no processo de desenvolvimento ou melhoramento de produtos. Para uma triagem inicial ou uma avaliação preliminar da aceitação, a análise é normalmente realizada em condições laboratoriais, com 30-50 julgadores não-treinados. Para estudos mais representativos, utilizam-se "locais centrais" (locais de grande concentração de pessoas), pela facilidade de seleção ao acaso de um número acima de 100 pessoas, para cada tratamento, formulação ou amostra avaliada.

Entre os métodos mais empregados para medida da aceitação de produtos está a escala hedônica. Nesta escala o provador expressa sua aceitação pelo produto, seguindo uma escala previamente estabelecida que varia gradativamente com base nos atributos "gosta e desgosta", estando a preferência implícita neste caso.

Há diferentes tipos de escala hedônica, como as verbais: gosta extremamente/ desgosta extremamente, excelente/ péssimo e a escala hedônica facial. Nas escalas faciais, a escolha das figuras que vão identificar os intervalos da escala é de grande importância, uma vez que essa associação gráfica não somente deverá dar uma idéia

de ordem sucessiva dos intervalos da escala, como também facilitar a decisão do provador em suas respostas. Os pontos da escala são associados a valores numéricos, possibilitando a análise estatística dos resultados por meio da análise de variância e de outras técnicas.

A escala hedônica pode ser utilizada em testes de aceitação em laboratório, com o objetivo de se obterem informações sobre a provável aceitação de produtos pelo consumidor nas fases iniciais de desenvolvimento. É utilizada, também, para determinar a aceitação quando se promovem alteração ou inclusão de ingredientes e modificações nos processos, nas matérias, na embalagem, nas condições de estocagem e no tempo de conservação dos alimentos (CHAVES; SPROESSER, 1993).

Os testes de aceitação não devem ser utilizados para controle de qualidade na produção de alimentos, já que é preciso um grande número de provadores para maior exatidão do teste; além disso, a informação obtida refere-se à aceitação do produto.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense e contou com a colaboração de um laticínio localizado no município de Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro.

Sua realização consistiu na formulação e elaboração de bebida láctea fermentada sabor morango, enriquecida com ferro Tris-Glicinato Quelato preparada com diferentes concentrações de soro de queijo (10%, 30% e 50%); análises bacteriológicas e físico-químicas de acordo com a legislação pertinente. Além de análises sensoriais realizadas por provadores adultos e crianças.

3.1 ELABORAÇÃO DE BEBIDA LÁCTEA

O produto desenvolvido teve como ingredientes: soro de queijo, leite integral, sacarose, polpa de morango, ferro aminoácido quelato e cultura láctica contendo *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus*.

A elaboração da bebida láctea foi realizada em laticínio localizado no município de Cachoeiras de Macacu, RJ. O leite utilizado foi proveniente de criadores da bacia leiteira dos municípios de Cachoeiras de Macacu, Magé e adjacências, sendo classificado como tipo B. Sua coleta foi realizada a granel em caminhão isotérmico e ao chegar ao laticínio foram procedidas as seguintes análises: temperatura, acidez (Dornic), densidade, gordura (Gerber) e crioscopia.

O soro de queijo foi coletado diretamente do tanque de dessoragem de Queijo Minas Frescal, sendo resfriado a temperatura de 10°C e analisado para posterior utilização segundo a tabela 2.

Tabela 2: Valores médios das análises físico-químicas realizadas na matéria-prima empregada na produção de bebida láctea fermentada.

	Temperatura (°C)	Acidez (°D)	Densidade (g/L)	Gordura (%)	Crioscopia (°C)
Leite	10,0°C	15°D	1032,0	3,3%	-0,536
Soro	8,0°C	10°D	1026,0	0,6%	-0,534

Foram utilizadas três formulações diferentes para a elaboração da bebida láctea fermentada, sendo que os ingredientes que variaram nas concentrações adicionadas foram o soro e o leite, além da adição ou não de ferro. Desta forma, foram determinadas três bases lácteas diferentes, que foram codificadas como A10, A30 e A50 conforme dados contidos na tabela 3.

A cada dia de produção foram produzidos 1000 litros de bebida láctea, nas seguintes concentrações de soro de queijo, 10, 30 e 50% respectivamente, sendo assim, ao final do experimento obteve-se 3.000 litros de bebida, sendo 1.000 litros de cada amostra.

Tabela 3: Formulações da bebida láctea fermentada, como base a variação de soro e leite empregadas.

Produtos	Ingredientes	
	Soro (%)	Leite (%)
A10	10	90
A30	30	70
A50	50	50

Na tabela 4 constam os outros ingredientes utilizados e suas respectivas quantidades, segundo procedimento adotado pela indústria. Foram produzidos

aproximadamente 1000 litros por batelada, divididos em dois tanques de 500L. Para efeito de adição de ferro, foram considerados 250 litros.

Tabela 4: Ingredientes e quantidades utilizados na elaboração da bebida láctea.

Ingredientes Líquidos (L)	
Polpa	10,00
Aroma	0,38
Corante	0,32
Ingredientes sólidos (Kg)	
Açúcar	110,00
Estabilizante	3,00
Sorbato	0,46

Já a adição de ferro ao produto foi padronizada para as três amostras (10, 30 e 50% de soro de queijo) seguindo os parâmetros propostos por Brasil (1998) que considera como alimento fortificado ou enriquecido todo aquele ao qual for adicionado um ou mais nutrientes essenciais contidos naturalmente ou não no alimento.

Desta forma, para que a bebida láctea fosse considerada como alimento enriquecido ou fortificado foi necessário que 100 mL do produto pronto para o consumo, fornecesse no mínimo 15% da IDR (Ingestão Diária Recomendável) de referência que no caso foi de 6 mg, visto que Brasil (2005b), que define a Ingestão Diária Recomendável, demonstra que tal concentração é suficiente para crianças entre quatro a seis anos de idade, o público alvo deste experimento, quando forem utilizadas fontes de ferro com 10% de biodisponibilidade. Conforme a tabela abaixo:

Tabela 5: Ingestão Diária Recomendada para lactentes e crianças.

Nutriente	Unidade	0-6 meses	7-11 meses	1-3 anos	4-6 anos	7-10 anos
Ferro*	Mg	0,27	9,0	6,0	6,0	9,0

Fonte: Modificado de BRASIL (2005b). * 10% de biodisponibilidade

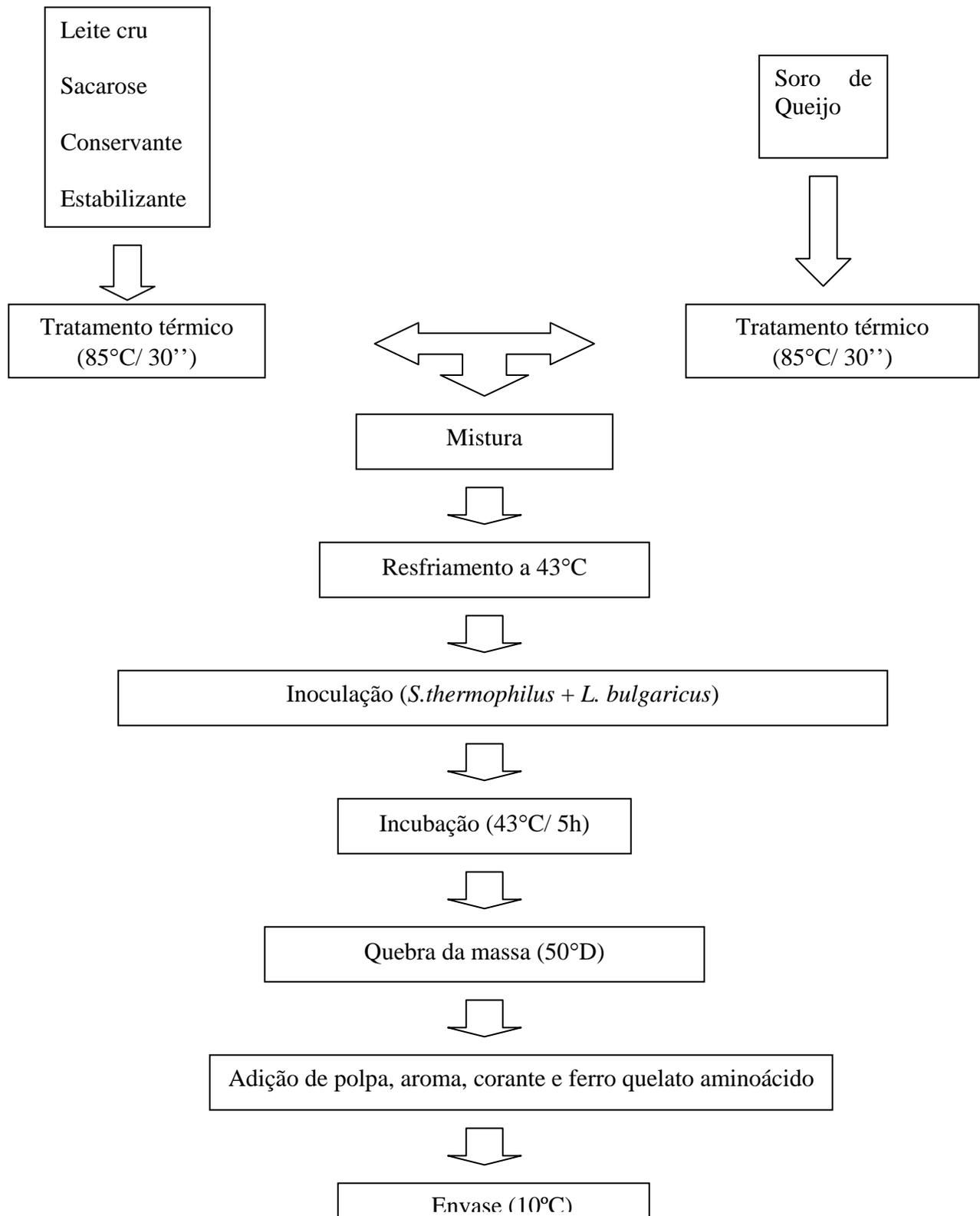


Figura 1: Fluxograma de produção da bebida láctea fermentada e fortificada com ferro quelato aminoácido utilizado durante experimento.

O fluxograma de produção estabelecido para a produção do alimento (Figura 1) seguiu a planta encontrada já em operação no laticínio, de acordo com Ferreira (1996).

A produção foi realizada em três dias consecutivos sempre após a coleta do soro proveniente de Queijo Minas Frescal (Figuras 2 e 3).



Figuras 2 e 3: Tanque de dessoragem e coleta do soro de queijo Minas Frescal realizada no Laticínio.

O leite cru foi adicionado de sacarose, conservante e espessante, em uma balança de aço inox sendo em seguida pasteurizado a 85°C durante 30 segundos e misturado ao soro de queijo também pasteurizado pelo mesmo binômio tempo/temperatura, em duas fermentadeiras com volume de 500 litros cada.

As fermentadeiras dotadas de sistema de homogeneização, aquecimento e resfriamento em dupla camisa permitiram o resfriamento e controle da temperatura da mistura até 43°C, concomitantemente foi realizada a retirada de espuma da superfície da mistura com auxílio de peneiras, a fim de se prevenir a rancificação da gordura, além de melhorar o manejo e incorporação dos demais componentes da bebida (Figura 4).

Estabilizada a temperatura em 43°C, procedeu-se a inoculação do fermento láctico na quantidade de 20 unidades para cada 500 litros da mistura (Figura 5).



Figuras 4 e 5: Enchimento da fermentadeira com a mistura de soro e leite e fermento láctico utilizado na fabricação da bebida láctea fermentada.

A cultura láctica utilizada era composta de *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, o seu tempo de incubação foi de aproximadamente cinco horas e/ou até que a mistura alcançasse 50°D. Neste momento procedeu-se a quebra da coalhada com a entrada em operação dos agitadores mecânicos das fermentadeiras e a adição de ferro Tris-Glicinato Quelato, polpa de morango industrializada, aroma artificial de morango e corante carmim de cochonilha, todos aditivos, anteriormente analisados no laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos da Faculdade de Veterinária para coliformes totais, fecais e *Salmonella* spp. (Figuras 6 e 7).



Figuras 6 e 7: Quebra da coalhada ao atingir 50°D e produto pronto para o envase após adição de polpa, corante, aroma e ferro.

O envase da bebida láctea procedeu-se a temperatura de 10°C em embaladora automática com selagem térmica, utilizando filme para embalagem do próprio laticínio com volume de 200mL e posterior refrigeração em câmara de resfriamento a 5°C.

A sanitização e higienização dos equipamentos e da “linha de leite” foram realizadas utilizando hidróxido de sódio, ácido peracético e hipoclorito de sódio de acordo com as instruções dos fornecedores destes produtos. O procedimento foi realizado antes e depois da produção, além da limpeza “clean and place” alguns pontos importantes considerados PCCs (Pontos Críticos de Controle) foram observados, procedendo-se a desarticulação desses pontos para limpeza e higienização mais eficaz (Figuras 8 e 9).



Figura 8 e 9: Desarticulação de PCCs realizada durante higienização e imersão das peças em solução com hipoclorito de sódio.

3.2 ANÁLISE BACTERIOLÓGICA

A bebida láctea foi analisada em seis tempos (0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias) de estocagem a 4°C para a determinação de suas características bacteriológicas, servindo como passo inicial para a realização do estudo, pois, sem a realização das mesmas não seria possível proceder as análises sensoriais. Tais análises foram realizadas no laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária da UFF sendo elas: Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais, de Coliformes Fecais e isolamento de *Salmonella* spp. de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas (BRASIL, 2005a) e Métodos Analíticos Oficiais para

Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água (BRASIL, 2003b).

O objetivo das análises bacteriológicas, previstas na legislação consultada, foi determinar a enumeração (NMP) de Coliformes Totais, presentes nas amostras analisadas, índice de contaminação fecal, representado pela enumeração de Coliformes Fecais e isolamento de *Salmonella* spp., por ser considerado um microrganismo de importância em saúde pública e causar infecção alimentar, tida como importante Doença Transmitida por Alimentos (DTA).

Além destas análises, foram verificadas a viabilidade e o comportamento da microbiota láctea através de provas de lactofermentação e a confirmação de suas características morfotinturiais pela bacterioscopia.

3.2.1 Enumeração de Coliformes Totais (NMP)

Após a sanificação com álcool a 70% da câmara asséptica e das embalagens a serem analisadas, de cada amostra foram retirados assepticamente 25 mL, os quais foram diluídos em 225 mL de solução salina peptonada a 0,1% originando a diluição 10^{-1} , em seguida foram realizadas as diluições 10^{-2} e 10^{-3} .

Realizou-se o teste presuntivo que consiste na adição de 1 mL de cada diluição em três séries de três tubos contendo 10 mL do meio LST (Lauril Sulfato Triptose) e um tubo de Durhan invertido. Estes tubos foram incubados a 35-37°C por 24-48 horas. Sendo considerados positivos os tubos que apresentaram gás no interior dos tubos de Durhan, como resultado da fermentação da lactose produzindo ácido e gás. O meio LST possui o sal Lauril Sulfato de Sódio que é seletivo para coliformes.

A realização do teste confirmativo consistiu em retirar uma alíquota de cada tubo de LST com sub-cultivos crescidos para tubos contendo 10 mL de Caldo Verde Brilhante Bile Lactose (VBBL) e um tubo de Durhan invertido para confirmar a presença de coliformes totais, incubando-os em estufa a 35-37°C por 24-48 horas. O caldo VBBL possui a lactose que é usada como fonte de carbono pelos coliformes e o verde brilhante e os sais biliares que são inibidores da microbiota Gram positiva.

O resultado do teste confirmativo para coliformes totais é evidenciado pelo comportamento da bactéria que ao crescer fermenta a lactose produzindo gás, que fica aprisionado no interior do tubo de Durham, caracterizando positividade.

A interpretação foi realizada a partir dos tubos positivos da primeira, segunda e terceira séries (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) de diluições e em seguida foi consultada a tabela de número mais provável para obter o número de coliformes presentes na amostra.

3.2.2 Enumeração de Coliformes Fecais

Para confirmação da presença de coliformes fecais fez-se o mesmo procedimento descrito para Coliformes Totais, porém os sub-cultivos dos tubos positivos, do teste presuntivo, foram inoculados em tubos contendo Caldo EC e incubados em banho-maria à temperatura de 44,5°C por 48 horas.

O caldo EC possui lactose, que é utilizada como fonte de carbono e sais biliares que são inibidores de bactérias Gram positivas. A bactéria ao crescer, fermenta a lactose e produz gás que fica aprisionado no interior do tubo de Durham.

A partir deste comportamento é possível observar o crescimento ou não de coliformes totais e de coliformes fecais ou termotolerantes nos tubos, que caracteriza o estado higiênico do produto analisado.

3.2.3 Isolamento de *Salmonella* spp.

Inicialmente foi realizado o pré-enriquecimento ou enriquecimento não seletivo, nesta etapa objetivou-se a recuperação de células injuriadas, restabelecendo as condições fisiológicas ideais do microrganismo para o seu crescimento e multiplicação bacteriana.

A partir da amostra, iniciou-se a análise transferindo 25 mL da amostra para um frasco contendo 225 mL do meio de cultura Água Peptonada Tamponada (APT) com incubação a 35°C - 37°C por 24 horas em estufa.

A segunda etapa da análise foi o enriquecimento seletivo, que consistiu na transferência, em condições de esterilidade, com auxílio de pipeta o volume de 1 mL do

sub-cultivo crescido no enriquecimento seletivo para um tubo contendo 10 mL de caldo Mossel, que foi incubado a temperatura de 35 a 37°C por 24 horas.

Após este período, os sub-cultivos dos tubos positivos foram semeados em Placas de Petri contendo meio Rambach e incubadas a 35°C durante 24 horas. Nenhuma das amostras semeadas apresentou colônias com características morfocoloniais para *Salmonella* spp, sendo então encerrado o isolamento.

3.2.4 Provas de lactofermentação e bacterioscopia

Foram realizadas inoculações de 1,0 mL da amostra de bebida láctea em tubos contendo 10 mL de leite desnatado esterilizado e incubados a 45°C por 24 horas, a fim de verificar a viabilidade e comportamento da microbiota láctea. Além disso, foram realizados esfregaços em lâminas, corados pelo método de Gram para verificação das características morfotinturiais dos microrganismos lácteos (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) presentes nas amostras.

3.3 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

A bebida láctea foi avaliada quanto aos seguintes aspectos físico-químicos: pH, umidade, proteínas e lipídios de acordo com Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos (BRASIL, 2003a). Com exceção da determinação de pH do produto que foi realizada nos seguintes tempos: 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de estocagem, as demais análises foram realizadas no sétimo dia de estocagem.

3.3.1 Determinação de pH

A análise de pH foi realizada pelo método potenciométrico. A determinação dos valores de pH fundamentou-se na medida da concentração de íons hidrogênio na amostra. Os valores de pH foram determinados potenciometricamente com o aparelho HORIBA, modelo M-13.

3.3.2 Determinação de umidade

A umidade é determinada pela perda de massa em condições nas quais, água e substâncias voláteis são removidas. Os valores de umidade foram determinados pelo método da estufa a 105°C.

3.3.3 Determinação de proteínas

Foi utilizado o método de Micro-Kjeldahl, que se baseia na transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio através da digestão com ácido sulfúrico p.a. e posterior destilação com liberação da amônia. Esta por sua vez, foi fixada em solução ácida e titulada.

3.3.4 Determinação de lipídios

Foi utilizado o método Butirométrico para leite fluído, que se baseia no ataque seletivo da matéria orgânica por meio de ácido sulfúrico, com exceção da gordura que é separada por centrifugação, auxiliada pelo álcool amílico, que modifica a tensão superficial.

3.4 ANÁLISE SENSORIAL

A etapa de análise sensorial foi realizada com provadores adultos, universitários da Faculdade de Veterinária da UFF (Universidade Federal Fluminense) e com crianças na faixa etária de quatro a sete anos, estudantes da rede pública de ensino municipal do Rio de Janeiro, residentes no bairro do Andaraí e adjacências.

Os testes foram conduzidos objetivando estimar a preferência dos adultos quanto à concentração de soro adicionada as bebidas láctea (10, 30 e 50% de soro) e verificar se a adição de ferro produziria modificação sensorial perceptível pelos adultos, além de estimar a aceitação da bebida láctea entre crianças.

Os testes realizados com provadores adultos foram realizados no laboratório de análise sensorial da Faculdade de Veterinária da UFF enquanto que os com crianças realizaram-se em escola municipal do Rio de Janeiro, ambos após prévia instrução sobre a forma como deveriam proceder ao degustar a amostra e preencher a ficha de avaliação.

3.4.1 Teste de Preferência

O teste de preferência é um método sensorial afetivo e foi empregado para o estudo da preferência do consumidor quanto às diferentes concentrações de soro de queijo (10, 30 e 50%) contidas nas formulações de bebida láctea.

Foram utilizados 40 provadores adultos, que receberam individualmente três amostras diferentes quanto à concentração de soro de queijo. As amostras foram servidas em copos descartáveis de 50mL a uma temperatura de 10°C, codificadas com números de três dígitos e servidas de forma aleatorizada, juntamente com um copo contendo água para o enxágüe bucal entre as degustações. O teste foi realizado sob condições laboratoriais, em cabines individuais, que dispunham de iluminação vermelha a fim de mascarar diferenças perceptíveis de coloração.

Nome:	Sexo:	Idade:
Por favor, prove as amostras de leite da esquerda para direita e as ordene em ordem CRESCENTE de preferência. Espere 30 segundos entre as amostras e enxágüe a boca entre cada avaliação.		
Código da amostra:	_____	_____
	Menos preferida	Mais preferida
Comentários:	_____	

Figura 10: Ficha de avaliação empregada na análise sensorial de bebidas lácteas contendo 10, 30 e 50% de soro de queijo pelo teste de ordenação da preferência.

Após degustar as amostras, cada provador marcou de acordo com as instruções recebidas, as suas preferências em uma ficha, de acordo com a figura 10.

3.4.2 Teste de Diferença

Os métodos sensoriais discriminativos avaliam diferenças sensoriais entre dois ou mais produtos, sendo denominados testes de diferença. Foi utilizado o Teste Triangular que verifica se existe diferença sensorial perceptível entre duas amostras diferentes. No presente estudo o teste empregado para analisar se havia diferença sensorial entre as bebidas lácteas com 50% de soro de queijo adicionado ou não com 1,5mg de ferro/ 100mL do produto.

Neste teste, 51 provadores adultos receberam três amostras servidas em copos descartáveis de 50mL a uma temperatura de 10°C, codificadas com números de três dígitos, servidas de forma aleatorizada em cabine individual, que dispunha de iluminação vermelha a fim de mascarar diferenças perceptíveis de coloração.

Nome:	Sexo:	Idade:
Duas das três amostras apresentadas são idênticas. Por favor, prove as amostras da esquerda para direita e circule o código daquela amostra que lhe pareça diferente. Enxágüe a boca após a degustação e espere trinta segundos.		
_____	_____	_____
Comentários: _____		

Figura 11: Ficha de avaliação empregada na análise sensorial de bebidas lácteas contendo 50% de soro de queijo com adição de ferro ou não ao produto pelo teste triangular de diferença.

A ficha de avaliação informava que duas eram idênticas e requeria que o provador identificasse a diferente com base na qualidade global, excluindo a aparência, em ficha conforme a figura 11.

3.4.3 Teste de Aceitação

O Teste de Aceitação avalia o quanto um consumidor gosta ou desgosta de um determinado produto, sendo classificado como um método sensorial afetivo.

Empregou-se uma categoria de teste de aceitação conhecido como teste hedônico, caracterizado pelo conhecimento do “status afetivo” do(s) produto(s), utilizando-se da escala hedônica facial de cinco pontos.

Foram realizadas duas sessões de testes, um para o tratamento com 50% de soro adicionado de ferro (A50F) e outro sem a adição no tratamento de 50% de soro de queijo (A50), utilizando-se provadores na faixa etária de quatro a sete anos de idade, estudantes da rede pública de ensino municipal da cidade do Rio de Janeiro (Figuras 12 e 13). Foram empregados 110 consumidores em cada sessão de testes, 55 do sexo feminino e 55 do sexo masculino.



Figuras 12 e 13: Análise sensorial em “local central” realizada por provadores com idade entre quatro e sete anos, estudantes de escola pública municipal do Rio de Janeiro.

Cada provador recebeu as amostras A50 e A50F, uma amostra de cada vez, juntamente com copo contendo água e a ficha de avaliação (Figura 14).

Para tabulação e análise dos resultados, as folhas de respostas preenchidas foram organizadas e a classificação dada pelos julgadores transformada em valores numéricos para análise dos resultados pelas técnicas de análise estatística.

Faça um X dentro do quadrado abaixo da figura que melhor descreve sua opinião sobre o produto:



Nome: _____ Idade: _____
Data: _____

Figura 14: Ficha de avaliação empregada na análise sensorial de bebidas lácteas contendo 50% de soro de queijo com adição de ferro ou não ao produto pelo teste hedônico de aceitação.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos a partir das análises sensoriais foram avaliados da seguinte forma: para o teste de preferência foi calculado a DMS (Diferença Mínima Significativa) de soma de ordens, baseado no teste de soma de ordens de Friedman (NEWELL; MACFARLANE, 1987), além da determinação da frequência das ordens das amostras de acordo com Demiate et al. (2004). No teste de diferença pelo método triangular foi estabelecido o NMSC (Numero Mínimo de Seleções Corretas) para estabelecer diferença significativa entre as amostras ao nível de 5% de significância (ROESSLER, 1978).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

A Tabela 6 contém os resultados das determinações físico-químicas das bebidas lácteas elaboradas, para cada formulação utilizada, no sétimo dia de estocagem a 4°C.

Tabela 6: Resultados das determinações físico-químicas das bebidas lácteas.

	Gordura (%m/m)	Proteína (%m/m)	Umidade (%m/m)	pH
A10	2,6	2,08	83,16	4,13
A30	2,0	2,02	83,51	4,13
A50	1,6	1,65	85,06	4,20

Em relação à gordura, observa-se que a amostra A50 obteve o menor percentual, enquanto que a amostra A10 o maior, evidenciando que a substituição do leite pelo soro de queijo é inversamente proporcional ao teor de matéria gorda de origem láctea, uma vez que o teor de gordura do leite utilizado foi de 3,3 (%m/m) e o do soro 0,6 (%m/m). Almeida et al. (2001) verificando as características físicas e químicas de bebidas lácteas preparadas com três concentrações de soro de queijo Minas Frescal (30, 40 e 50%), concluíram que à medida que se eleva a proporção de soro em relação ao leite, o teor de gordura diminui. Otero et al.(1995) estudaram bebidas lácteas feitas com leite diluído em soro de queijo e água e verificaram que os valores médios de

gordura encontrados para as bebidas lácteas elaboradas com soro foram ligeiramente superiores aos elaborados com água, devido a maior diluição do leite.

De acordo com a legislação brasileira pertinente (BRASIL, 2005a), bebidas lácteas fermentadas devem apresentar no mínimo 2g/ 100mL de matéria gorda de origem láctica, o que ocorreu com as amostras A10 e A30, estando, desta forma, dentro dos padrões recomendados. Entretanto, a amostra A50, que apresentou 1,6%, não se enquadrou neste padrão de identidade e qualidade, não podendo, portanto receber tal denominação ou ser comercializada como tal.

A diferença entre os valores de umidade foi mais evidente entre as formulações A10 e A50, visto que o percentual de soro de queijo adicionado em A50 foi muito superior às amostras A10 e A30, que obtiveram valores de umidade praticamente semelhantes. Isto pode ser atribuído ao fato de que a substituição do leite pelo soro, em maiores quantidades, aumenta o teor relativo de água no produto à medida que há diminuição dos constituintes sólidos presentes no leite. Segundo os padrões fixados para bebida láctea fermentada (BRASIL, 2005a), não existe valores determinados para umidade neste alimento, apesar disso, os valores encontrados para as três formulações estão próximas ao encontrado por Silva (2000) que foi de 82% para bebida láctea fermentada com adição de polpa de manga e produzida com aproximadamente 30% de soro.

Constatou-se também que à medida que a quantidade de soro adicionado foi aumentada, houve diminuição no teor de proteínas. O teor mínimo de proteína para bebida láctea com leite fermentado é de 1,6 g/ 100mL, de acordo com Brasil (2005a). Desta forma, em relação aos teores de proteínas obtidos, as três amostras produzidas se enquadram no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do produto, podendo receber a denominação de Bebida Láctea com logurte e Polpa de Frutas.

4.1.1 Variação do pH ao longo da estocagem

Os resultados da determinação de pH durante o período de estocagem a temperatura de 4°C mostraram uma pequena variação ao longo dos 35 dias, como pode ser observada na Figura 15, com um valor médio para os três tratamentos em

torno de 4,19. Esta variação, não descaracteriza o padrão do produto, uma vez que o pH normalmente encontrado para bebidas lácteas está em torno de 4,5.

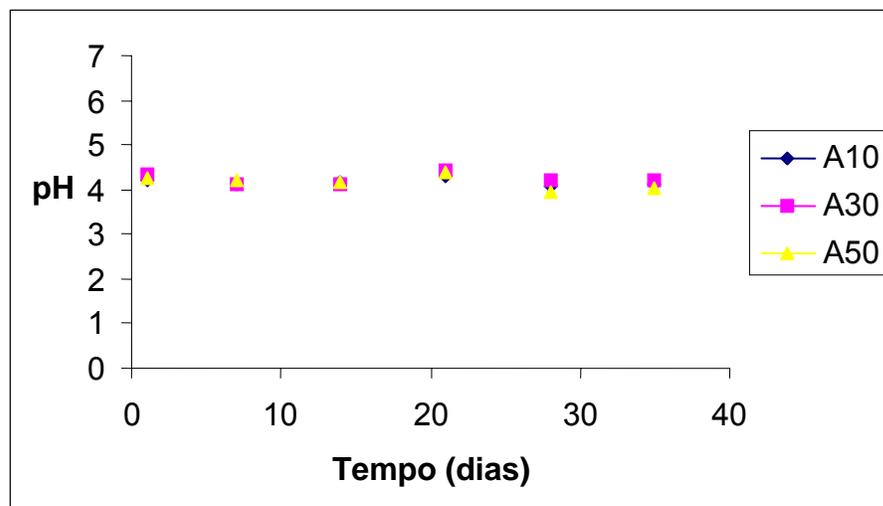


Figura 15: Variação do pH das amostras de bebida láctea nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35 de estocagem a 4°C.

Em seu experimento, Silva (2000) produziu uma bebida láctea fermentada adicionada de aproximadamente 30% de soro de queijo, utilizando cultura de iogurte. Avaliou os valores de pH nos tempos 0, 1, 5 e 7 dias de estocagem a 5°C. O referido autor constatou que o pH declinou gradativamente neste período, atingindo valores que variaram de 4,31 a 4,00. Almeida et al. (2001) produziram produto semelhante e constataram que o pH manteve-se em torno de 4,6 durante 28 dias de estocagem.

Antunes et al. (2005) em experimento verificaram que a pós-acidificação de iogurtes, enriquecidos com concentrado protéico de soro e fermentados pela ação de cultura láctea de iogurte e probióticos, tiveram valores de pH, crescimento e viabilidade de microrganismos distintos. Enquanto que no produto contendo *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, o pH após sete dias de estocagem foi de 4,16; no leite fermentado contendo cultura láctea tradicional de iogurte, adicionada a probióticos (*Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum*), o pH foi de 4,35; porém nestas amostras foram adicionadas quantidades menores de *L. bulgaricus*. Evidenciando a importância do *L. bulgaricus* na pós-acidificação de leites fermentados.

Observou-se que o NMP de Coliformes Totais, para as três formulações apresentou-se dentro dos padrões designados pela legislação (BRASIL, 2005a), que é de no máximo 100 coliformes/ mL. Apenas na formulação A10, no primeiro dia estocagem, foi verificada uma contagem maior de Coliformes Totais, porém ainda dentro dos padrões.

Tal fato pode ser explicado pela adequação da limpeza e sanitização realizada na “linha de leite” e equipamentos durante a produção das amostras deste experimento. Ao considerar que a amostra A10 foi a primeira a ser produzida, seguida pelas amostras A30 e A50, constatou-se que houve melhora na eficácia da limpeza e sanitização empregadas, visto que as contagens iniciais de Coliformes Totais das amostras A30 e A50 foram menores do que três conforme Tabela 8.

Em relação aos Coliformes Fecais, exceto pela amostra A10 que no dia primeiro de estocagem apresentou Número Mais Provável igual a 4,0; todas as demais contagens foram zero. Apesar disso, a amostra A10 poderia ser comercializada se fosse o caso, pois a legislação pertinente estabelece como limite máximo para contagem de Coliformes Fecais a presença de 10 coliformes por mL do produto.

A partir da segunda bateria de análises realizadas, que se iniciaram no 7º dia até o 35º dia de conservação, as análises bacteriológicas de contagem de Coliformes Totais e Fecais foram menores que três, conforme Tabela 8 e Figura 16.

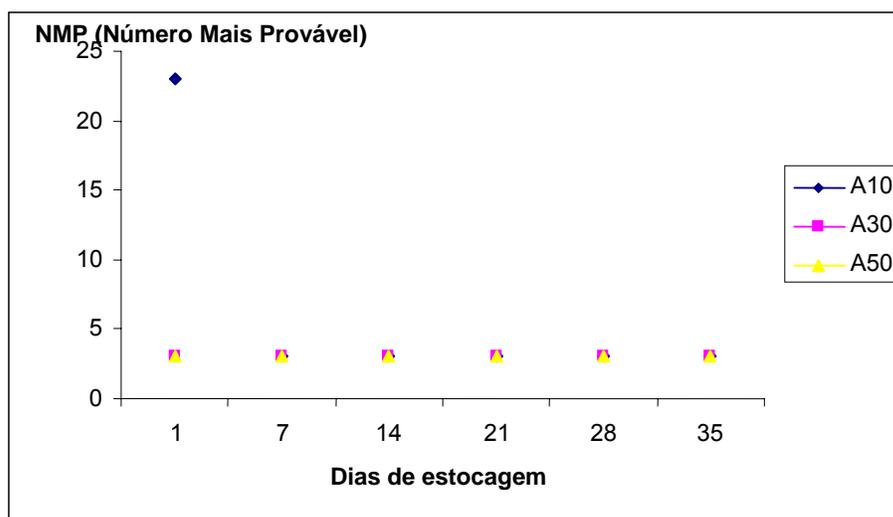


Figura 16: NMP de Coliformes Totais nas amostras em análises realizadas nos dias 1, 7, 14, 21, 28 e 35 de estocagem a 4°C.

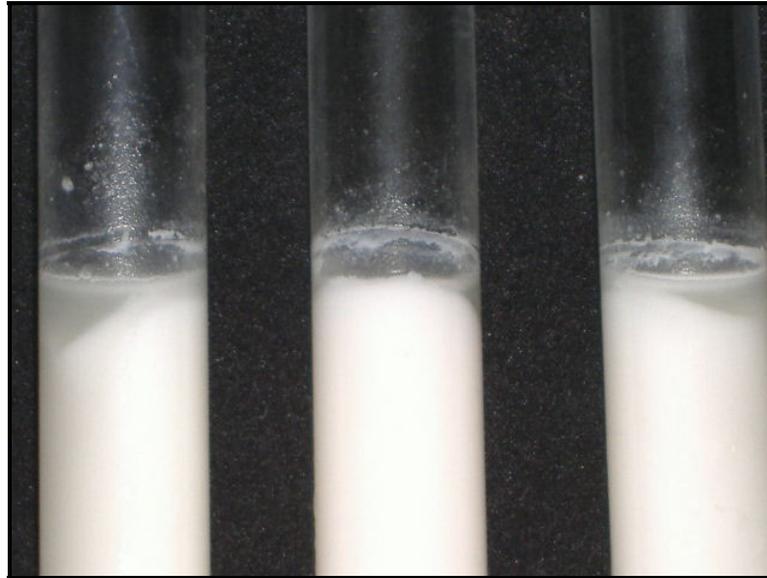
A redução no número de Coliformes Totais e Fecais nas amostras durante o decorrer do experimento pode ser explicado pela presença da microbiota láctica existente no produto. Ao fermentar a lactose através de suas enzimas, o *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus* e o *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* produzem não só bacteriocinas que são prejudiciais ao desenvolvimento de outros microrganismos competitivos, como também ácido láctico, que confere acidez ao produto conforme os achados de Silva (1997). A presença de bacteriocinas e a acidez desenvolvida mostraram-se ser prejudiciais ao crescimento dos Coliformes Totais e Fecais, favorecendo o aumento da qualidade higiênica do produto lácteo fabricado. Desta forma, observou-se que no período compreendido entre a primeira análise bacteriológica (1º dia de conservação) e a segunda (7º dia) houve redução no número de Coliformes Totais e Fecais, permanecendo constante até o 35º dia de conservação.

Carminati et al. (2001) utilizaram *S. thermophilus* como microrganismo de biocontrole em experimento com queijo mascarpone inoculado com *Clostridium sporogenes*, devido à capacidade do *S. thermophilus* em metabolizar rapidamente a lactose, liberando ácido láctico e conseqüentemente causando a acidificação do substrato; impedindo a germinação de esporos, o crescimento de formas vegetativas do *C. sporogenes* e a liberação de suas toxinas. Este fato demonstra a importância da acidificação correta como uma forma de preservação da qualidade e prevenção de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) conforme afirmam diversos autores (MARTINS; LUCHESE, 1998; VEDAMUTHU, 1991; VOSNIAKOS et al, 1991).

Em relação ao isolamento de *Salmonella* spp., determinou-se ausência deste microrganismo em 25 mL do produto, estando portanto de acordo com os padrões fixados por Brasil (2003b). Segundo Jay (2005) o pH ótimo de crescimento de *Salmonella* spp. está próximo da neutralidade, em torno de 6,6 a 8,2, sendo considerados bactericidas valores acima de 9,0 e abaixo de 4,0.

Nas provas de lactofermentação ao longo do tempo de estocagem, foi observado que a cultura manteve-se viável por todo o período do experimento; o que foi caracterizado pela formação de um coágulo consistente, sem a presença de gás, sem formação de estrias e sem liberação de soro, indicando o crescimento apenas de bactérias lácticas, conforme pode ser observado na Figura 17. Caso houvesse

contaminação por outro microrganismo no produto, haveria competição interespecífica pelo substrato, logo o coágulo formado se apresentaria com uma formação irregular, de pouca consistência, podendo haver formação de gases e estrias, sendo facilmente visualizado nesta prova.



Figuras 17: Demonstração da viabilidade qualitativa da cultura láctica nas amostras de bebida láctea produzidas.

A bacterioscopia foi realizada a partir de alíquotas coletadas dos tubos de ensaio utilizados para a determinação da viabilidade láctea, conforme pode ver visto na Figura 18. Durante a observação das lâminas constatou-se a presença de microrganismos com características morfofotinturiais de espécies do gênero *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp., entretanto este último foi visualizado maior número de vezes nas lâminas confeccionadas a partir do 28º dia de conservação, corroborando com a afirmação de Ferreira (1996), que durante a fermentação com o uso da cultura de iogurte, após a inoculação, bactérias do gênero *Lactobacillus* spp. crescem mais devagar no início do seu desenvolvimento, mas permanecem viáveis por tempos maiores que as do gênero *Streptococcus* spp., por serem mais resistentes a acidez desenvolvida. O *Streptococcus* spp., por sua vez, cresce rapidamente no início do processo, mas por causa de sua sensibilidade à acidez é sobrepujado pelo *Lactobacillus* spp., caracterizando os fenômenos de simbiose e antibiose.



Figura 18: Visualização da característica morfotintorial de *Lactobacillus* spp. presente nas amostras de bebida láctea produzidas.

4.3 ANALISES SENSORIAIS

No teste de preferência foram realizadas 40 degustações. Cada provador deveria ordenar as amostras formuladas com 10, 30 e 50% de soro de queijo de acordo com sua preferência, tendo sido obtido os seguintes valores de soma de ordem 54, 83 e 91 respectivamente. A diferença de soma de ordens entre as amostras A10, A30 e A50 quanto à preferência dos julgadores está contida na Tabela 8.

Tabela 8: Diferença de soma de ordens entre as amostras A10, A30 e A50 quanto à preferência dos julgadores obtida pelo Teste de Ordenação da Preferência.

Diferença da soma de ordens (DMS)	Módulos da diferença
A10 – A30	29,0 (s)
A10 – A50	37,0 (s)
A30 – A50	8,0 (ns)

(s) = significativo (ns) = não significativo. DMS - Diferença Mínima Significativa ($p < 0,05$) = 21

De acordo com o teste de soma de ordens de Friedman, o valor de DMS (Diferença Mínima Significativa) para se obter diferença significativa entre tratamentos ao nível de 5% era de 21. Desta forma, concluiu-se que as amostras formuladas com 30 e 50% de soro (A30 e A50) não diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$), sendo consideradas como as preferidas pelos julgadores. Enquanto que a amostra com 10% de soro (A10) diferiu significativamente das demais, sendo considerada como a menos preferida pelos julgadores.

Tal resultado pode ser atribuído ao fato da amostra A10 parecer menos doce do que A30 e A50, pois grande parte dos provadores indicou tal diferença no espaço reservado aos comentários subjetivos da ficha de avaliação. Logo, constatou-se que o aumento na adição de soro é diretamente proporcional ao atributo doçura, o que pode ser explicado pela grande quantidade de lactose encontrada no soro de queijo (MAWSON, 1994), responsável pela preferência dos provadores.

A Figura 19 demonstra a frequência das posições (1º, 2º e 3º lugares) escolhidas pelos julgadores para as amostras A10, A30 e A50 durante o teste de ordenação da preferência.

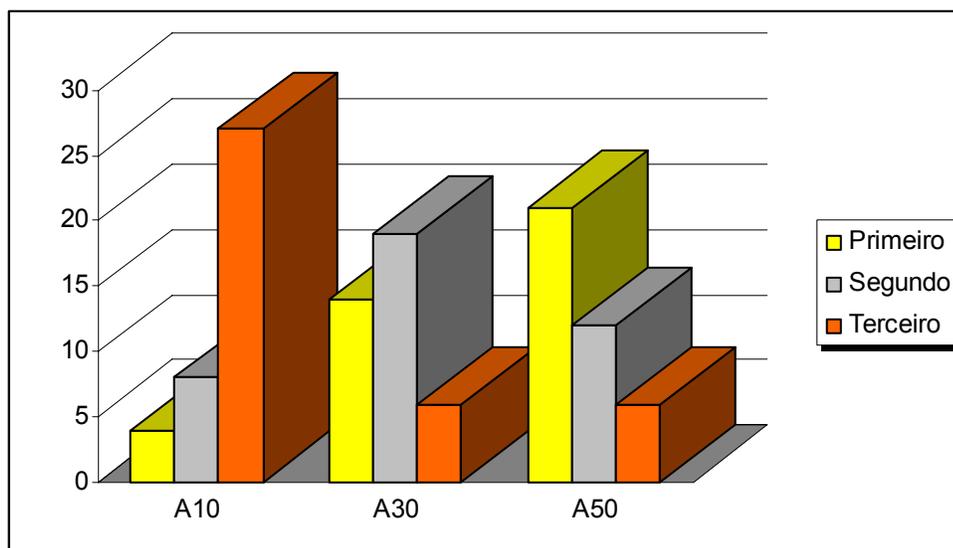


Figura 19: Frequência das posições das amostras A10, A30 e A50 quanto à preferência dos julgadores obtida pelo Teste de Ordenação da Preferência.

Observando-se os resultados que estão expressos na Figura 19, a amostra A50 ficou na primeira posição o maior número de vezes e apesar da A30 ter apresentado

maior freqüência na segunda posição, suas médias são idênticas, visto que ambas tiveram a mesma freqüência na terceira posição.

No teste de diferença pelo método triangular, o provador deveria identificar qual das três amostras servidas seria a diferente. Para tal, foram servidas as amostras contendo 50% de soro de queijo enriquecidas com ferro quelato aminoácido (A50F) ou não enriquecida com ferro quelato aminoácido (A50). Foram realizadas 90 degustações, sendo obtidos 26 julgamentos errados e 64 certos. De acordo com ROESSLER et al. (1978) o número mínimo de seleções correta para estabelecer diferença significativa ao nível de 5% seriam de 38 acertos. Os resultados dos julgamentos e o número mínimo de seleções corretas estão inseridos na Figura 20.

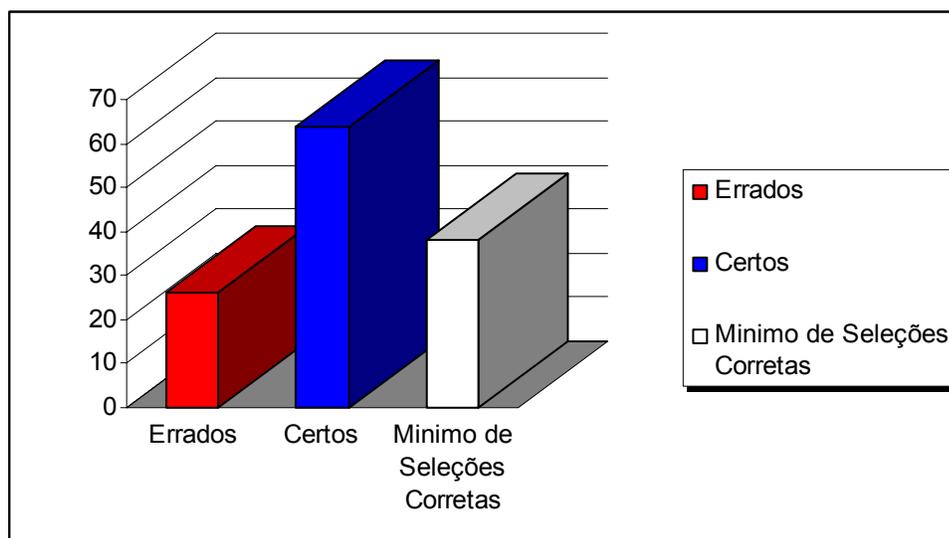


Figura 20: Freqüência de acertos quanto à percepção ou não do ferro quelato aminoácido na amostra A50 obtida pelo Teste de Diferença pelo Método Triangular.

Desta forma, foi possível constatar que a presença de ferro quelato aminoácido na concentração de 1,5 mg ferro/ 100mL do produto acabado, que corresponde a 25% da IDR de crianças entre quatro e seis anos de idade foi percebida por adultos.

Soglia (1995) verificou que é possível enriquecer o leite fluido pasteurizado com até 24 mg de ferro/ litro na forma de ferro aminoácido quelato sem afetar sua qualidade sensorial, durante o período de estocagem de 72 horas, quando mantido sob refrigeração a 5°C. Além disso, o referido autor observou que o uso de sulfato ferroso

nas dosagens superiores a 12 mg de ferro/ litro promove alterações perceptíveis no sabor do leite pasteurizado mantido a 5°C.

O teste de aceitação realizado por provadores entre quatro e sete anos de idade com utilização de escala hedônica facial de cinco pontos foi realizado em duas sessões de testes, sendo uma para o produto bebida láctea contendo 50% de soro de queijo com adição de ferro quelato aminoácido na concentração de 1,5% (A50F) e a outra para a bebida láctea também com 50% de soro, mas sem adição de ferro (A50).

Para a escala hedônica facial foram atribuídos conceitos às figuras que variam da esquerda para a direita em “desgostei extremamente”, “desgostei”, “indiferente”, “gostei”, “gostei extremamente”. Além disso, foram atribuídos valores numéricos que variam de -2 para “desgostei extremamente” a +2 para “gostei extremamente”, sendo o “indiferente” igual a zero.

Desta forma, a média do escore de aceitação obtida para a amostra A50F foi de 1,938053, enquanto que para o teste com a amostra A50 foi de 1,834783, correspondendo a 97,0% e 91,5% respectivamente. O que permitiu concluir que ambos os resultados foram positivos para provadores com idade entre 4 e 7 anos, cuja a aceitação dos produtos variou entre os termos hedônicos “gostei” e “gostei extremamente”.

Silva (2000) utilizou escala hedônica facial com três pontos para realização de teste de aceitação de bebida láctea fermentada com polpa de manga fortificada com ferro aminoácido quelato entre pré-escolares em Viçosa que apresentou como resultado, a média de 7,1 correspondendo a 78% do valor máximo de aceitação da escala hedônica facial de três pontos, representado pela categoria “gostei extremamente”.

Conforme pode ser verificado pelos resultados, a presença ou não do ferro, não exerceu influência negativa na aceitabilidade da bebida láctea pelas crianças, além disso, a aceitação dos produtos foi elevada, indicada pela atitude receptiva das crianças, com freqüentes solicitações de repetição.

5 CONCLUSÃO

No presente estudo, as formulações contendo 10 e 30% de soro foram consideradas aptas para a produção pela indústria. Apesar da amostra com 50% de soro ter maior freqüência na primeira posição da preferência entre provadores adultos, na determinação de gordura exigida pela legislação pertinente a amostra A50 teve parâmetro inferior ao estipulado que seria de 2,0%, não podendo, portanto, receber a denominação de bebida láctea fermentada com adição de polpa de frutas. Desta forma, a amostra A30 foi considerada a ideal para a produção, pois além de se enquadrar nos parâmetros físico-químicos estabelecidos, apresentou percentual de proteína elevado, próximo ao da amostra A10 e não diferiu significativamente ($p < 0,05$) da amostra A50 quanto à preferência dos julgadores, que consideraram as amostras A30 e A50 as mais preferidas.

Apesar da presença de ferro quelato aminoácido na concentração de 1,5mg/100mL ter sido percebida pelos provadores adultos na amostra de bebida láctea contendo 50% de soro de queijo, não foi observada influência na aceitação pelo público infantil, portanto sugere-se a realização de testes sensoriais a fim de caracterizar como os atributos sensoriais influenciam a aceitação do produto.

Comprovou-se que há diferença significativa entre os padrões físico-químicos das amostras produzidas, desta forma o industrial pode optar por diferentes concentrações de soro de queijo na formulação do produto apenas modificando seus percentuais, mas vale ressaltar que de acordo com os padrões fixados, o percentual de soro utilizado nestas condições deve ser inferior a 50%. Sugere-se, portanto, a

realização de estudos a fim de verificar o limite máximo de soro de queijo permitido no produto para que seus parâmetros estejam dentro dos limites legais.

Em relação à tecnologia de produção de bebidas lácteas, concluiu-se que a utilização do soro de queijo na elaboração de bebidas lácteas fermentadas é uma das formas de aproveitar as características nutricionais deste subproduto, pois permite melhor aproveitamento de seus nutrientes, como proteínas de alto valor biológico. Além disso, verificou-se que com a utilização de equipamentos simples e poucos insumos é possível produzir bebida láctea dentro dos padrões de qualidade e identidade de bebidas lácteas. Desta forma, a associação entre a utilização de soro de queijo e o enriquecimento com ferro para a produção de bebidas lácteas representa uma importante maneira de se veicular um alimento de baixo custo, mas com características nutricionais importantes.

Em relação às análises bacteriológicas, concluiu-se que a presença da microbiota láctea inibe o crescimento de Coliformes Totais e Fecais por haver uma diminuição no NMP de Coliformes Totais como foi observado nas análises realizadas entre os dias um e sete de estocagem da amostra a 4°C contendo 10% de soro de queijo, o que aumenta a segurança do produto contra DTA.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQ (Associação Brasileira das Indústrias de Queijo) Disponível em: <<http://www.abiq.com.br>>. Acesso em: 20 dez. 2005.

ALAIS, C.H. Ciência de la leche $\frac{3}{4}$ *Principios de Técnica Lechera*, Ed. Revertè. Trad. D.A.L. GODINA, Barcelona (España), p. 763-767, 1985.

ALMEIDA, A.D.P.C. *Prevalência de anemia em crianças de seis meses a seis anos na cidade de Vitória, ES* (dissertação mestrado). Minas Gerais: Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina na Universidade Federal de Minas Gerais, 2000.

ALMEIDA, K.E.; BONASSI, I.A.; ROÇA, R.O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 21 (2), p. 187-192, Maio-Ago. 2001.

ALMEIDA, C.A.N.; RICCO, R.G.; CIAMPO, L.A.D.; SOUZA, A.M.; PINHO, A.P.; DUTRA DE OLIVEIRA, J.E. Fatores associados a anemia por deficiência de ferro em crianças pré-escolares brasileiras. *Jornal de Pediatria*, v. 80, p. 229-234, 2004.

ANGELIS, R.C.D.; CTENAS, M.L. Biodisponibilidade de ferro na alimentação infantil. *Nestlé, Temas de Pediatria*, v. 52, n. 33, 1993.

ANTUNES, A.E.C.; CAZETTO, T.F.; BOLINI, H.M.A. Viability of probiotic microorganisms during storage, postacidification and sensory analysis of fat-free yogurts with added whey protein concentrate. *International Journal of Dairy Technology*, v. 58, n. 3, August, 2005.

ASSIS A.M.O., BARRETO, M.L. Condições de vida, saúde e nutrição na infância em Salvador. Salvador: UFBA; 2000.

AUDIC, J.L.; CHAUFER, B.; DAUFIN, G. Non-food applications of milk components and dairy co-products: A review. *Lait* v. 83, p. 417-438, 2003.

BATISTA FILHO, M.B.; FERREIRA, L.O.C.; Prevenção e tratamento da anemia nutricional ferropriva: novos enfoques e perspectivas. *Caderno de Saúde Pública*, v. 12, p. 411-415, 1996.

BATISTA FILHO, M.B. Editorial: O controle das anemias no Brasil. *Revista Brasileira Saúde Materno Infantil*, Recife, v. 4, n. 2, p. 121-123, abr./jun., 2004.

BEM-HASSAN, R.M.; GHALY, A.E. Continuous propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey for pollution potential reduction. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 47, p. 89-105, 1994.

BIANCHI, M.L.P., SILVA, H.C., OLIVEIRA, J.E.D. Considerações sobre a biodisponibilidade de ferro dos alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 42, n. 2, p. 94-100, 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento de Inspeção de produtos de Origem Animal. Regulamento da Inspeção Industrial e sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. Aprovado pelo decreto n 30691 de 29.03.1952, alterado pelo decreto n 1255 de 25.06.1962. Brasília, 1997.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n° 31, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o *Regulamento Técnico referente a Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais*. Brasília, 1998.

_____. Ministério da Agricultura. Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Instrução Normativa sda n° 22, de 14 de abril de 2003 a.

_____. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água Instrução Normativa n° 62 de 26 de agosto de 2003 b.

_____. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas. Aprovado pela Instrução Normativa n° de _____. Brasília, 2005 a.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n° 269, de 22 de setembro de 2005. Aprova o *Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais*. Brasília, 2005b.

BREMNER, I.; BEATTIE J.H. Copper and zinc metabolism in health and disease: speciation and interactions. *Proc. Nutr. Soc.*, v. 54, p. 489-99, 1995.

CARDOSO, M.A.; PENTEADO, M.V.C. Intervenções nutricionais na anemia ferropriva. *Caderno de Saúde Pública*, v. 10, p. 231-240, 1994.

CARMINATI, D.; PERRONE, A.; NEVIANI, E. Inhibition of *Clostridium sporogenes* growth in mascarpone cheese by co-inoculation with *Streptococcus thermophilus* under conditions of temperature abuse. *Food Microbiology*, v. 18, p. 571-579, 2001.

CASTROL, T.G.; NOVAES, J.F.; SILVA, M.R.; COSTA, N.M.B. FRANCESCHINI, S.C.C.; TINÔCO, A.L.A.; LEAL, P.F.G. Caracterização do consumo alimentar, ambiente socioeconômico e estado nutricional de pré-escolares de creches municipais. *Revista de Nutrição*, v.18, n.3 Campinas. Maio/Jun. 2005

CAYOT, P.; LORIENT, D. Structure-function relationships of whey proteins. *In Food Proteins and their Applications*, 225-256 (Eds S Damodaran & A Paraf,). Marcel Dekker Inc. 1997

CERNING, J. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, v. 87, p. 113-130, 1990.

CHAVES, J.B.P. Métodos de Diferença em Avaliação Sensorial de Alimentos e Bebidas. Viçosa – MG: *Imprensa Universitária*, Universidade Federal de Viçosa, p. 14-23, 1993.

_____.; SPROESSER, R.L. Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas. Universidade Federal de Viçosa: *Imprensa Universitária*, 1993. 81p.

COUZI F., KEEN C., GERSHWIN M.E., MARESHI J.P. Nutritional implications of the interactions between minerals. *Progr Food Nutr Scie*; v. 17, p. 65-87, 1993.

COZZOLINO S.M. Biodisponibilidade de minerais. *Revista de Nutrição*, v.10, n. 2, p. 87-98, 1997.

DALEV, P.G. Utilization of waste whey as a protein source for production of iron proteinate: an antianemic preparation. *Bioresource Technology*, v. 48, p.75-77, 1994.

DE MAEYER, E.M.; DALLMAN, O.; GURNEY, J.M.; HALLBERG, L.; SOOD, S.K; SRIKANTIA, S.G. Preventing and Controlling Iron Deficiency Anaemia Through Primary Health Care. Geneva: World Health Organization, 1989.

DE WIT, J. N. Functional properties of whey proteins. *In Development in dairy chemistry*, 4, Elsevier applied Science, New York, 1989, 285p.

DE WITH, J.N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science*, v.81, n.3, p.597-608, 1998.

DEMIATE, I.M.; KONKEL, F.E.; OLIVEIRA, S.M.; SIMÔES, D.R.S. Avaliação sensorial de doce de leite pastoso com diferentes concentrações de amido. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 24, n. 2, p. 249-254, abr.-jun. 2004.

DI GIACOMO, G.; DEL RE, G.; SPERA, D. Milk whey treatment with recovery of valuable products. *Desalination*, v. 108, p. 273-276, 1996.

EL MAGIOLI, S.B.; LARROIA, S.; FOEGEDING, E.A. Rheological characterisations of a gel formed during extensive enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Science*, v. 66, p. 711-715, 1996.

EMBRAPA. *Importação brasileira de produtos lácteos (mil kg) 1998-2004*. Disponível em: <<http://www.cnpq.embrapa.br>>. Acesso em: 26 abr. 2005.

FERREIRA, C.L.L.F. Produtos lácteos fermentados (aspectos bioquímicos e tecnológicos). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1996. 96p.

FERREIRA, V.L.P. (Coord.). Análise sensorial – Testes discriminativos e afetivos. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. *Manual Série Qualidade*, p. 73-77, 2000.

FOEGEDING, E.A.; DAVIS, J.P.; DOUCET, D.; MCGUFFEY, M.K. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science and Technology*, v. 13, p. 151-159, 2002.

GANDHI, D.N.; PATEL, R.S. Technology and keeping quality of fermented whey concentrate. *Cultured Dairy Products Journal*, v. 29, n. 1, p. 25-27, 1994.

GUTIÉRREZ-SIGLER, D.; COLOMER-REVUELTA, J.; BARONA, C.; MOMPARDER, P.; COLOMER-REVUELTA, C. Asociación entre carencia de hierro y transtornos del aprendizaje em la edad preescolar. *Gac. Sanit.*, v. 6, p. 207-211, 1992.

HA, E.; ZEMEL, M.B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 14, p. 251- 258, 2003.

HARPER W.J. Lactose and lactose derivatives, in: Zadow J.G. (Ed.), *Whey and Lactose Processing*, Elsevier Appl. Sci. London, England, p. 317-360, 1992.

HOFFMANN, F.L.; PAGNOCCA, F.C.; FAZIO, M.L.S.; VINTURIM, T.M. Iogurte: Falta de cuidados altera qualidade microbiológica. *Revista do Instituto Laticínios Cândido Tostes*, v.1, n. 4, p. 32-34, 1996.

IOST, C.; NAME, J.J.; JEPPSEN, R.B.; ASHMEAD, E.D. Repleting hemoglobin in iron deficiency anemia in young children through liquid milk fortification with bioavailable iron amino acid chelate. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 17, n. 2, p. 187-194, 1998.

JAY, J.M. *Microbiologia de Alimentos*. Artmed, 6 ed., 2005, 711p.

KAHN, R.; ROMSLO, L.; LAMVIK, J. Anemia in general practice. *Scand j Clin Lab Invest*, 200s, p. 41-45, 1990.

KIM, H.S., GILLILAND, S.E. Lactobacillus acidophilus as a dietary adjunct for milk, to aid lactose digestion in humans. *Journal Dairy Science*, v. 66, n. 3, p. 53-59, 1993.

KANDLER, O.; WIESS, N. Regular, Nonsporing Gram-Positive Rods In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. *Bergey s Manual of Systematic Bacteriology*, v.2, 1579 p. 14 s., 1208-1234, 1986.

KOSIKOWSKI, F.V. Whey utilization and whey products. *Journal Dairy Science*, v. 62, p. 1149-1160, 1979.

KROGER, M.; KURMANN, J.A.; RASIC, J.L. Fermented milks – past, present and future. *Food Technology*, v. 43, n. 1, p. 92-99, Jan/1989.

LESHAN, L.; GOTTLIEB, M.; MARK, D. Anemia is prevalent in an urban African-American adolescent population. *Arch Fam Med*, v. 4, p. 433-437, 1995.

LOBOL, A.S.; TRAMONTELL, V.L.C. *Efeitos da suplementação e da fortificação de alimentos sobre a biodisponibilidade de minerais. Revista de Nutrição.*, v. 17, n. 1 Campinas jan./mar. 2004

MACINTOSH, G.H.; ROYLE, P.J.; LE LEU, R.K.; REGESTER, G.O.; JOHNSON, M.A.; GRINSTED, R.L.; KENWARD, R.S.; SMITHERS, G.W. Whey proteins as functional food ingredients? *International Dairy Journal*, v. 8, p. 425-434, 1998.

MANZANARES, A. Lácteos de alto consumo en Latinoamérica. *Tecnologia Láctea Latinoamericana*, v. 5, p. 31-39, 1996.

MARTINS, J.F.P.; LUCHESE, R.H. Determinação da compatibilidade de crescimento associativo entre cepas de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. *Revista do Instituto Laticínios Cândido Tostes*, v. 43, 256, 11-13, 1988.

MATTA, I.E.A.; VEIGA, G.V.; BAIÃO, M.R.; SANTOS, M.M.A.S.; LUIZ, R.R. Anemia em crianças menores de cinco anos que freqüentam creches públicas do município do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira Saúde Materno Infantil*, Recife, v. 5, n. 3, p. 349-357, jul./set., 2005.

MAWSON, A.J. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresource Technology*, v. 47, p. 195-203, 1994.

MEILGARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. Sensory evaluation techniques. *CRC Press*, v. 3, p. 52-292, 1999.

MERCIER, A.; GAUTHIER, S.F.; FLISS, I. Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests. *International Dairy Journal*, v. 14, p. 175-183, 2003.

MONTEIRO, C.A.; SZARFARC, S.C.; MONDINI, L. Tendência secular da anemia na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). *Rev Saúde Pública*. v. 34, n. 6, p. 62-72, 2000.

MOREIRA, S.R., SCHWAN, R.F., CARVALHO, E.P., FERREIRA, C. Análise microbiológica e química de iogurtes comercializados em Lavras, MG. *B. SBCTA*, v.19, n.1, p. 147-152, 1999.

MORR, C.; HA, E. W. Whey protein concentrates and isolates processing and functional properties critical reviews. *Food Science and Nutrition*, v. 33, n.6, p. 431-476, 1993.

MOSQUIM, M.C.A.V. Propriedades Funcionais do soro de queijo. *IN: Encontro Divital de Tecnologia de Laticínios*, Viçosa, MG, 3, 1996.

NAKAJIMA, H.; TOYODA, S.; TOBA, T.; ITOH, T.; MUKAI, T.; KITAZAWA, H.; ADACHI, S. A novel phosphopolysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* SBT 0495. *Journal of Dairy Science*, v. 73, p. 1472-1477, 1990.

NEWELL, G.J.; MACFARLANE, J.D. Expanded tables for multiple comparison procedures in the analyses of ranked data. *Journal of Food Science*, v. 52, n. 6, p. 1721-1725, 1987.

OLIVEIRA, R.S.; DINIZ, A.S.; BENIGNA, M.J.C.; MIRANDA-SILVA, S.M.; LOLA, M.M.; GANÇALVES, M.C.; ASCIUTTI-MOURA, L.; RIVERA, M.A.; SANTOS, L.M.P. Magnitude, distribuição especial e tendência da anemia em pré-escolares da Paraíba. *Rev. Saúde Pública*, v. 36, p. 26-32, 2002.

OMS (Organização Mundial de la Salud), Lucha contra la anemia nutricional, Especialmente contra la carência de hierro.- *Série de Informes Técnicos*, 580. Ginebra: OMS, 1975.

_____.The prevalence of anaemia in women: a tabulation of available information. Geneva, 1992.

_____. Iron deficiency anemia: assessment, prevention and control. A guide for programme managers. Geneva, 2001

OTERO, M.; RODRIGUEZ, T.; CAMEJO, J.; CARDOSO, F. Bebida Láctea fermentada. *Alimentaria*, v. 32, 260, p. 93-95, 1995.

PAL, D.; SACHDEVA, S.; SINGH, S. Methods for determination of sensory quality of foods: A critical appraisal. *J Food Science*, v. 32, n. 5, p. 357- 367, 1985.

PENNA, A.L.B. *Parâmetros reológicos de gomas para a fabricação de bebidas lácteas à base de soro*. [Monografia].São Paulo: FCF/USP, 1997. 128p.

PERDIGON, G.; ALVAREZ, S.; VALDEZ, J.C. Acción de bacterias lácticas y yogur sobre la respuesta inmune: Sistémica, de mucosas y tumoral. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, v. 2, p. 26-30, 1995.

PÊSSOA, C.A, JORDÃO, E.P. , Tratamento de esgotos domésticos. Rio de Janeiro: Edição: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES, cap.2, p. 9-29, 1982.

PISCOYA, M.D.B.D.V. *Anemia ferropriva em crianças aos 12 meses em quatro municípios de Pernambuco* (dissertação mestrado). Recife: Departamento Materno Infantil da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco; 2001.

PORTER, J.W.G. Leche y productos lácteos. Trad. J.L.B. ESCALADA, Ed. Acribia, Zaragoza (España), p. 71-74, 1981.

QUEIROZ, S.S. O papel do ferro na alimentação infantil. *Nestlé, Temas de Nutrição em Pediatria*, v. 1, p. 7-12, 2001.

RASIC, L. L. J., KURMANN, J. A. Nutritive and health values of dairy foods containing bifidobacteria. In: RASIC, L. L. J., KURMANN, J. A. *Bifidobacteria and their role*. Basel: Birkhäuser Verlag, p. 81-101, 1993.

REIS, G.L. Sistema de Gestão Ambiental em Laticínios. *Revista Instituto Laticínio Cândido Tostes*, Mai-Jun., 308, 54, p. 35-47, 1999.

RENNER, E. Micronutrients in milk and milk based food products. Elsevier Science Publishing co., New York. 311p., 1989.

ROESSLER, E.B.; PANGBORN, R.M. SIDEL, J.L.; STONE, H. Expanded statistical tables for estimating significance in paired-preference, paired-difference, duo/trio and triangle tests. *Journal of Food Science*, v. 43, n. 3, p. 940-943, 1978.

SANT'ANA, L.F.R. *Biodisponibilidade de cálcio e ferro em multimisturas utilizadas como alternativa alimentar*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Viçosa: UFV, 1997. 122p. – Universidade Federal de Viçosa, 1997.

SEVERO, L.M.B. *Desenvolvimento de uma bebida láctea à base de soro de leite fermentado*. Londrina: UEL, 1995. 74p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, 1995.

SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. *Bol SBCTA*, v. 32, n. 1, p. 105-126, 1998.

SIDEL, J.L., STONE, H., BLOOMQUIST, J. Use and misuse of sensory evaluation in research and quality control. *Journal of Dairy Science*, v. 64, n. 11, p. 2296-2302, 1981.

SIENKIEWICZ, T.; RIEDEL, C.L. *Whey and Whey Utilization*. Th. Mann, Germany, 1990.

SIGULEM, D..M. Epidemiologia de anemia ferropriva na infância. *Boletim Revista da Sociedade Brasileira de hematologia e Hemoterapia*. São Paulo, v. 10, p. 103-107, 1998.

SILVA, L.S.M.; GIUGLIANI, E.R.J.; AERTS, D.R.G.C. Prevalência e determinantes de anemia em crianças de Porto Alegre, RS, Brasil. *Revista Saúde Pública*; v. 35, p. 66-73, 2001

SILVA, M.R. *Efeito de uma bebida Láctea fermentada e fortificada com ferro no estado nutricional de ferro em pré-escolares*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos Viçosa: UFV, 2000.75p.) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.

SILVA, P.H.F. et al. Físico-química do leite e derivados: Métodos analíticos. Juiz de Fora: *Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda.*, 1997. 190p.

SISO, M.I.G. The biological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, v. 57, p. 1-11, 1996.

SIVIERI, K.; OLIVEIRA, M.N. Avaliação da vida-de-prateleira de bebidas lácteas preparadas com "fat replacers" (Litesse e Dairy-lo). *Ciência Tecnologia Alimentos*, v. 22, n. 1 Campinas Jan./Abr. 2002

SOGLIA, S.L.O. *Enriquecimento de leite com ferro aminoácido quelato: Biodisponibilidade e características físico-químicas e sensoriais*. UFV, 1995. *Dissertação* (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1995.

_____; ABREU, L.R.; BARCELOS, M.F.P. Aspectos tecnológicos e nutricionais da fortificação do leite com ferro. *Higiene Alimentar*, v. 15, p. 50-55, 2001.

STONE, H.; SIDEL, J. L. *Sensory Evaluation Practices*. Second edition. San Diego: Academic Press, Inc. new York, 1995. 338p.

SUHARNO, D.; WEST,C.E.; MUHILAI; KARYADI, D.; HAUTVAST, J.G.A., Suplementation with vitamin A and iron for nutritional anaemia in pregnant women in West Java, Indonesia. *The Lancet*, 342, p. 1325-1328, 1993..

TAMINE, A.Y.; ROBINSON, R.K. *Logur Ciência y Tecnologia*, Zaragoza, Acribia, 1991. 368p.

TEIXEIRA, V.Q.; CORTEZ, M.A.S.; SILVA, C.; PLATTE, C. S.; SILVA, A. Comercialização de produtos lácteos com a adição de soro de queijo e avaliação do conhecimento do consumidor em relação a essa adição. *Anais (Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, Búzios, RJ)*, 2005.

TORREJÓN, C.S.; CASTILLO-DURÁN, C.; HERTRAMPF, E.D.; RUZ, M. Zinc and iron nutrition in Chilean children fed fortified milk provided by the complementary national food program. *Nutrition*, v. 20, n. 2, p. 177-180, 2004.

TORRES, M.A.A.; LOBO, N.F.; SATO, K.; SOUZA QUEIROZ, S. Fortificação do leite fluido na prevenção e tratamento da anemia carencial ferropriva em crianças menores de 4 anos. *Revista de Saúde Pública*, v. 30, p. 350-357, 1996.

TOSI, E.; CAZOOLY; CATALANO, O. Uso de la harina de triticale y suero de leche ultrafiltrado em polvo para la fabricación de pastas frescal. *Alimentaria*, v. 39, p. 39-41, 1997.

UGIETTE, S. M.A. Análise econômica da utilização de resíduo de indústria de queijo (soro de leite) em substituição ao leite de cabra na alimentação artificial de cabritos. João Pessoa - PB, 1990, p.159. *Anais (Simpósio Nordeste de Nutrição de Ruminantes)*, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1990.

VEDAMUTHU, E.R. The yogurt story $\frac{3}{4}$ past, present and future. Part. VI. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, v. 11, n. 9, p. 513-514, 1991.

VEISSEYRE, R. Lactologia Técnica $\frac{3}{4}$ Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche. Ed. Acribia, Zaragoza (España), p. 288-291, 1988.

VITERI, F.E.; HERCBERG, S.; GALAN, P.; GUIRO, A.; PREZIOSI, P. Absorption of iron supplements administered daily or weekly: a collaborative study. *Nestlé Foundation, Annual Report*, p. 83-96, 1993.

VOSNIAKOS, F. Effect of lactic acid microflora of yoghurt. *Dairy Food and Environmental Sanitation*, v. 8, n. 11, p. 433-435, 1991.

YETIM, H.; MULLER, W.D.; EBER, M. Using fluid whey in comminuted meat products: effects on technological, chemical and sensory properties of frankfurter-type sausages. *Food Research International*, v. 34, p. 91- 101, 2001.