

UNIVERSIDADE TIRADENTES - UNIT  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

**DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS LÁCTEOS FERMENTADOS POR  
GRÃOS DE KEFIR COM TEOR DE COLESTEROL REDUZIDO E  
SABORIZADOS COM FRUTAS TROPICAIS**

Autor: Alysso Vieira dos Santos

Orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dra. Cleide Mara Faria Soares

Prof. Dr. Álvaro Silva Lima

ARACAJU, SE - BRASIL

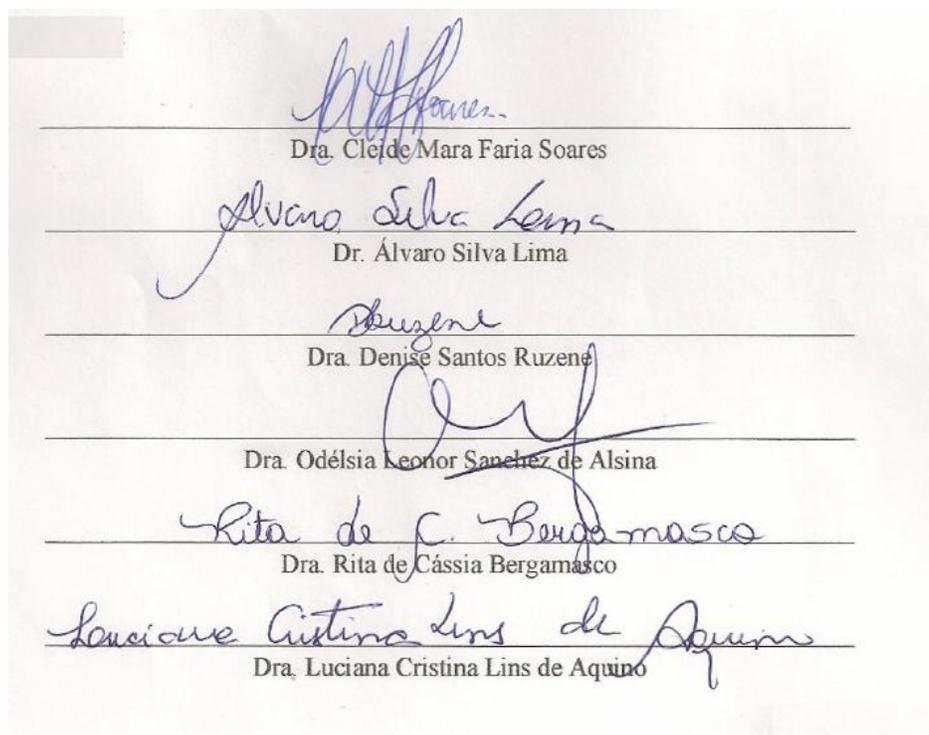
DEZEMBRO DE 2012

DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS LÁCTEOS FERMENTADOS POR GRÃOS  
DE KEFIR COM TEOR DE COLESTEROL REDUZIDO E SABORIZADOS COM  
FRUTAS TROPICAIS

Alysson Vieira dos Santos

TESE SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
DE PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM  
ENGENHARIA DE PROCESSOS

Aprovada por:



*Cleide Mara Faria Soares*  
Dra. Cleide Mara Faria Soares

*Álvaro Silva Lima*  
Dr. Álvaro Silva Lima

*Denise Santos Ruzene*  
Dra. Denise Santos Ruzene

*Odélsia Leonor Sanchez de Alsina*  
Dra. Odélsia Leonor Sanchez de Alsina

*Rita de Cássia Bergamasco*  
Dra. Rita de Cássia Bergamasco

*Luciana Cristina Lins de Aquino*  
Dra. Luciana Cristina Lins de Aquino

ARACAJU, SE - BRASIL

DEZEMBRO DE 2012

## FICHA CATALOGRÀFICA

S237d Santos, Alysson Vieira dos

Desenvolvimento de produtos lácteos fermentados por grãos de kefir com teor de colesterol reduzido e saborizados com frutas tropicais / Alysson Vieira dos Santos; Orientadores: Cleide Mara Faria Soares, Álvaro Silva Lima. – Sergipe, 2012.

130p. :il

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em engenharia de processos) – Universidade Tiradentes, 2013.

1. Impressão molecular 2. Colesterol 3. Kefir 4. Probiótico I. Soares, Cleide Mara Faria (orient.). II. Lima, Álvaro Silva (orient.). III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 66.01

- Aos meus pais e meu irmão, João Vieira, Maria José e Anderson, por terem sempre me direcionado ao caminho dos estudos.
- A minha esposa e meus filhos, Karina, João Neto e Rafael, pelo apoio, compreensão e incentivo.
- Ao meu sogro, minha sogra, meus sobrinhos, minhas cunhadas, meu cunhado e amigos que de uma forma ou de outra contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

## **Agradecimentos**

Primeiramente a Deus, por ter me guiado para esse caminho.

A minha família que sempre unida criou um ambiente agradável e propiciou ao desenvolvimento humano e social que me fez o que hoje sou.

A professora Cleide e ao professor Álvaro pela orientação dedicada e o apoio nos momentos de dificuldades durante a realização deste trabalho.

Aos colegas do curso que tornaram o mesmo agradável.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos da UNIT pelos ensinamentos e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do ITP.

Ao técnico em laboratório Roneval, pela colaboração nas análises realizadas.

Aos alunos de iniciação científica, Flávia, Daiane, Meirielly, Tássia, Iane, Ingridy, Roselayne e Rafaela pela colaboração nas análises realizadas.

Ao Instituto de Tecnologia e Pesquisa – ITP, pelo apoio a realização da pesquisa.

A Universidade Tiradentes – UNIT, FAPITEC/SE, FINEP, SEBRAE e CNPq pelo apoio financeiro.

Resumo da Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Processos.

## DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS LÁCTEOS FERMENTADOS POR GRÃOS DE KEFIR COM TEOR DE COLESTEROL REDUZIDO E SABORIZADOS COM FRUTAS TROPICAIS

Alysson Vieira dos Santos

O estado de Sergipe tem despontado na produção de leite, principalmente na bacia leiteira localizada no noroeste do estado. Entretanto, esta região concentra a produção de produtos como leite e queijos, necessitando diversificar e desenvolver produtos de maior valor agregado e com aroma e sabores regionais. É neste enfoque que o presente trabalho permitiu o desenvolvimento de bebidas lácteas com teor de colesterol reduzido, utilizando grãos de kefir saborizadas com polpa de mangaba ou siriguela. Inicialmente foi avaliada a remoção de colesterol do leite em colunas de adsorção recheadas com partículas de sílica obtidas pela técnica de impressão molecular, empregando o método sol-gel com a presença ou ausência da biomolécula de colesterol, polímero impresso molecular (PIM) ou matriz pura (MP), respectivamente. Em seguida foram empregados grãos de kefir para o desenvolvimento das bebidas lácteas saborizadas com frutas regionais (mangaba ou siriguela). Os produtos foram analisados sensorialmente, avaliado o potencial probiótico e a remoção do colesterol. Dentre os produtos obtidos, o que apresentou melhor resultado sensorialmente foi à bebida com remoção PIM saborizada com mangaba, na qual cerca de 90% dos provadores indicaram que comprariam o novo produto. Com relação ao potencial probiótico das bebidas lácteas, foi utilizado um simulador estômago-duodeno. As bebidas desenvolvidas neste estudo após o percurso gastro-intestinal apresentaram valores com grandeza variando entre  $10^4$  a  $10^6$  UFC/mL, e que de acordo com a Legislação Brasileira é caracterizado produto probiótico. Quanto à remoção do colesterol, a bebida com remoção PIM foi a melhor, atingindo 42,42, 48,25 e 44,47% para as bebidas sem polpa e com 30% de polpa de mangaba e siriguela respectivamente.

Palavras chave: Impressão molecular, colesterol, Kefir, produtos lácteos, probiótico

Abstract of the Thesis presented to the Program of After-Graduation in Engineering of Processes of the Universidade Tiradentes as part of the necessary requirements for the attainment of the degree of Doctor in Engineering of Processes.

DEVELOPMENT OF MILKY PRODUCTS LEAVEND BY KEFIR GRAINS WITH  
REDUCED CHOLESTEROL INDEX AND FLAVORED WITH TROPICAL FRUITS

Alysson Vieira dos Santos

The state of Sergipe has been emerging in milk production, mainly in the dairy basin located in the northeast of the state. However, this area concentrates the production of dairy, developing diverse products with higher aggregated value and scent and regional flavours. With this goal the present work allows the development of dairy drinks with reduced cholesterol index, using kefir grains flavored with mangaba or siriguela pulp. Initially, the removal of milk cholesterol was evaluated in adsorption columns completed with silica particles obtained by molecular impression technique, using sol – gel method with the presence and absence of cholesterol biomolecule, molecular imprinted polymer (PIM) or pure matrix (MP), respectively. Then kefir grains were used for the development of dairy drinks flavored with regional fruits (mangaba or siriguela). The products were analyzed sensorially, evaluated the probiotic potential and the removal of the cholesterol. Among the products obtained, the one that present best result in the sensorially was to the drink with removal PIM flavored of mangaba, for which around 90% of the testers indicated that would buy the new product. In relation with the probiotic potential in the dairy drinks, a stomach-duodenum simulator was used. The dairy drinks developed in this study after the gastro-intestinal route presented values varying from  $10^4$  to  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, and according to Brazilian legislation is characterized as a probiotic product. Removal of the cholesterol, the drink with removal PIM was best, reaching 42.42, 48.25 and 44.47% for drinks without pulp and with 30% of pulp of mangaba and siriguela respectively.

Key words: molecular impression, cholesterol, Kefir, dairy products, probiotic.

# SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVOS.....	4
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	4
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3.	REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1.	NANOTECNOLOGIA.....	5
3.2.	IMPRESSÃO MOLECULAR.....	7
3.3.	ADSORÇÃO.....	13
3.4.	COLESTEROL.....	16
3.5.	LEITE E PRODUTO LÁCTEO.....	17
3.6.	PATENTE.....	20
3.7.	GRÃOS DE KEFIR.....	22
3.8.	FRUTAS REGIONAIS.....	25
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1.	MATERIAL.....	29
4.1.1.	REAGENTES ANALÍTICOS.....	29
4.1.2.	LEITE.....	29
4.1.3.	POLPAS DE FRUTAS REGIONAIS.....	30
4.1.4.	AGENTE BIOLÓGICO.....	30
4.2.	METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	30
4.2.1.	PREPARAÇÃO DO SÓLIDO ADSORVENTE DA COLUNA DE LEITO FIXO.....	30
4.2.2.	AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE COLESTEROL EM COLUNA DE ADSORÇÃO NO PROCESSO EM BATELADA A TEMPERATURA AMBIENTE.....	31
4.2.3.	AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE COLESTEROL EM COLUNA DE ADSORÇÃO NO PROCESSO DE FLUXO CONTÍNUO A TEMPERATURA CONTROLADA.....	32
4.2.4.	AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE COLESTEROL EM COLUNA DE ADSORÇÃO NO PROCESSO DE FLUXO CONTÍNUO A TEMPERATURA CONTROLADA COM AMPLIAÇÃO DE ESCALA.....	33
4.2.5.	AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DA PROTEÍNA EM COLUNA DE ADSORÇÃO NO PROCESSO DE FLUXO CONTÍNUO A TEMPERATURA CONTROLADA.....	34
4.2.6.	PROCESSO FERMENTATIVO.....	35

4.2.7.	ANÁLISE DA CAPACIDADE PROBIÓTICA .....	35
4.3.	MÉTODOS ANALÍTICOS .....	36
4.3.1.	DOSAGEM DO COLESTEROL .....	36
4.3.2.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS PRODUTOS LÁCTEOS .....	37
4.3.2.1.	DETERMINAÇÃO DE UMIDADE .....	37
4.3.2.2.	DETERMINAÇÃO DE CINZAS .....	37
4.3.2.3.	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA .....	37
4.3.2.4.	DETERMINAÇÃO DOS LIPÍDIOS .....	38
4.3.2.5.	DETERMINAÇÃO DO pH .....	38
4.3.2.6.	DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ EM ÁCIDO LÁCTICO .....	39
4.3.2.7.	DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATO .....	39
4.3.2.8.	DETERMINAÇÃO DE ENERGIA .....	39
4.3.2.9.	DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES .....	39
4.3.2.10.	DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS .....	40
4.3.3.	VISCOSIDADE .....	40
4.3.4.	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA .....	40
4.3.4.1.	CONTAGEM TOTAL DE COLIFORMES TOTAIS E TERMO TOLERANTE .....	40
4.3.4.2.	DETECÇÃO DE <i>SALMONELA</i> .....	41
4.3.4.3.	CONTAGEM DE CELULAS VIÁVEIS .....	42
4.3.5.	ANÁLISE SENSORIAL .....	42
4.3.6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	44
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	45
5.1.	APLICAÇÃO DO POLÍMERO IMPRESSO MOLECULAR E DA MATRIZ PURA EM COLUNA DE ADSORÇÃO NO PROCESSO EM BATELADA À TEMPERATURA AMBIENTE .....	46
5.2.	CURVA DE REMOÇÃO DE COLESTEROL NO PROCESSO EM BATELADA A TEMPERATURA AMBIENTE .....	54
5.3.	CURVA DE REMOÇÃO DE COLESTEROL NO PROCESSO DE FLUXO CONTÍNUO COM TEMPERATURA CONTROLADA .....	55
5.4.	CURVA DE REMOÇÃO E DESSORÇÃO DE COLESTEROL NO PROCESSO DE FLUXO CONTÍNUO COM TEMPERATURA CONTROLADA, E COM AMPLIAÇÃO DA ESCALA DA COLUNA DE ADSORÇÃO .....	61
5.5.	CURVA DE REMOÇÃO DA PROTEÍNA DO LEITE EM PROCESSO DE FLUXO CONTÍNUO COM TEMPERATURA CONTROLADA UTILIZANDO ADSORVENTE PIM OU MP .....	63
5.6.	CURVA DE RUPTURA PARA REMOÇÃO DO COLESTEROL DO LEITE EM PROCESSO DE FLUXO CONTÍNUO .....	65
5.7.	CARACTERIZAÇÃO DO LEITE SEM E COM REMOÇÃO PARCIAL DO COLESTEROL .....	67

5.8.	ANÁLISE SENSORIAL DE DIFERENÇA DE PADRÃO, ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA PARA O LEITE SEM E COM REMOÇÃO PARCIAL DE COLESTEROL.....	68
5.9.	CARACTERIZAÇÃO DA BEBIDA LÁCTEA UTILIZANDO LEITE, SEM E COM REMOÇÃO PARCIAL DO COLESTEROL SEM ADIÇÃO DE POLPA DE FRUTA..	70
5.10.	CARACTERIZAÇÃO DA BEBIDA LÁCTEA UTILIZANDO LEITE, SEM E COM REMOÇÃO PARCIAL DO COLESTEROL COM ADIÇÃO DE POLPA DE MANGABA E SIRIGUELA .....	72
5.11.	TEOR DE REMOÇÃO DO COLESTEROL DAS BEBIDAS LÁCTEAS FERMENTADAS POR GRÃOS DE KEFIR.....	76
5.12.	VISCOSIDADE DAS BEBIDAS LÁCTEAS FERMENTADAS POR GRÃOS DE KEFIR.....	78
5.13.	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA .....	79
5.14.	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO UTILIZANDO UM SIMULADOR ESTÔMAGO-DUODENO .....	81
5.15.	ESTUDO DO PROCESSO FERMENTATIVO UTILIZANDO BIORREATOR DE BANCADA.....	83
5.16.	ANÁLISE SENSORIAL DE ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA PARA A BEBIDA LÁCTEA SEM ADIÇÃO DE POLPA DE FRUTA .....	84
5.17.	ANÁLISE SENSORIAL DE ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA PARA A BEBIDA LÁCTEA COM ADIÇÃO DE POLPA DE MANGABA E SIRIGUELA .....	86
5.18.	PROPOSTA DE ADEQUAÇÃO DE LAYOUT DAS INSTALAÇÕES .....	92
6.	CONCLUSÃO FINAL.....	93
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	95
8.	LISTA DE DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS .....	112

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 - Esquema geral do processo de impressão molecular.....	8
Figura 3.2 - Formas das isotermas de adsorção (MCCABE <i>et al.</i> , 2001). .....	14
Figura 3.3 - Aspecto dos grãos de kefir.....	23
Figura 3.4 - Molécula do kefirana (www.kefir.co.kr). .....	25
Figura 3.5 – Aspecto do fruto da mangabeira e do fruto da siriguela. ....	26
Figura 4.1 - Unidade experimental de remoção e dessorção do colesterol no processo em batelada a temperatura ambiente. ....	32
Figura 4.2 - Unidade experimental de remoção e dessorção do colesterol no processo de fluxo contínuo a temperatura controlada. ....	33
Figura 4.3 - Unidade experimental de remoção e dessorção do colesterol no leite com ampliação de escala. ....	34
Figura 4.4 – Unidade experimental do simulador estômago-duodeno (MAINVILLE <i>et al.</i> , 2005 com modificações). ....	36
Figura 4.5 - Ficha de avaliação sensorial pelo método da diferença do padrão. ....	43
Figura 4.6 - Ficha de avaliação sensorial pelo método da aceitação. ....	44
Figura 5.1 - Remoção do colesterol em coluna de adsorção utilizando PIM com granulometria de 60 mesh em diferentes alturas do leito. ....	50
Figura 5.2- Remoção do colesterol em coluna de adsorção utilizando MP com granulometria de 60 mesh em diferentes alturas do leito. ....	51
Figura 5.3 - Dessorção do colesterol em coluna de adsorção utilizando PIM com granulometria de 60 mesh em diferentes alturas do leito. ....	51
Figura 5.4 - Dessorção do colesterol em coluna de adsorção utilizando MP com granulometria de 60 mesh em diferentes alturas do leito. ....	52
Figura 5.5 - Curva de remoção de colesterol do leite no leito de 3 cm de altura utilizando Matriz Pura (MP). ....	54
Figura 5.6 - Curva de remoção de colesterol do leite no leito de 3 cm de altura utilizando Polímero com Impressão Molecular (PIM). ....	55
Figura 5.7 - Curva de remoção de colesterol do leite no leito recheado de adsorvente MP na altura de 1 cm em diferentes vazões. ....	56

Figura 5.8 - Curva de remoção de colesterol do leite no leito recheado de adsorvente MP na altura de 2 cm em diferentes vazões.....	57
Figura 5.9 - Curva de remoção de colesterol do leite no leito recheado de adsorvente MP na altura de 3 cm em diferentes vazões.....	58
Figura 5.10 - Curva de remoção de colesterol do leite no leito recheado de adsorvente PIM na altura de 1 cm em diferentes vazões.....	59
Figura 5.11 - Curva de remoção de colesterol do leite no leito recheado de adsorvente PIM na altura de 2 cm em diferentes vazões.....	59
Figura 5.12 - Curva de remoção de colesterol do leite no leito recheado de adsorvente PIM na altura de 3 cm em diferentes vazões.....	60
Figura 5.13 - Curva de remoção de colesterol do leite no leito com altura de 7,5 cm, utilizando adsorvente PIM ou MP.....	62
Figura 5.14 - Curva de desorção de colesterol no leito com altura de 7,5 cm, utilizando adsorvente PIM ou MP.....	63
Figura 5.15 - Curva de remoção da proteína do leite no leito com 3 cm de altura e vazão de 3 mL/min, utilizando adsorvente PIM ou MP.....	65
Figura 5.16 - Curvas de ruptura para remoção do colesterol do leite em colunas de leito fixo recheados de matriz pura e matriz impressa molecularmente.....	66
Figura 5.17 - Percentual de intenção de compra para o leite padrão integral e os leites com remoção parcial de colesterol. A – eu certamente compraria; B – provavelmente compraria; C – não sei se compraria; D – provavelmente não compraria e E – certamente não compraria. ....	70
Figura 5.18 - Percentual de intenção de compra para as bebidas lácteas integrais e com remoção parcial de colesterol sem adição de polpa. A – eu certamente compraria; B – provavelmente compraria; C – não sei se compraria; D – provavelmente não compraria e E – certamente não compraria. ....	86
Figura 5.19 - Percentual de intenção de compra para a bebida láctea integral e as bebidas lácteas com remoção parcial de colesterol, com 15% de polpa de mangaba. A – eu certamente compraria; B – provavelmente compraria; C – não sei se compraria; D – provavelmente não compraria e E – certamente não compraria. ....	90

Figura 5.20 - Percentual de intenção de compra para a bebida láctea integral e as bebidas lácteas com remoção parcial de colesterol, com 30% de polpa de mangaba. A – eu certamente compraria; B – provavelmente compraria; C – não sei se compraria; D – provavelmente não compraria e E – certamente não compraria. ....	90
Figura 5.21 - Percentual de intenção de compra para a bebida láctea integral e as bebidas lácteas com remoção parcial de colesterol, com 15% de polpa de siriguela. A – eu certamente compraria; B – provavelmente compraria; C – não sei se compraria; D – provavelmente não compraria e E – certamente não compraria. ....	91
Figura 5.22 - Percentual de intenção de compra para a bebida láctea integral e as bebidas lácteas com remoção parcial de colesterol, com 30% de polpa de siriguela. A – eu certamente compraria; B – provavelmente compraria; C – não sei se compraria; D – provavelmente não compraria e E – certamente não compraria. ....	91
Figura 5.23 - Fluxograma de adequação de Layout das instalações de um laticínio. ....	92

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 - Tipos de monômeros funcionais utilizados para preparação das matrizes para impressão molecular da molécula alvo. ....	9
Tabela 3.2 - Exemplos de molécula alvo impressas. ....	11
Tabela 5.1 – Disposição geral dos ensaios realizados. ....	45
Tabela 5.2 - Dados das colunas de adsorção utilizando PIM na granulometria de 60 mesh, utilizando solução sintética de colesterol. ....	46
Tabela 5.3 - Dados das colunas de adsorção utilizando PIM na granulometria de 60 mesh, utilizando leite. ....	47
Tabela 5.4 - Dados das colunas de adsorção utilizando MP na granulometria de 60 mesh, utilizando solução sintética de colesterol. ....	47
Tabela 5.5 - Dados das colunas de adsorção utilizando MP na granulometria de 60 mesh, utilizando leite. ....	47
Tabela 5.6 - Dados das colunas de dessorção utilizando PIM na granulometria de 60 mesh, utilizando solução sintética de colesterol. ....	48
Tabela 5.7 - Dados das colunas de dessorção utilizando PIM na granulometria de 60 mesh, utilizando leite. ....	48
Tabela 5.8 - Dados das colunas de dessorção utilizando MP na granulometria de 60 mesh, utilizando solução sintética de colesterol. ....	49
Tabela 5.9 - Dados das colunas de dessorção utilizando MP na granulometria de 60 mesh, utilizando leite. ....	49
Tabela 5.10 - Comparação da eficiência de remoção de colesterol utilizando diferentes adsorventes. ....	53
Tabela 5.11 - Composição físico-química do leite sem e com remoção parcial de colesterol. ....	68
Tabela 5.12 - Dados sensoriais da diferença do padrão para o leite integral e com remoção parcial de colesterol. ....	69
Tabela 5.13 - Notas sensoriais de aceitação para os leites padrão integral e com remoção parcial de colesterol. ....	69
Tabela 5.14 - Composição físico-química das bebidas lácteas sem e com remoção parcial de colesterol. ....	72

Tabela 5.15 - Composição físico-química das bebidas lácteas sem e com remoção parcial de colesterol com polpa de mangaba. ....	74
Tabela 5.16 - Composição físico-química das bebidas lácteas sem e com remoção parcial de colesterol com polpa de siriguela. ....	75
Tabela 5.17 - Teor de remoção do colesterol das bebidas lácteas fermentadas por grãos de kefir.	77
Tabela 5.18 - Avaliação da viscosidade das bebidas lácteas fermentadas por grãos de kefir. ....	79
Tabela 5.19 - Resultados microbiológicos das bebidas lácteas. ....	80
Tabela 5.20 – Número de células viáveis em simulador estômago-duodeno. ....	82
Tabela 5.21 – Avaliação da viscosidade, do tempo para o pH ficar constante e nº de células viáveis durante a otimização do processo fermentativo. ....	84
Tabela 5.22 - Notas sensoriais de aceitação para as bebidas lácteas integrais e com remoção parcial de colesterol. ....	85
Tabela 5.23 - Notas sensoriais de aceitação para as bebidas lácteas integrais e com remoção parcial de colesterol, com 15% de polpa de mangaba. ....	87
Tabela 5.24 - Notas sensoriais de aceitação para as bebidas lácteas integrais e com remoção parcial de colesterol, com 30% de polpa de mangaba. ....	87
Tabela 5.25 - Notas sensoriais de aceitação para as bebidas lácteas integral e com remoção parcial de colesterol, com 15% de polpa de siriguela. ....	88
Tabela 5.26 - Notas sensoriais de aceitação para as bebidas lácteas integral e com remoção parcial de colesterol, com 30% de polpa de siriguela. ....	89

# 1. INTRODUÇÃO

A pecuária leiteira do Estado de Sergipe tem crescido significativamente nos últimos anos, entretanto concentra-se sua produção em leites UHT e pasteurizados, bem como em queijos e iogurte. Portanto, o surgimento de novas tecnologias industriais para a obtenção de novos produtos com alto valor agregado torna-se necessário para o pleno desenvolvimento da bacia leiteira. O incentivo a produção de leite e pesquisas para o desenvolvimento de seus derivados, para ampliação do setor, é papel fundamental do Arranjo Produtivo Local (APL) do leite, que em suas diretrizes, norteia o desenvolvimento de novos produtos que atendam as mudanças dos hábitos alimentares, como por exemplo, a produção de derivados do leite com características probióticas e funcionais, utilizando produtos regionais.

A partir deste nicho de mercado as indústrias de laticínios estão investindo em novas estratégias para aumentar a competitividade no segmento de produtos funcionais e probióticos a fim de se adaptar às tendências de mudanças do mercado consumidor mundial exigente, o qual atualmente possui interesse no consumo de alimentos saudáveis em busca da qualidade de vida (THAMER e PENNA, 2006).

Com base nesta perspectiva de mercado, a literatura relata a associação da biotecnologia e da nanotecnologia para a obtenção de alimentos funcionais ou nutracêuticos. O processo em escala nanométrica utilizado em alguns estudos como por exemplo o uso da “impressão molecular”, pode ser facilmente utilizado pois se trata de uma rota simples de síntese de materiais, no qual em um determinado momento ocorre a impressão do molde da molécula alvo, e subsequentemente a remoção do molde a partir da técnica sol-gel, obtendo assim um material robusto com “sítios memoriais”. Essa técnica apresenta boa homogeneidade, fácil controle de espessura, e custo relativamente baixo comparado a outros métodos. Sol-gel é um processo químico utilizado para a síntese de uma suspensão coloidal de partículas sólidas em um líquido. Os polímeros impressos molecularmente - PIMs possuem a habilidade seletiva de ligar-se à molécula alvo numa mistura, como por exemplo, a molécula do colesterol. A característica seletiva dos “PIMs” obtidos por “impressão molecular” apresenta função importante em biotecnologia, principalmente na remoção de moléculas de colesterol no leite.

Com o grande interesse do consumidor por esse tipo de alimento saudável e pela busca da qualidade de vida, são realizados estudos para o desenvolvimento de diversos tipos de leite fermentados e iogurte. Dentre as culturas iniciadoras utilizadas para a produção de leite fermentado, os grãos de kefir, ainda não são industrializados no Brasil. Enquanto que, no mercado internacional (Rússia, Hungria, Polônia, Suécia, Noruega, Finlândia e Alemanha, Grécia, Áustria e Israel) o leite fermentado do tipo kefir é disponível com diferentes nomes: Actívia Kefir e Kefir Liberte (SANTOS e FERREIRA, 2008). Além de leites fermentados também denominados kefir, a DMJ Biotech Corp. possui uma gama de produtos utilizando grãos de kefir, como por exemplo: requeijão cremoso, kefir de diversos sabores, leite de kefir, fermento kefir queijo etc. A definição do leite fermentado chamado kefir, é um produto resultante da fermentação do leite pelos grãos de kefir (GLIBOWSKI e KOWALSKA, 2012). O kefir é uma bebida secular originária das montanhas do Cáucaso, cujos grãos de kefir são constituídos por: uma bio-matriz que comporta uma série de diferentes micro-organismos (dezenas de espécies de lactobacilos e leveduras associadas simbioticamente) (BENSMIRA e JIANG, 2012). O kefir é pouco difundido comercialmente no Brasil, entretanto várias pessoas cultivam em casa, e por isso pode ser um apelo de mercado.

Com base nos benefícios à saúde, no potencial de mercado de produtos obtidos utilizando grãos de kefir e associado à produção anual de aproximadamente de 260 milhões de litros de leite no Estado de Sergipe em 2008 (IBGE, 2010), propõe-se neste trabalho o desenvolvimento de produtos lácteos fermentados por grãos de kefir com teor de colesterol reduzido.

A adição de frutas regionais do Brasil na fabricação de iogurtes é uma fatia do mercado significativa para o comércio interno e externo. Afinal a comercialização dessas frutas, anteriormente restrita a áreas locais, tem se expandido para centros metropolitanos, isto devido ao sabor exótico apresentados por estes frutos tropicais, o que contribui para o aumento de seu consumo. Dentre as diversas frutas produzidas no Brasil, especial atenção é dada às encontradas na região nordeste devido às suas características exóticas. Pode-se citar mais especificamente no estado de Sergipe a mangaba (cuja árvore é o símbolo do estado), siriguela, cajá, jenipapo, jamelão ou jambolão, dentre outras. A mangaba, apesar de apresentar potencial industrial para a produção de sucos, sorvetes e doces, tem sido muito pouco explorada, embora seus produtos elaborados artesanalmente tenham grande aceitação do consumidor na Região

Nordeste do Brasil. O fruto é extremamente perecível e, portanto, suscetível a danos mecânicos durante a colheita, transporte e manuseio, o que representa um sério obstáculo para a comercialização. Outra fruta bastante apreciada no Nordeste brasileiro é a siriguela, devido sua excelente qualidade sensorial. A siriguela é uma fruta rica em fibras, carboidratos, cálcio, fósforo, ferro e vitaminas A, B, C. Possui caroço do tamanho de uma azeitona grande, polpa muito doce e suculenta, e casca bastante fina, seu consumo é feito por diversas formas, desde *in natura* até na confecção de sucos. Também é usada no preparo de bebidas fermentadas e bebidas geladas, além de geleias e sorvetes. A comercialização destas frutas está concentrada nas feiras livres por bairros e cidades. Além disso, a comercialização dos frutos está restrita a sua época de safra e apresenta alta perecibilidade. Uma saída para se resolver esse tipo de problema é desenvolver métodos para utilização dessas frutas como, por exemplo, iogurtes e bebidas lácteas, agregando assim valores a estas frutas regionais. Com base na alimentação equilibrada para a manutenção da saúde, a comunidade científica tem produzido inúmeros estudos com o intuito de comprovar a atuação de certos alimentos na prevenção de doenças aliando este potencial de mercado (médias, pequenas e microempresas locais).

Neste enfoque se consubstancia a proposta deste trabalho que tem como objetivo avaliar o processo de desenvolvimento de produtos lácteos fermentados por grãos de kefir com teor de colesterol reduzido, adicionando aromas e sabores de frutas regionais e assim agregando valor ao produto final.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o processo de desenvolvimento de produtos lácteos fermentados por grãos de kefir com teor de colesterol reduzido e saborizados com frutas tropicais.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Neste trabalho os objetivos específicos são:

1. Obter o leite com remoção parcial de colesterol obtido pela técnica de impressão molecular;
2. Determinar a composição físico-química dos leites produzidos;
3. Obter a bebida láctea a partir da fermentação utilizando grãos de kefir com os leites produzidos;
4. Saborizar a bebida láctea produzida por adição de mangaba ou siriguela;
5. Realizar a análise sensorial e microbiológica dos leites produzidos e das bebidas lácteas;
6. Determinar a composição físico-química das bebidas lácteas;
7. Avaliar o potencial probiótico utilizando um simulador estômago-duodeno;
8. Avaliar o arranjo físico do processo: proposta de adequação de layout nas instalações.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

Nesta etapa do trabalho serão abordados os seguintes tópicos: o uso da nanotecnologia e da biotecnologia, a impressão molecular, adsorção, colesterol, leite e produto lácteo, patente, grãos de kefir e frutas regionais.

#### **3.1. NANOTECNOLOGIA**

A nanotecnologia é um conjunto de técnicas usadas para manipular qualquer tipo de matéria, viva ou não viva, no nível de átomos e moléculas. Um dos pontos para se entender o potencial da nanotecnologia é que, em nanoescala (abaixo de 100 nanômetros), as propriedades dos materiais podem mudar drasticamente com a redução do tamanho, entretanto sem mudar a substância, além do nanomaterial poder exibir propriedades novas e completamente diferentes das anteriormente conhecidas (DUDO *et al.*, 2011). Segundo GUTIERREZ *et al.* (2006) a nanotecnologia não é uma técnica específica e sim um conjunto de técnicas, como por exemplo a técnica denominada impressão molecular.

GHAZINOORY *et al.* (2009) relataram que o desenvolvimento acelerado de tecnologias emergentes nas últimas décadas é a função essencial que estas técnicas poderiam disseminar no crescimento econômico e no desenvolvimento industrial. Esse incremento das estratégias para o progresso tecnológico no nível nacional inclui uma escala extensiva das diferentes técnicas e dos mecanismos que são definidos geralmente sob a política nacional para a Ciência e Tecnologia. Essas políticas nacionais permitem o planejamento de alguns processos preliminares tais como: a nanotecnologia, a biotecnologia, e a tecnologia da informação, entre outras. A grande atração proposta pela nanoescala é o mistério daquilo que não é visível e nem palpável, bem como as inúmeras implicações e aplicações da tecnologia envolvida. A nanotecnologia pode possuir diferentes aplicações nas mais diversas áreas como, por exemplo, eletrônica, medicina, aeronáutica, cosméticos, meio ambiente, biotecnologia, agricultura e segurança nacional (DURÁN *et al.*, 2006).

Segundo a proposta de Feynman, a nanotecnologia tem o objetivo de criar novos materiais e desenvolver novos produtos e processos, baseados na crescente capacidade da tecnologia moderna de ver e manipular átomos e moléculas. Segundo a literatura os países desenvolvidos investem mais de dois bilhões de dólares por ano, se somados os investimentos dos Estados Unidos, Japão e União Europeia. Outros países como Coréia do Sul e Taiwan são bem sucedidos quando comparados ao Brasil na utilização da nanotecnologia com objetivo de gerar bons empregos e riquezas para seus cidadãos. Portanto, os centros de pesquisas e indústrias destes países têm investido centenas de milhões de dólares nessa área (GUTIERREZ *et al.*, 2006).

A Nanociência e a Nanotecnologia são tecnologias emergentes, multidisciplinares, que se baseiam fortemente nos conhecimentos e técnicas da Física, da Química, da Biologia e da Informática, bem como dos diferentes ramos da Engenharia. No entanto, pode-se dizer que os químicos têm um papel fundamental para o desenvolvimento da nanotecnologia. A importância da similaridade da ligação entre a química, a nanociência e a nanotecnologia, é verificada ao comparar suas definições. A química é a ciência que trata da composição, estrutura e propriedades da matéria, em nível atômico e molecular, bem como das reações que se produzem entre os elementos ou moléculas. Já a nanociência e a nanotecnologia (N&N) englobam projeto, manipulação, produção e montagem em nível atômico e molecular. Sabe-se que um nanômetro é a bilionésima parte do metro. A nanoescala vai de 100 nanômetros até aproximadamente 0,2 nanômetros. Entretanto convém esclarecer que nem tudo que é nanométrico é nanotecnológico (FERNANDES e FILGUEIRAS, 2008).

O Instituto Fraunhofer de Engenharia Interfacial e Biotecnologia, sediado em Stuttgart, apresentou absorvedores de alta especificidade nanoestruturados conhecidos como nanopartículas com impressão molecular, para a separação de aminoácidos, peptídeos e proteínas nas indústrias farmacêuticas e de biotecnologia. A criação de impressões moleculares em si é antiga, mas fornecia produtos cujo tamanho de partícula precisava ser ajustado por operações posteriores de moagem. Porém, o Instituto desenvolveu uma minipolimerização em emulsão que fornece o material diretamente em nanoescala, sem necessidade de processamento posterior, com maior definição das dimensões. O funcionamento dos absorvedores se baseia no princípio chave-fechadura, e com base na molécula que se deseja absorver, são escolhidos os

monômetros adequados para o reconhecimento das biomoléculas em questão. A separação com esse tipo de nanopartícula pode ser até duas vezes mais eficiente que sistemas concorrentes. Além disso, estão disponíveis em condições que nenhuma biomolécula suportaria tais como: presença de ácidos, bases, íons metálicos, solventes orgânicos e altas temperatura e pressão (<http://www.quimica.com.br>).

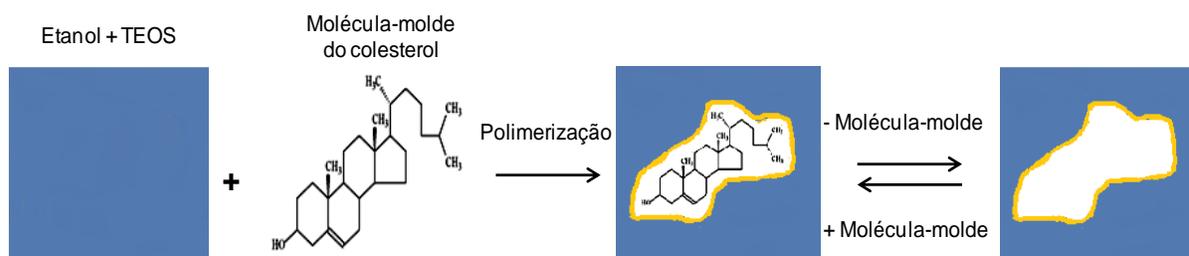
### **3.2. IMPRESSÃO MOLECULAR**

A técnica de impressão molecular é uma aproximação sintética atrativa para simular o reconhecimento molecular natural, que exhibe afinidade e seletividade elevadas para um composto particular do alvo nomeado molde. Esta técnica utiliza moléculas do molde para montar seus próprios locais de reconhecimento interagindo com os grupos funcionais complementares de monômeros apropriados. Neste processo, as moléculas selecionadas dos moldes permitem estabelecer interações obrigatórias com monômeros funcionais em um solvente. O polímero impresso molecularmente (PIM) pode ser usado como adsorvente com seletividade pré-determinada para uma dada substância, ou grupo de análogos estruturais, utilizados em extração de fase sólida para a separação ou limpeza do composto alvo em baixas concentrações ou em matrizes complexas (PUOCI *et al.*, 2009; CIRILLO *et al.*, 2011; GUPTA e KUMAR, 2011).

A obtenção dos PIMs ou polímeros impresso molecularmente ocorre por meio da polimerização de uma molécula molde a ser impressa (o analíto de interesse). Na impressão molecular não-covalente, o molde interage com um monômero funcional por meio de ligações de hidrogênio, eletrostáticas ou interações hidrofóbicas. O processo de polimerização é baseado na aproximação do radical livre. O resultado final é a produção de monólitos poliméricos orgânicos rígidos. Após o processo ser finalizado, os monólitos são esmagados e moídos até atingirem uma granulometria adequada. O molde da molécula alvo pode então ser removido por um mecanismo de lavagem envolvendo um solvente (geralmente metanol) e um ácido ou base. Após a remoção do molde, o polímero impresso resultante possui a capacidade de reconhecer o molde com alta seletividade e especificidade. A principal vantagem que os PIMs possuem sobre materiais convencionais em extração em fase sólida é a sua especificidade em nível molecular. Os mecanismos de retenção de muitos dos materiais comumente

empregados na extração da fase sólida são baseados em interações hidrofóbicas e o principal inconveniente nesse tipo de extração é a co-eluição de espécies interferentes (FARRINGTON *et al.*, 2006; VERHEYEN *et al.*, 2011).

A maioria dos PIMs apresentados na literatura são polímeros altamente reticulados, consistindo numa estrutura matricial, com locais de ligação formados por uma molécula molde, a qual está presente no meio durante o processo de obtenção do polímero (SOUSA e BARBOSA, 2009). A Figura 3.1 representa o processo de obtenção de um polímero impresso molecularmente descrito por SOARES *et al.* (2007) para retenção da molécula molde colesterol e a remoção desta para a produção do molde e subsequente utilização em regime em batelada com solução sintética de colesterol.

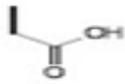
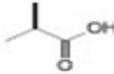
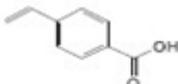
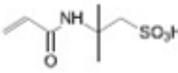
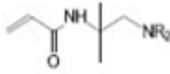
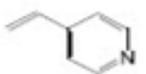
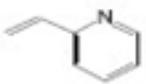
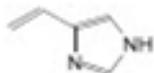
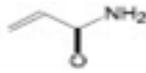


**Figura 3.1** - Esquema geral do processo de impressão molecular.

Em todas as metodologias de impressão molecular a molécula molde assume uma importância fundamental, já que é responsável pela definição da organização espacial dos grupos funcionais dos monômeros. Por vários motivos, nem todas as moléculas molde se apresentam adequadas para utilização direta na preparação de polímeros. As moléculas moldes ideais devem ser quimicamente inertes para serem compatíveis com processos de polimerização por radicais livres. Nos casos em que a molécula molde for instável nas condições de polimerização deve-se procurar uma estratégia alternativa para a realização da impressão molecular. Por outro lado, os monômeros funcionais são responsáveis pelas interações que se estabelecem nos locais de reconhecimento. Nos protocolos de impressão molecular não-covalente, normalmente é usado um excesso de monômeros funcionais em relação ao número de moles de molécula molde, de modo a favorecer a agregação entre a molécula e o monômero funcional (SOUSA e BARBOSA, 2009).

Inúmeros estudos já foram realizados com uma grande variedade de materiais naturais, sintéticos, orgânicos ou inorgânicos, com diferentes características de tamanho, forma e densidade, para serem aplicados na técnica de impressão molecular. A Tabela 3.1 apresenta os monômeros funcionais mais adequados para a preparação dos moldes das moléculas alvos.

**Tabela 3.1** - Tipos de monômeros funcionais utilizados para preparação das matrizes para impressão molecular da molécula alvo.

Monômero funcional	Estrutura química	Tipo de ligação como analito
Ácido acrílico		Iônica, ligação de hidrogênio
Ácido metacrílico		Iônica, ligação de hidrogênio
Ácido p-vinilbenzóico		Iônica, ligação de hidrogênio
Ácido acrilamidossulfônico		Iônica
Amino metacrilamida		Iônica
4-vinilpiridina		Iônica, ligação de hidrogênio e transferência de cargas
2-vinilpiridina		Iônica, ligação de hidrogênio e transferência de cargas
4-vinilimidazol		Iônica, ligação de hidrogênio e coordenação de metais
1-vinilimidazol		Iônica, ligação de hidrogênio e coordenação de metais
Acrilamida		Ligação de hidrogênio

Fonte: SOUSA e BARBOSA, 2009.

Entretanto, existem outras vantagens dos materiais impressos molecularmente em relação aos receptores biológicos, como o fácil preparo, o baixo custo, a estabilidade mecânica e a química, e ampla faixa das condições de operação, possibilidade de síntese em situação onde nenhuma molécula (receptor ou enzima) se encontra disponível ou quando elas possuem um alto preço, e resistência a ambientes adversos (presença de ácidos, bases, íons metálicos, solventes orgânicos, altas temperaturas e alta pressão), nos quais biomoléculas naturais não resistiriam. Ainda os “PIMs” podem ser armazenados a seco em temperatura ambiente por longos períodos de tempo, sem perda do desempenho inicial. Os PIMs são uma categoria que apresentam inúmeras vantagens em processos de remoção de moléculas alvo, em função de sua grande afinidade tanto de substâncias hidrofílicas (afinidade à água) quanto lipofílicas (afinidade a solventes não aquosos) (ALVAREZ-LORENZO e CONCHEIRO, 2004; CHEN *et al.*, 2011).

Apesar destes métodos possuírem diferentes mecanismos, geralmente uma combinação de diversas técnicas é empregada para a obtenção da impressão molecular. Uma das combinações é a técnica de impressão molecular com a de ligação covalente, envolvendo o monômero funcional, a molécula alvo e o agente bifuncional. A primeira etapa da síntese consiste em misturar o monômero contendo grupos funcionais complementares aqueles da molécula molde, o que permite formar em solução o complexo “monômero-molécula molde”, por meio de interações (covalentes ou não covalentes) entre os respectivos grupos funcionais complementares. Posteriormente, são adicionados ao meio reacional o reagente de ligação cruzada e o iniciador radical de polimerização.

A Tabela 3.2 apresenta alguns exemplos de moléculas impressas a partir de protocolos de impressão molecular.

Dentre os estudos apresentados na Tabela 3.2, WYBRÁŃSKA *et al.* (2008) obtiveram polímeros impresso molecularmente utilizando a técnica de impressão molecular baseada em uma aproximação fotoquímica, utilizando um derivado funcional com  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) substituído por cloreto de cinamoilo (CC), usando como agente de reticulação hexametileno diisocianato (HMDI) ou tolueno diisocianato (TDI). Os autores relataram que a aplicação do hexametileno diisocianato (HMDI) apresentou maior capacidade de adsorção do colesterol da solução sintética de 0,029 mmol/L por g de PIM quando comparada com tolueno diisocianato

(TDI) que foi de 0,015 mmol/L. Possivelmente pelo fato do HMDI apresentar o tamanho dos poros maiores na matriz obtida, facilitando a adsorção da molécula do colesterol da solução sintética.

PUOCI *et al.*, (2009) empregaram a técnica de impressão molecular no reconhecimento de uma droga anti-inflamatória (p-acetalminofenol), os PIMs foram preparados pela polimerização da precipitação utilizando o p-acetalminofenol como molde. Quando esses PIMs foram sintetizados em meio orgânico (Acetonitrila) apresentaram uma adsorção variando entre 42,6 a 48,8%. No entanto, quando foram preparados na presença de água as matrizes apresentaram uma maior adsorção variando entre 88,4 a 92,3%. Provavelmente, isso ocorre pela abertura do anel epóxido permitindo a formação de uma camada hidrofílica em torno do polímero aumentando a seletividade e o reconhecimento da molécula.

**Tabela 3.2** - Exemplos de molécula alvo impressas.

<b>Classe dos compostos</b>	<b>Exemplo</b>	<b>Referência</b>
<b>Drogas</b>	Triazolam	JIN <i>et al.</i> , (2011)
	p-acetalminofenol	PUOCI <i>et al.</i> , (2009)
	Naltrexone	ROSTAMIZADEH <i>et al.</i> , (2012)
<b>Metal</b>	Al <sup>3+</sup>	AN <i>et al.</i> , (2012)
<b>Proteína</b>	Lisozima	HE <i>et al.</i> , (2010)
<b>Hormônios</b>	Testosterona	GAVRILOVIC <i>et al.</i> , (2011)
	Epitestosterona	
<b>Esteroides</b>	Colesterol	SOARES <i>et al.</i> , (2007)
	Colesterol	WYBRAŃSKA <i>et al.</i> , (2008)
<b>Amidas</b>	Sulfonamidas	LEE <i>et al.</i> , 2010
<b>Pesticidas</b>	Acefato	WEI <i>et al.</i> , (2011)

A metodologia da polimerização da precipitação também foi usada por ROSTAMIZADEH *et al.*, (2012) na preparação dos polímeros impresso molecularmente utilizando o ácido acrílico (AA) e o ácido metacrílico (MAA) como monômeros na inclusão da molécula de naltrexone. Eles relataram que o PIM-AA e PIM-MAA apresentaram uma elevada

capacidade de adsorção e seletividade do naltrexone com cerca de 75 e 34 mg/g de PIM respectivamente. A impressão molecular também foi empregada por HE *et al.* (2010) os quais usaram lisozima como uma proteína modelo e demonstraram com sucesso uma estratégia nova para produzir nanopartículas com impressão de proteína na superfície, através da copolimerização de monômeros funcionais na superfície do vinil de silicone dispersados em meios aquosos e diluídos na presença da proteína do molde. O sistema para impressão molecular foi constituído com altas concentrações de lisozima diluídas nos monômeros e após a polimerização foi gerado sobre as partículas da sustentação a impressão molecular. As partículas impressas mostraram cinéticas rápidas de adsorção e uma seletividade significativa para a proteína da impressão, as matrizes apresentaram uma adsorção de 11,2 µg/g.

Na literatura foram descritos alguns estudos sobre a síntese de polímeros impressos molecularmente (PIMs) utilizando a técnica sol-gel. HOSSAIN *et al.* (2003) utilizaram a técnica para a impressão molecular de peptídeos no suporte hidrofóbico. LEE *et al.* (2010), sintetizaram polímeros impressos molecularmente (PIMs) utilizando o tetraetilortossilicato (TEOS) empregando o processo sol-gel, com a finalidade de reconhecer sulfonamidas em amostras de carnes, esses polímeros com impressão molecular proporcionaram uma adsorção de 2,13 µmol/g, os quais possuem uma seletividade aproximadamente sete vezes maior quando comparado com os polímeros sem impressão molecular. A técnica sol-gel também foi descrita por JIN *et al.* (2011) os quais utilizaram essa metodologia para a inclusão do molde de uma matriz contendo triazolam ou halcion. Os PIMs apresentaram uma capacidade de adsorção do triazolam de 130 µg/g de sílica.

Estudos realizados por nosso grupo (SOARES *et al.*, 2007), abriram novas perspectivas para a técnica de impressão molecular para remoção de colesterol. Neste estudo avaliou-se a aplicação da técnica de impressão molecular para a remoção de colesterol em produtos lácteos em regime de batelada. A técnica “Impressão molecular” foi dividida em duas etapas, a primeira avaliou-se diferentes métodos de inclusão de colesterol em β-CD (co-precipitação, amassamento e mistura física). Os resultados indicaram que o melhor método de inclusão foi a co-precipitação. Na segunda etapa foi referente ao uso do precursor TEOS (tetraetilortossilicato) para preparo do PIM e sua utilização em reatores em batelada em diferentes razões molares e temperaturas. A obtenção do molde da molécula alvo (colesterol)

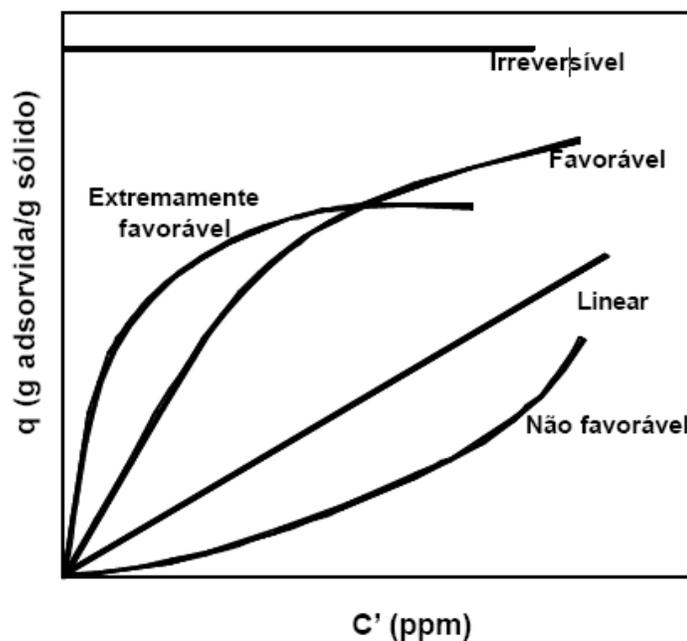
foi realizada utilizando a técnica sol-gel a partir do precursor TEOS na presença de PIM/ $\beta$ -CD: colesterol e  $\beta$ -ciclodextrina ou somente a partícula de sílica (MP). A máxima capacidade de adsorção do colesterol em regime em batelada neste trabalho foi de 251 mg/g de matriz pura e 76,5 mg/g de PIM/ $\beta$ -CD:colesterol. Neste estudo, foi identificado o potencial de aplicação da matriz pura (MP), contudo não foram realizados estudos utilizando a impressão molecular sem a presença de  $\beta$ -CD e em outros regimes, como por exemplo, o processo de adsorção de colesterol em colunas de leito fixo.

Alem dos estudos de adsorção de colesterol utilizando polímeros impressos molecularmente na literatura sugere-se o uso dessas partículas como recheio em coluna de adsorção a fim de promover o contato entre as fases envolvidas no processo (fase fluida gasosa e/ou líquida com a fase estacionária/partículas ou entre diferentes fases fluidas) (VALENTE, 2000). O leito fixo ocorre quando um fluido passa através de um leito de partículas finas, em baixas velocidades, apenas percolando por meio dos espaços vazios existentes entre as partículas estacionárias. As colunas de recheio são muito usadas para provocar o contato íntimo entre dois fluidos imiscíveis ou parcialmente miscíveis (MCCABE *et al.*, 2001).

### 3.3. ADSORÇÃO

Nas colunas de leito fixo, uma das técnicas utilizada para remoção de uma biomolécula é a adsorção. Segundo BARROS (2003) a adsorção é um processo físico-químico no qual certos componentes de uma fase fluida (gás ou líquido) são transferidos (adsorvidos) para a superfície de um sólido adsorvente para completar a separação, o constituinte adsorvido deve ser removido do sólido pelo processo de dessorção. O conceito de adsorvente aplica-se usualmente a um sólido que mantém o soluto na sua superfície pela ação de forças físicas. A substância que é adsorvida, num processo de adsorção, é denominada adsorvato.

As isotermas de adsorção mostram a relação de equilíbrio entre a concentração na fase fluida e a concentração nas partículas em uma determinada temperatura. Algumas formas mais comuns de isotermas estão apresentadas na Figura 3.2, na qual a concentração de equilíbrio em solução ( $C_0$  ou  $C'$ ) é dada em mg/L e a quantidade de material removido ( $q$  ou  $W$ ) é apresentada em mg/g (MCCABE *et al.*, 2001).



**Figura 3.2** - Formas das isothermas de adsorção (MCCABE *et al.*, 2001).

As isothermas de adsorção de forma côncava indicam comportamento não favorável à remoção do composto estudado. Isothermas deste tipo são raras, mas seu estudo torna-se importante na compreensão dos processos de dessorção. A isoterma linear passa pela origem e a quantidade adsorvida é proporcional à concentração do fluido. Isothermas convexas são favoráveis, pois grandes quantidades adsorvidas podem ser obtidas com baixas concentrações de soluto. Quando estas são muito favoráveis, mesmo para concentrações na fase fluida muito diluída, apresentam-se como uma função constante e são consideradas irreversíveis. Apesar da grande seletividade para o composto de interesse, as isothermas deste tipo mostram que a regeneração do adsorvente é bastante difícil (MCCABE *et al.*, 2001).

Uma boa determinação dos dados de equilíbrio é de fundamental importância, pois as mesmas são utilizadas na modelagem dos processos de adsorção, no dimensionamento do projeto de equipamento industrial e/ou na determinação das condições de operação de uma planta.

No processo de adsorção em coluna de leito fixo, o adsorvato a ser tratado passa através de um leito empacotado a uma vazão constante. Parâmetros como a velocidade de escoamento do líquido pela coluna, zona de transferência de massa, capacidade de adsorção e o tempo de

residência são avaliados, a fim de se determinar as melhores condições operacionais de modo a garantir a máxima eficiência do processo de separação (TREYBAL, 1980; GEANKOPLIS, 1998). Um dos elementos mais importantes associados ao projeto de uma coluna de adsorção de leito fixo é pré-determinar quando esta coluna alcançará o ponto de saturação para um dado conjunto de concentrações da solução (CARPINÉ, 2011).

A natureza do processo de adsorção é transiente e uma zona de transferência de massa começa a ser formada, a partir do instante em que a alimentação é estabelecida e toma forma definitiva a partir do instante em que o adsorvente da entrada do leito alcança o equilíbrio com o fluido que está sendo alimentado. As concentrações na fase fluida e na fase sólida variam de acordo com o tempo e com a posição no leito (GEANKOPLIS, 1998).

Inicialmente o fenômeno de transferência de massa ocorre predominante na entrada do leito, onde o fluido entra em contato com o adsorvente. Se inicialmente o sólido não contém o adsorvato, a concentração do adsorvato na fase fluida decresce exponencialmente com a distância, até chegar a praticamente zero antes de alcançar o final do leito. Depois de poucos minutos, o sólido próximo à entrada da coluna se encontra saturado, e a maior parte da transferência de massa ocorre no interior do leito. A região com maior gradiente de concentração é chamada de região de transferência de massa (TREYBAL, 1980; MCCABE *et al.*, 2001).

Alguns estudos relatam o uso de polímeros impressos molecularmente como leito fixo. LIU *et al.* (2012) empregaram o método da polimerização da precipitação da destilação no preparado do polímero impresso molecularmente tendo como molécula molde a uridina, com isto investigaram o comportamento e o equilíbrio cinético da adsorção para o uridina. AN *et al.* (2012) utilizaram a técnica de impressão de superfície contendo  $Al^{3+}$  como molécula molde. Observaram que os polímeros possuíam uma elevada afinidade e seletividade, os quais foram utilizados para remover as impurezas da terra rara.

De acordo com TOMINAGA *et al.* (2012), a técnica de impressão molecular foi também utilizada para a adsorção seletiva de compostos gasosos. E neste estudo foram analisadas o efeito molecular da impressão molecular para piridina gasosa usando uma molécula molde e o ácido metacrílico (MAA) com monômero funcional.

### 3.4. COLESTEROL

Atualmente, o mundo enfrenta novos e intensos desafios na área da saúde e, entre eles, destaca-se o aumento da expectativa de vida. Esse processo propicia maior exposição de pessoas a uma série de fatores de risco, o que pode desencadear a elevação da incidência de doenças cardiovasculares. Os fatores de risco para essa doença podem ter origem genética e/ou podem, também, sofrer influências ambientais. Com relação às influências ambientais, podem-se destacar certos hábitos que definem o estilo de vida como o tabagismo, o uso de drogas, além do uso de álcool e dos hábitos alimentares. A dieta habitual rica em alimentos com alto teor de colesterol é apontada como elemento fundamental para o aparecimento de doenças cardiovasculares. Sabe-se que uma alimentação que apresenta conteúdos elevados de colesterol e gordura saturada pode ser considerada aterogênica em potencial (ABREU *et al.*, 2010).

Outro fator de risco é a obesidade, essa apresenta como um dos maiores problemas de Saúde Pública do mundo, com dimensões sociais e psicológicas expressivas, que vem atingindo indivíduos cada vez mais jovens e diferentes grupos socioeconômicos. Apresenta-se como um dos determinantes mais importantes das diversas doenças crônicas não transmissíveis que participam de forma significativa, das taxas de mortalidade em diversos países, inclusive nos países em desenvolvimento. Portanto, o colesterol em excesso não é inimigo apenas do coração, mas também de diferentes ações inflamatórias (COSTA *et al.*, 2011).

O colesterol é uma substância lipídica que pode ser encontrada tanto na carne de animais, como de seus derivados (colesterol exógeno), e também é sintetizado no organismo pelo fígado (colesterol endógeno). Normalmente o colesterol é necessário em muitas funções corporais complexas, incluindo a síntese do estrogênio, androgênio e progesterona, que são hormônios responsáveis pelas características sexuais secundárias, masculinas e femininas; e com frequência, argumenta-se que o excesso de colesterol causa uma deposição de material lipídico, que acaba produzindo calcificações e alterações fibróticas, de forma que as paredes arteriais ficam mais estreitas, rígidas e duras, tornando mais difícil o fluxo sanguíneo, podendo levar o indivíduo a um ataque cardíaco ou infarto do miocárdio. O excesso de colesterol no sangue aumenta o risco do indivíduo desenvolver doenças do coração. O aumento do colesterol, na

maioria das vezes é causado pelo aumento da ingestão de alimentos ricos em gordura saturada ou colesterol (LENHINGER *et al.*, 1995).

Portanto torna-se necessário e interessante para saúde humana a ingestão de alimentos, como por exemplo, os produtos lácteos com baixo teor de colesterol. Com o aumento da procura por esses produtos, diversas indústrias de laticínios vêm adotando processos que utilizam membranas para remoção parcial de colesterol do leite (Tetra Pak ®). Nestes processos o controle de micro-organismos é essencial, afinal uma população microbiana apresenta grande potencial de crescimento sob as condições industriais nos laticínios. Portanto é importante o método mais eficiente de assepsia para este ambiente em particular. No caso de monitoramento, os microbiologistas utilizam os testes rotineiros para verificar a presença ou ausência da bactéria *Escherichia coli* (PELCZAR *et al.*, 1996). As substâncias químicas utilizadas para matar ou inibir o crescimento de micro-organismos são denominados agentes antimicrobianos. Há centenas de diferentes produtos químicos disponíveis para o controle do crescimento microbiano em diferentes sistemas industriais, nos quais certos compostos químicos antimicrobianos matam os micro-organismos enquanto outros inibem o crescimento. Não existe um único composto químico que seja ideal para todos os propósitos e desta maneira é necessário determinar as vantagens que o agente apresenta quando utilizado em determinadas situações. Nos Estados Unidos, há uma decisão judicial sobre os alimentos e ação das drogas que afirma: “A linguagem utilizada na classificação deve transmitir o significado ordinário para aqueles a quem foi endereçada”. Os U.S. Food and Drug Administration e o U.S. Environmental Protection Agency regulamentam os produtos químicos microbianos (PELCZAR *et al.*, 1996).

### **3.5. LEITE E PRODUTO LÁCTEO**

O leite apresenta-se como uma emulsão líquida em que a fase contínua é formada de água e substâncias hidrossolúveis ao passo que a fase interna ou descontínua é formada, principalmente, de micelas de caseína e de glóbulos de gordura. O leite de vaca, o mais importante do ponto de vista comercial e industrial, é composto de 87,35% de água, e de 12,7% de sólidos totais, assim distribuídos: proteínas totais, 3,3 a 3,5%; gordura, 3,5 a 3,8%; lactose,

4,9%; além de minerais, 0,7%, e vitaminas (SGARBIERI, 2005). É um dos alimentos naturais mais completos, é rico em nutrientes e contém constituintes de importância nutricional para o homem e animais. O leite e seus derivados formam grupos de grande importância como suprimento nutricional em dietas alimentares (ROCHA *et al.*, 2008). Do ponto de vista de saúde pública, ocupa posição de destaque em nutrição humana, pois constitui um alimento essencial para todas as idades, sendo que para o recém-nascido o melhor leite é o leite materno (LEONARDI, 2011).

Como o leite é um produto que apresenta uma ampla população microbiana, torna-se necessário o controle microbiano. O controle de micro-organismos pela ação de agentes físicos denomina-se esterilização. É o processo pelo qual são mortos, inativados irreversivelmente ou retirados todos os organismos de um material ou suspensão. Geralmente os processos empregados para esse fim são processos físicos, por serem mais eficientes e, com algumas exceções, menos dispendiosos que os químicos (BORZANI *et al.*, 2001). No caso do leite, o método físico utilizado é geralmente a pasteurização. O controle de micro-organismos na pasteurização visa à destruição da flora microbiana causadora de doenças, sem tirar as características próprias do produto. Existem dois tipos de pasteurização, a lenta e a rápida. A primeira é feita pelo aquecimento do leite entre 62 e 63°C, por 30 e 35 min, seguido por um resfriamento brusco a 5°C ou menos. Durante o tempo de aquecimento o leite deve ser agitado para evitar aderências nas paredes do recipiente e promover um aquecimento uniforme. Já pasteurização rápida consiste em aquecer o leite a 72°C e mantê-lo por 15 segundos em um equipamento com trocadores de calor de placa, seguido de um choque térmico (LEITE *et al.*, 2006).

Na área da indústria de laticínios, vem surgindo uma nova tendência em produzirem iogurte e leites fermentados funcionais. A aceitação destes produtos pela população é motivada pelo excelente valor nutritivo, o que provoca um crescimento potencial, no consumo dos produtos probióticos (KEMPKA *et al.*, 2008). Dessa forma, os laticínios estão interessando-se em aumentar a sua competitividade no segmento de produtos funcionais e probióticos, para se adaptar as tendências de mudanças em um mercado consumidor exigente, que se modifica rapidamente, além de ter que manter a liderança tecnológica nas indústrias (THAMER e PENNA, 2006). O iogurte, produto da fermentação láctica, está presente na dieta alimentar

humana desde os tempos remotos, quando a fermentação era utilizada como forma de preservação do leite (MANZANARES, 1996).

O crescente interesse dos consumidores por um alimento saudável é um dos maiores estímulos no desenvolvimento de alimentos funcionais ou probióticos, como é o caso dos leites fermentados. Os alimentos funcionais, são aqueles alimentos ou ingredientes que, além das funções nutricionais básicas, quando consumidos como parte da dieta, produzem efeitos metabólicos benéficos à saúde (VINDEROLA, 2008; OLIVEIRA e SILVA, 2011). Os alimentos probióticos são aqueles que possuem micro-organismos vivos que beneficiam o organismo, melhorando a microflora intestinal e as funções fisiológicas do trato intestinal humano (MAGALHÃES *et al.*, 2011; XANTHOPOULOS *et al.*, 2012; LI, 2012).

De acordo com SOARES *et al.* (2011) o alimento funcional contendo micro-organismos probióticos pode ser favorável à prevenção de infecções intestinais e diarreias, ter efeito anticarcinogênico, auxiliar na redução dos níveis de colesterol e melhorar a digestão da lactose. Os principais micro-organismos utilizados para a produção de leites fermentados funcionais ou probióticos são: *Lac. Acidophilus*, *Bifidobacterium sp.*, *Lac. Casei subespécie casei biovar shirota*, *Lac GG strain* e /ou os grãos de kefir (ZACARCHENCO e ROIG, 2006). Na obtenção destes produtos lácteos (iogurte, bebida láctea, kefir, queijo), se faz necessário a utilização dos diferentes tipos de micro-organismos em biorreatores em batelada. Os leites fermentados são obtidos por coagulação e diminuição do pH do leite, ou do leite reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos. A coagulação ocorre por fermentação láctica, mediante a ação de cultivo de micro-organismos específicos. Durante e após o processo fermentativo os micro-organismos utilizados devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final, durante o prazo de validade do produto. Os leites fermentados envolvem as seguintes categorias de produtos: iogurte, leite acidófilo, kefir, kumys, coalhada e leite fermentado ou cultivado (FERREIRA, 2001; ORDONEZ, 2005).

### **3.6. PATENTE**

A descrição técnica com busca de anterioridade de patentes relacionados à obtenção de produtos lácteos fermentados por grãos de kefir com teor de colesterol reduzido, adicionando aromas e sabores de frutas regionais, foi realizada. Nesta pesquisa foi observado que de 110 pedidos amostrados, 27 mencionam conhecimento tradicional como referência de eficácia do uso pretendido para a produção do novo produto, isto é, uso de micro-organismos para a obtenção de um produto lácteo com baixo teor de colesterol.

De modo geral, os pedidos mencionam o uso do patrimônio genético de acordo com os usos empregados pela “medicina popular” brasileira e de outros povos, nos casos de plantas introduzidas e outros recursos genéticos (grãos de kefir), por exemplo. Com exceção do uso da Stevia pelos Guarani 17, não houve menção direta a um povo ou grupo humano relacionado a um conhecimento tradicional do processo fermentativo. Dessa forma, parece haver uma separação deliberada entre o recurso genético e o conhecimento tradicional associado, levando a crer que o uso tradicional deixa de ser uma fonte de informação (que já se encontra no estado da técnica), para ser considerado apenas uma referência de eficácia do objeto reivindicado no pedido. Essa estratégia isenta os requerentes da obrigação de obter consentimento prévio informado da comunidade provedora do conhecimento acessado (se o acesso foi feito a partir da comunidade), bem como de celebrar um contrato de repartição de benefícios (NOVION e BAPTISTA, 2006).

O novo interesse em tecnologia é o desenvolvimento de produtos com atividade probiótica, produzido através de fermentação por grãos de kefir em meio de cultura de carboidrato (açúcar mascavo). O produto acabado é uma bebida fermentada por simbiose de bactérias, usado como alimento funcional na prevenção e/ou tratamento profilático de várias formas etiológicas de patógenos gastrointestinal, promotores de infecções intestinais agudas. Nos últimos anos o Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) tem investigado diferentes formulações, a qual já originou uma patente de número PI0300108-3, apresentado pelos inventores: Lauro Xavier Filho, Álvaro Silva Lima, Sheila Alves Rodrigues, Ana Margarida Xavier Andrade Lima. Até o momento este documento segue a seguinte sequência primeira publicação realizada em 13/10/2003 (Nº RPI: 3.1) e segunda publicação realizada em

18/03/2003 (Nº RPI: 2.1), cuja descrição do despacho é de pedido depositado. A técnica apresentada pelo documento acima mencionado, não informa o uso da nanotecnologia para remoção de colesterol do leite e a aplicação de sabores de frutas regionais. Com base neste estudo, o nosso grupo inseriu um novo no processo, principalmente no que tange a remoção parcial de colesterol do leite para a obtenção da bebida láctea com sabor de frutas regionais, utilizando kefir em temperatura diferenciadas das informações descritas em patentes e artigos, referenciando-se assim o ineditismo deste processo proposto apoiado por diversos órgãos de fomento.

No documento PI0703742 – 2 A2 é descrito um processo para produção industrial de composição de uso farmacêutico, cosmético e alimentício à base de leveduras de kefir. Nesta invenção foi proposto por meio de um desenvolvimento específico, um processo de obtenção de uma composição à base de leveduras de kefir produzida industrialmente e que mantenha os princípios ativos e componentes conservados e que preserve as mesmas propriedades para os seres humanos. Segundo os inventores, o processo de fermentação diferencia-se da primeira patente quanto às condições específicas e com diferentes nutrientes. Os principais princípios ativos da composição à base de leveduras objeto desta patente correspondem a: (i) polissacarídeos de kefiran compostos principalmente de dois monossacarídeos, a glucose e a galactose, que estimulam a absorção dos aminoácidos, do cálcio, do ferro, do potássio, do magnésio, das proteínas e do ácido fólico produzido pelas células tratadas com esta composição, ao mesmo tempo em que seu complexo microbiano libera metabólitos que combatem muitas das bactérias que costumam atacar as células humanas; (ii) biotinas que servem para aumentar de forma considerável a assimilação dos complexos de vitaminas B, B1, B2, B3, B12, K e D, pelos órgãos e pelas células humanas submetidas ao tratamento com esta composição; (iii) interferon induz e aumenta a secreção do interferon e do interferon- $\beta$  por partes das células. O interferon desencadeia uma série de defesas aos ataques das células por bactérias, ao mesmo tempo que defende e atenua ou até elimina os efeitos destas bactérias nas células infectadas; (iv) spingomielinas dos tipos SpM-C21, SpM-C22, SpM-C23, SpM-C24, responsáveis pelo aumento da secreção do interferon por parte das células em até 15 vezes, enquanto estudos com medicamentos sintéticos demonstram um aumento de apenas duas a quatro vezes mais. A partir destas informações o documento PI0703742 – 2 A2 mostra que

pode-se considerar que os benefícios obtidos com o uso desta composição à base de leveduras são inumeráveis e de grande utilidade para o ser humano, quando usados na composição de produtos da indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia.

No Brasil, as patentes referentes à produção de kefir para diferentes aplicações são os documentos descritos acima. Contudo, nos países de clima frio existem diversas patentes referenciando o processo de obtenção da bebida kefir. Como por exemplo, o uso de membrana de ultrafiltração para obtenção de bebida kefir em pó (US 4957752 A).

Com relação, as demais invenções referenciadas nos sites de patente, a bebida láctea não gordurosa utilizando a tecnologia proposta neste trabalho, não foi identificado nenhum documento utilizando kefir no Brasil e no exterior. Os documentos relatam, por exemplo, o método de preparo de um produto lácteo de reduzido teor de carboidrato e um método para prepará-lo, onde a matéria-prima neste produto é um leite ultra filtrado contendo cerca de 1 a 3% de carboidratos, cerca de 3 a 7% de proteínas e 3 a 5% de gordura (WO 2004/075666 A2).

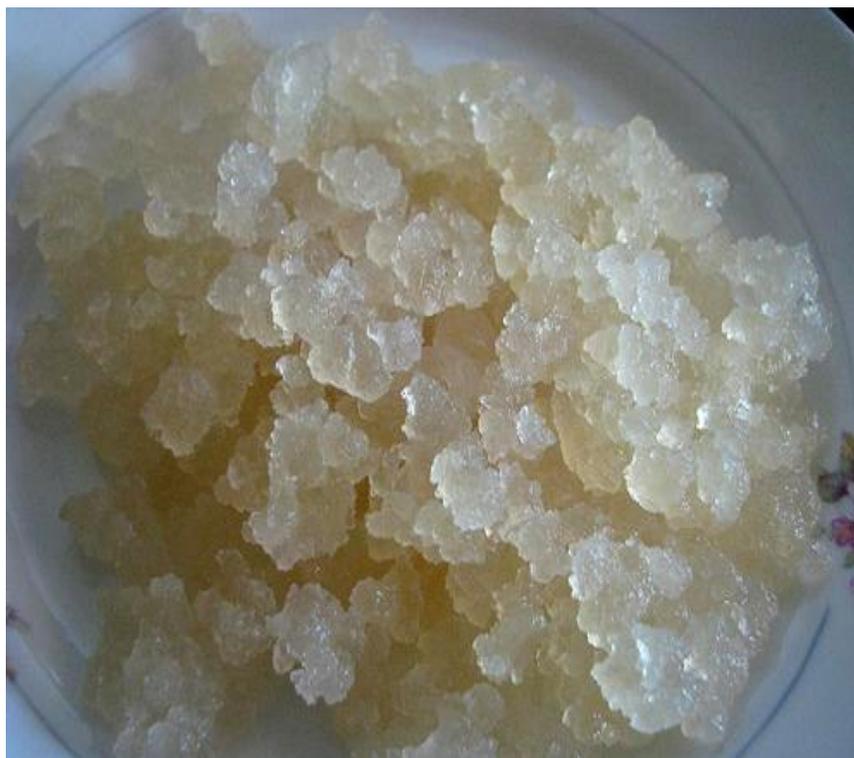
Não foram encontradas patentes, de uma bebida láctea de kefir com a adição de sabor de fruta exótica. Alguns documentos são encontrados utilizando outros tipos de processos fermentativos, como podemos citar o documento PI 0505132-0 A, no qual os inventores descrevem o método de preparação de uma bebida láctea com sabor de paçoca/amendoim misturada com frutas ou ervas.

Com base nos documentos referendados acima, neste projeto pretende-se após a sua realização a solicitação de uma patente e a manutenção do sigilo da inovação até a implementação do processo nas empresas parceiras. Lembrando que, a patente deve ser baseada no estado da técnica e não no recurso genético do kefir. Atendendo assim, a ética quanto ao uso de recursos do patrimônio genético da humanidade.

### **3.7. GRÃOS DE KEFIR**

Os produtos lácteos utilizando grãos de kefir são comercializados principalmente na Ásia, Europa e nos EUA. Entretanto, no Brasil poucos produtos são comercializados e geralmente são via internet (SANTOS e FERREIRA, 2008). Os grãos de kefir tem estrutura semelhante a uma couve-flor (Figura 3.3), apresentam-se como um agrupamento gelatinoso polissacarídeo

(kefirana) ao qual convivem em simbiose vários micro-organismos como leveduras, bactérias ácido lácticas, bactérias ácidas acéticas e fungos (PLESSAS, *et al.* 2004; GONKU e ALPKENT, 2005; LEITE, *et al.* 2012).



**Figura 3.3** - Aspecto dos grãos de kefir.

A palavra kefir é popularmente originada, a partir da palavra turca “indolência”, implicando em sensação boa ou prazer. De acordo com a região também é conhecida como: quépi, kippe, kéfir, khaphin, kiaphir, keffir, e kefyr (FERREIRA, 2001). No Brasil, conforme a Legislação vigente para o Padrão de Identidade Qualidade de Leites Fermentados do Ministério da Agricultura, kefir é o produto resultante da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado por cultivos ácido lácticos elaborados com grãos de kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. No entanto, FAO/OMS (2001) define a bebida kefir baseada na composição microbiana dos grãos de kefir (o arranque da cultura utilizada para produzir kefir): cultura iniciadora (*starter*) preparada de grãos de kefir, *Lactobacillus kefir* e espécies do gênero

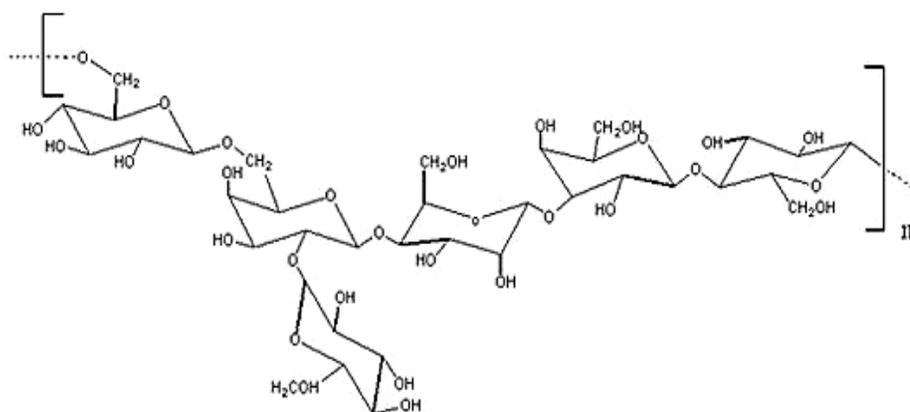
*Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* crescendo em um forte relacionamento específico. Os grãos de kefir constitui de ambas as leveduras, as que fermentam a lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e as que não fermentam (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Sacharomyces exiguus*). A bebida kefir possui uma consistência cremosa espessa uniforme, a bebida gerada pela fermentação do leite pelos micro-organismos associados aos grãos de kefir, possui um leve gosto ácido que refresca e um aroma moderado de levedura fresca, que se assemelha às bebidas alcoólicas muito “leves”. Associado à efervescência do gás produzido (CO<sub>2</sub>), é um produto lácteo diferente dos comercializados e possui cerca de 40 combinações aromáticas, podendo ser consumido fresco ou refrigerado (ORDONEZ, 2005).

De acordo com GUZEL-SEYDIM *et al.* (2011), a bebida kefir é resultado da fermentação do leite utilizando grãos de kefir, que apresentam várias bactérias inerentes do ácido láctico e bactérias do ácido acético em uma matriz de polissacarídeo. O produto kefir traz um sabor original devido à uma mistura de ácido láctico, dióxido de carbono, acetaldeído, levemente alcoólico, e outros constituintes formados durante o processo fermentativo. Outra característica do kefir que difere de outras bebidas fermentadas, é que os grãos de kefir são reaproveitados após a fermentação. A biomassa dos grãos de kefir aumenta lentamente durante o processo fermentativo. As características sensoriais da bebida kefir diferem das do iogurte, com relação à presença de uma pequena quantidade de CO<sub>2</sub>, álcool e os benefícios do polissacarídeo (FERREIRA, 2001; OTLES e CAGINDI, 2003; FARNWORTH, 2005).

A literatura entende que kefir e iogurte são produtos lácteos, cultivados de vários tipos de bactérias benéficas. No caso, o iogurte contém bactérias benéficas transitórias que mantêm o sistema digestivo limpo, porém o kefir pode colonizar o trato intestinal. A bebida kefir contém diversas bactérias, as quais não são comumente encontradas nos iogurtes, tais como: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Acetobacter*, *Streptococcus* e contém também leveduras igualmente benéficas, como *Saccharomyces*, *Kluyveromyces Torula*. A bebida kefir controla e elimina micro-organismos patogênicos destrutivos no corpo (OTLES e CAGINDI, 2003; FARNWORTH, 2005; ORDONEZ, 2005). Vários benefícios à saúde humana têm sido atribuídos ao kefir, incluindo atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GARROTE *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2009; GLIBOWSKI e KOWALSKA, 2012). Uma das vantagens mais notável da bebida kefir em relação ao iogurte é a presença do

polissacarídeo chamado kefirana que possuem propriedades antiinflamatórias e antitumorais (ORDONEZ, 2005).

O kefirana é composto de duas moléculas de monossacarídeos, D-glicose e D-galactose, em proporções iguais. A Figura 3.4 apresenta a molécula do kefirana. Esta tem demonstrado ter certas qualidades medicinais, sendo útil como alimento funcional para evitar ou controlar algumas doenças comuns que ocorrem no trato intestinal (DMJ BIOTECH CORP, 2009).



**Figura 3.4** - Molécula do kefirana ([www.kefir.co.kr](http://www.kefir.co.kr)).

GUZEL-SEYDİM *et al.* (2011) relatam que as substâncias metabólicas produzidas durante a fermentação utilizando grãos de kefir tem apresentado efeitos nutracêuticos comprovadas tais como: efeitos antimutagênica e anticarcinogênica, efeito na redução do colesterol, na atividade microbiana, estimula o sistema imunológico e reduz a intolerância a lactose.

Além do potencial probiótico da bebida láctea obtida a partir da fermentação de grãos de kefir, no Brasil não foram encontrados estudos utilizando sabores de frutas regionais da região de Sergipe.

### 3.8. FRUTAS REGIONAIS

As frutas constituem parte essencial na alimentação equilibrada e balanceada contribuído para uma dieta saudável e uma qualidade de vida melhor, pois são importantes fontes de

vitaminas, fibras, minerais, assim como outros compostos biologicamente ativos. Estudos epidemiológicos demonstram um relacionamento inverso entre o consumo de frutas e o risco de desenvolver doenças cardiovasculares (FRANÇOSO *et al.*, 2008; SANTIAGO-SILVA *et al.*, 2011).

O Brasil é um país rico em frutas regionais e algumas são consideradas frutas tropicais exóticas, de alto valor nutricional, os quais apresentam vitaminas e pigmentos naturais na sua composição e têm alto potencial de industrialização. O Estado de Sergipe possui como árvore símbolo, a mangabeira (*Hancornia speciosa*), que produz um fruto bastante apreciado pelas suas excelentes características físicas, com aroma e sabor agradáveis e associados ao elevado valor nutritivo (VIEIRA NETO, 2002). A Figura 3.5 apresenta os frutos da mangabeira e da sirigueleira.



Mangaba



Siriguela

**Figura 3.5** – Aspecto do fruto da mangabeira e do fruto da sirigueleira.

É uma espécie da família Apocynaceae, com ocorrência na região nordeste do Brasil (caatinga), na região central do país (até São Paulo e Mato Grosso do Sul), bem como no cerrado (Goiás). O fruto apresenta padrão respiratório climatérico, é do tipo baga, elipsoidal ou arredondada, de 2,5 cm a 6,0 cm (com vários tamanhos na mesma planta), exocarpo amarelo, com manchas ou estrias avermelhadas, polpa bastante suave, doce, carnosu-viscosa, ácido, contendo geralmente de 2 a 15, ou até 30 sementes discóides, de 7 a 8 mm de diâmetro (SOARES JÚNIOR *et al.*, 2008). A mangaba é um fruto extremamente perecível, apesar de apresentar potencial industrial para a produção de sucos, sorvetes e doces, tem sido muito

pouco explorada, embora seus produtos elaborados artesanalmente tenham grande aceitação do consumidor na Região Nordeste do Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2009).

Outra espécie bastante produzida no Estado de Sergipe cuja árvore produtora é a sirigueira (*Spondias purpurea* L.), é originária da América Tropical. O fruto tipo drupa de cor vermelho-escura quando maduro, possui polpa de aroma e sabor agradáveis. Devido sua excelente qualidade sensorial, a siriguela é muito apreciada no Nordeste brasileiro, pode ser consumida “*in natura*” ou processada na forma de diversos produtos, normalmente disponibilizados no mercado, o que tem proporcionado crescente interesse para seu cultivo comercial (MARTINS *et al.*, 2003; BICAS *et al.*, 2011; AUGUSTO *et al.*, 2012). A planta raramente ultrapassa 7 m de altura, possui ramos que se desenvolvem rente ao solo. Suas folhas são compostas, e as inflorescências possuem flores perfeitas que formam frutos isolados ou em cachos. Esses frutos possuem uma película fina, verde, amarela ou vermelha, dependendo do estágio de maturação; polpa de pequena espessura ao redor de um grande caroço (LEON e SHAW, 1990). A siriguela se fixou mundialmente como uma cultura explorada na forma de pomares comerciais, e no Brasil possui um grande potencial econômico. A fruta possui atrativa coloração e excelente sabor. É comercializada na forma “*in natura*”, em diversas regiões do Brasil, notadamente no Norte e Nordeste (VIEIRA NETO, 2002).

A comercialização destas frutas está concentrada nas feiras livres por bairros e cidades, com incondicional prevalência nas cidades interioranas por toda a parte do nordeste, com distribuições restritas para a região sudeste, e até para o sul. Na região sudeste a procura pelas frutas fica por parte dos emigrantes, que não conseguem esquecer o peculiar e único sabor da fruta ligeiramente ácida de sua terra natal. Além disso, a comercialização dos frutos está restrita a sua época de safra, sua perecibilidade é alta (ANSELMO *et al.*, 2006). A elevada taxa de perecibilidade de frutos tropicais propicia o desenvolvimento de técnicas adequadas de manuseio e conservação, que visem aumentar a vida útil pós-colheita (ALVES, 2007; SANTOS *et al.*, 2009). A fruta fresca é um produto delicado, de rápido processo de amadurecimento e deterioração, necessita de cuidados especiais para evitar danos, e neste caso, surge um dos grandes entraves para a fruticultura de exportação que é o relacionado a serviços de logística. Parte da produção nacional não é exportada porque a oferta de serviço de transporte adequado é insuficiente e, por conseguinte cara. É preciso criar infra-estrutura adequada à fruticultura de

exportação, pois a qualidade na apresentação do produto é um fator decisivo para o crescimento da exportação de frutas brasileiras. Uma saída para se resolver esse tipo de problema é desenvolver métodos para utilização dessa fruta como, por exemplo, bebidas lácteas, agregando assim valor a esta fruta regional.

Na literatura existem trabalhos de pesquisa utilizando outros tipos de frutas exóticas na produção de bebidas lácteas, como o umbu, a manga e o cajá, os quais obtiveram uma ótima aceitação sensorial dos provadores em questão (SANTOS *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2008; PEREIRA, *et al.*, 2010). Com base na alimentação equilibrada e na manutenção da saúde, a comunidade científica tem desenvolvido estudos com intuito de comprovar a atuação de certos alimentos na prevenção de doenças, estimulando desta forma o desenvolvimento potencial de mercado (médias, pequenas e microempresas locais).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Nesta seção são apresentados os principais materiais e a metodologia utilizada neste trabalho para a remoção de colesterol do leite e do desenvolvimento de produtos lácteos utilizando grãos de kefir. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Alimentos (LPA) do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP).

### **4.1. MATERIAL**

Os materiais empregados são especificados a seguir:

#### **4.1.1. REAGENTES ANALÍTICOS**

Os reagentes utilizados foram: Tetraetilortossilicato-TEOS (98%) adquirido da Sigma Aldrich Co (Milwaukee, WI, EUA); Acetonitrila (99,9%) e Isopropanol (99,7%) grau HPLC da Vetec, Hexano (65%); Peróxido de Hidrogênio (32%); Hidróxido de Sódio (97%); Hidróxido de Potássio (85%) adquiridos da Fmaia, Ácido clorídrico (37%); Hidróxido de Amônia (30%); Cloroformio (99,8%) e Etanol (99,8%) adquiridos da Vetec, todos os reagentes utilizados foram P.A de grau analítico ou grau HPLC.

#### **4.1.2. LEITE**

As amostras de leite bovino tipo C, foram obtidas junto aos produtores da Bacia Leiteira do município de Nossa Senhora da Glória, localizada na Região Nordeste do Brasil, no oeste do Estado de Sergipe, na microrregião do alto sertão do São Francisco. As amostras, embaladas em sacos plásticos, foram acondicionadas sob refrigeração em caixas térmicas e transportadas ao Laboratório de Pesquisa em Alimentos (LPA) no Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), onde ficaram sob congelamento (-20°C) até o uso.

#### 4.1.3. POLPAS DE FRUTAS REGIONAIS

As polpas de mangaba e siriguela foram obtidas no supermercado da cidade de Aracaju, acondicionadas e transportadas sob refrigeração ao Laboratório de Pesquisa em Alimentos (LPA) do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), onde ficaram sob congelamento (-20°C) até o uso.

#### 4.1.4. AGENTE BIOLÓGICO

O consórcio microbiano que origina os grãos de kefir utilizados nesse estudo foi obtido junto à Pastoral do Menor, e mantidos no Laboratório de Pesquisa em Alimentos (LPA). O consórcio microbiano foi cultivado à temperatura ambiente (25 °C) em solução de açúcar mascavo a 10% (p/v). O processo de crescimento e manutenção dos grãos de kefir ocorreu sem agitação e a transferência para uma nova solução ocorreu a cada três dias.

### 4.2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Os procedimentos experimentais foram: a preparação dos sólidos adsorventes obtidos pela técnica sol-gel, as colunas de leito fixo para a remoção e dessorção do colesterol do leite ou solução sintética; a obtenção da bebida láctea com sabor de frutas regionais.

#### 4.2.1. PREPARAÇÃO DO SÓLIDO ADSORVENTE DA COLUNA DE LEITO FIXO

Neste trabalho foram preparados dois tipos de adsorventes para as colunas de leito fixo a partir da técnica sol-gel, utilizando como precursor o Tetraetilortossilicato – TEOS. São eles: o adsorvente impresso molecularmente com a solução de colesterol (Polímero impresso molecularmente/PIM) e o adsorvente sem adição de colesterol (Matriz pura/MP).

O TEOS, por ser altamente higroscópico foi manipulado, durante a pesagem e preparação das soluções, em ambiente de atmosfera controlada, neste caso atmosfera inerte de nitrogênio. A

metodologia de preparo do adsorvente puro e do adsorvente impresso molecularmente fundamentou-se no procedimento descrito por SOARES *et al.* (2007).

No preparo do adsorvente MP, 30 mL de TEOS foram dissolvidos em 36 mL de etanol absoluto sob atmosfera inerte de nitrogênio. Foram adicionados 0,11 mL de ácido clorídrico diluído em 5 mL de água ultra pura (solução pré-hidrólise), a mistura foi agitada (20 rpm) durante 90 min a 35°C. Adicionou-se 1 mL de hidróxido de amônia diluído em 6 mL de etanol (solução de hidrólise), a mistura foi mantida estática durante 18 horas para efetuar a policondensação a 4°C. O gel foi lavado com etanol e água a 50°C e seco sob vácuo à temperatura ambiente por 24 horas. Com relação ao adsorvente PIM o procedimento foi idêntico ao descrito para o MP exceto que foram adicionados 0,51 g de colesterol dissolvido em 10 mL de etanol antes da adição do hidróxido de amônia. O gel seco obtido em ambos os casos, MP e PIM foi triturado em um pó com granulometria de 60 mesh (0,250 mm), conforme descrito no depósito de pedido de patente com o seguinte número de Protocolo 0000221108562820.

#### 4.2.2. AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE COLESTEROL EM COLUNA DE ADSORÇÃO NO PROCESSO EM BATELADA A TEMPERATURA AMBIENTE

A Figura 4.1 apresenta a unidade experimental de remoção e dessorção da solução sintética de colesterol ou leite utilizando como leito o adsorvente MP ou o adsorvente PIM/colesterol. Utilizou-se uma coluna de vidro, com diâmetro de 1 cm e foram utilizadas diferentes alturas do leito (1, 2, 3, 4 e 5 cm). Na base da coluna foi utilizada lã de vidro sinterizada para impedir que as pequenas partículas de adsorvente passassem para o restante da unidade experimental.

Na corrente de eluente (solução sintética de colesterol ou leite), as amostras foram coletadas em vidro âmbar de 200 mL, derivatizadas e analisadas posteriormente no HPLC. Foi calculada a concentração média por meio de média aritmética dos valores de todas as amostras retiradas durante cada experimento, obtendo-se, dessa forma a concentração média e a porcentagem de remoção do colesterol (%) para cada ensaio.

Com relação ao teste de dessorção o leite foi lavado com etanol a 50°C, em seguida as amostras foram derivatizadas e analisadas em HPLC.



**Figura 4.1** - Unidade experimental de remoção e dessorção do colesterol no processo em batelada a temperatura ambiente.

#### 4.2.3. AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE COLESTEROL EM COLUNA DE ADSORÇÃO NO PROCESSO DE FLUXO CONTÍNUO A TEMPERATURA CONTROLADA

Após a seleção do melhor adsorvente, foi realizado o estudo de remoção de colesterol em fluxo contínuo, utilizando coluna de adsorção de vidro encamisada com diâmetro de 1 cm interno e 10 cm de altura e bomba peristáltica nas seguintes condições: altura de 1, 2 e 3 cm, vazão variando de 3, 6 e 9 mL/min em fluxo contínuo (Figura 4.2). O leite foi percolado em coluna encamisada a temperatura de 42°C, nessa temperatura os glóbulos de gordura estão mais dispersos de forma homogênea no leite. Na base da coluna encamisada foi utilizada lã de vidro sinterizada para impedir que as pequenas partículas de adsorvente passassem para o restante da unidade experimental. Na corrente de eluente (leite), as amostras foram coletadas em vidro âmbar de 200 mL no tempo 0, de 5 em 5 minutos até 15 minutos, 15 em 15 minutos até 1 hora e 30 minutos, 30 em 30 minutos até 3 horas e posteriormente de hora em hora até 6 horas de remoção, e no teste de dessorção o leite foi lavado com etanol a 50°C, as amostras foram coletadas seguindo o mesmo procedimento realizado para o leite. Em seguida foram analisadas

em HPLC. Após a remoção do colesterol no adsorvente, o leite obtido foi submetido às etapas descritas no item 4.2.2.



**Figura 4.2** - Unidade experimental de remoção e dessorção do colesterol no processo de fluxo contínuo a temperatura controlada.

#### 4.2.4. AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE COLESTEROL EM COLUNA DE ADSORÇÃO NO PROCESSO DE FLUXO CONTÍNUO A TEMPERATURA CONTROLADA COM AMPLIAÇÃO DE ESCALA

Após a seleção da melhor condição no item 4.2.3, foi realizado o estudo de remoção e dessorção de colesterol em fluxo contínuo, utilizando coluna de adsorção de vidro encamisada com diâmetro de 2,5 cm interno e 30 cm de altura. Nas mesmas condições descritas no item 4.2.3, variando apenas a altura do leito para 7,5 cm e a vazão para 7,5 mL/min. As amostras da adsorção e da dessorção do colesterol do leite foram coletados nos tempos pré-determinados no item 4.2.3. A Figura 4.3 representa a unidade experimental para a coluna com ampliação de escala.



**Figura 4.3** - Unidade experimental de remoção e dessorção do colesterol no leite com ampliação de escala.

#### 4.2.5. AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DA PROTEÍNA EM COLUNA DE ADSORÇÃO NO PROCESSO DE FLUXO CONTÍNUO A TEMPERATURA CONTROLADA

O leite foi percolado em coluna de adsorção de vidro encamisada com 1 cm de diâmetro interno e com 10 cm de altura nas seguintes condições: vazão de 3 mL/min, leito de 3 cm de altura e temperatura de 42°C. Na base da coluna encamisada foi utilizada lã de vidro sinterizada para impedir que as pequenas partículas de adsorvente passassem para o restante da unidade experimental. Na corrente de eluente (leite), as amostras foram coletadas em vidro âmbar de 200 mL no tempo 0, de 5 em 5 minutos até 15 minutos, 15 em 15 minutos até 1 hora e 30 minutos, 30 em 30 minutos até 3 horas e após de hora em hora até 6 horas. Em seguida a proteína foi quantificada pelo método de Kjeldahl.

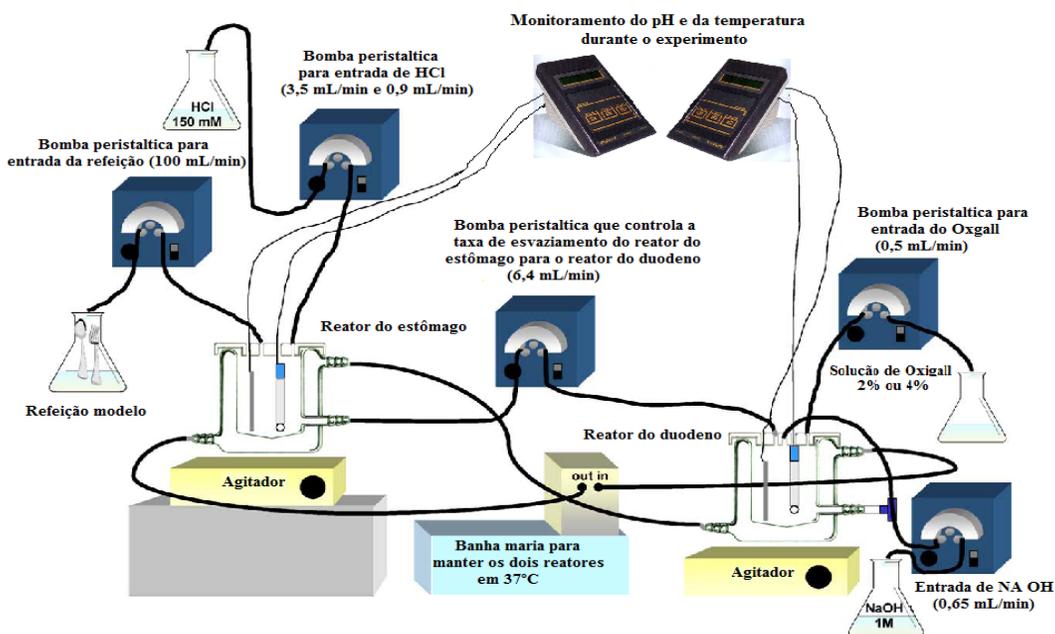
#### 4.2.6. PROCESSO FERMENTATIVO

Foi adotada a melhor condição de fermentação de acordo com o trabalho de pesquisa desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Alimentos (Estudo da Obtenção e Ação de Produtos Lácteos Funcionais e Probióticos). A condição previamente estabelecida foi: leite bovino sem ou com remoção parcial de colesterol, 15% de leite em pó e 10% de grãos de kefir a temperatura de 45°C durante 24 h (GAMA, 2010). A fermentação ocorreu de forma estática em frascos Erlenmeyers de 1000 mL contendo 700 mL do meio (leite bovino e 15% de leite em pó). O meio foi pasteurizado a 80°C por 10 minutos e resfriado rapidamente em banho de gelo. A inoculação foi realizada adicionando grãos de kefir (10%). Em seguida foram saborizadas com 15 e 30% de polpa de mangaba ou siriguela.

Posteriormente foi feita o estudo do processo fermentativo utilizando um biorreator de bancada da TECNAL (TEC-BIO V) de 4,5 L, variando a agitação (0, 25 e 50 rpm) e a aeração (0, 0,25 e 50 vvm). Utilizou-se a condição de fermentação pré-estabelecida citada anteriormente. Amostras foram recolhidas, em diferentes tempos (0, 6, 12 e 24 h), para realizar as análises de acidez, pH, viscosidade e células viáveis.

#### 4.2.7. ANÁLISE DA CAPACIDADE PROBIÓTICA

O leite fermentado foi adicionado em um sistema modelo que representa as condições do estômago e do duodeno humano apresentado na Figura 4.4. O sistema foi formado por dois reatores encamisados de 1 L cada com temperatura mantida a 37°C. O reator 01 (reator do estômago) continha, antes da adição do leite fermentado, 17,5 mL de HCl 150 mM para simular a fase cefálica de secreção ácida. Inicialmente a vazão de HCL foi de 3,5 mL/min até o reator atingir pH 3,0, em seguida a vazão passou a 0,9 mL/min, para simular a inibição gástrica. No reator 02 (reator do duodeno) o pH foi mantido a 6,5 pela adição de 0,9 mL/min de NaOH 1 M. No tempo 0 h, o reator do duodeno continha 7 mL de solução biliar Oxgall a 4%, esta solução foi bombeada para o reator nos primeiros 30 min com uma vazão de 0,5 mL/min, em seguida a solução foi reduzida a 2% de Oxgall até o final do experimento. As células sobreviventes foram determinadas nos dois reatores por meio da contagem em placa nos tempos de 30, 60 e 90 min (MAINVILLE *et al.*, 2005).



**Figura 4.4** – Unidade experimental do simulador estômago-duodeno (MAINVILLE *et al.*, 2005 com modificações).

### 4.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

Os métodos de análise são descritos de forma sucinta nesse item.

#### 4.3.1. DOSAGEM DO COLESTEROL

Para a dosagem de colesterol das amostras do leite, antes e após percolação pela coluna, foi necessária a derivatização destas, da seguinte forma: pesou-se 10 gramas da amostra e adicionou 10 mL de solução contendo KOH e etanol (razão molar 1:9), deixando-as por mais 10 minutos a 60°C e depois adicionou 10 mL de água destilada. Após o resfriamento da amostra, extraiu-se o sobrenadante com 15 mL de n-hexano. Após da separação das fases, a secagem da amostra foi realizada na presença de atmosfera inerte. A amostra foi reconstituída em fase móvel composta de acetonitrila e isopropanol na razão molar (9:1).

A dosagem de colesterol foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando o cromatógrafo Pro Star (Varian), com detector UV-visível (SPD-10 AVvp) e *software* (Programa Star Integrator Varian versão 4.5) para a obtenção dos dados. A coluna analítica utilizada foi a C18 (150 x 4,6 mm x 5  $\mu$ ) (Gemini, Phenomenex), mantida a 40°C em forno com temperatura controlada. As amostras derivatizadas foram injetadas no cromatógrafo. A fase-móvel utilizada foi composta de 90% de acetonitrila e 10% de isopropanol em fluxo de 1,5 mL/min, sendo o tempo de análise de 20 minutos. Os cromatogramas foram obtidos com o comprimento de onda de 210 nm. Foi preparada a curva de calibração para a dosagem de colesterol (ANEXO 1).

#### 4.3.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS PRODUTOS LÁCTEOS

As análises foram realizadas em triplicata e seguiram a metodologia do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2005).

##### 4.3.2.1. DETERMINAÇÃO DE UMIDADE

Baseou na determinação da perda de massa fresca de uma amostra de 2 – 10 g de produto lácteo, em estufa a 105°C, até peso constante.

##### 4.3.2.2. DETERMINAÇÃO DE CINZAS

Foi feita por meio de calcinação de 20 g de amostra em uma mufla a 550°C. O material foi deixado na mufla até que o resíduo apresentasse uma coloração branca ou cinza claro.

##### 4.3.2.3. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA

A proteína foi quantificada pelo método de Kjeldahl, o qual está baseado na determinação do teor de nitrogênio da amostra. Esse método compreende três etapas: digestão da amostra, destilação e titulação. No primeiro momento, foi feita a digestão de 0,2 g de amostra, a qual foi

pesada, digerida com ácido sulfúrico concentrado na presença de 1,5 g de catalisador ( $96\%K_2SO_4 + 4\%CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ). Em seguida, ocorreu a reação do bissulfato de amônio formado com hidróxido de sódio para a liberação de amônia, dentro de um volume conhecido de ácido bórico. O borato de amônio formado foi dosado com uma solução padronizada de ácido clorídrico para obtenção do teor de nitrogênio. A conversão do teor de nitrogênio em proteína foi feita através do fator de conversão 6,38, utilizado para leite e derivados.

#### 4.3.2.4. DETERMINAÇÃO DOS LIPÍDIOS

O método utilizado foi o Bligh-Dyer. Pesou-se 4 g de amostra em proveta de 50 mL, adicionou-se 20 mL de uma solução composta de três solventes na seguinte proporção (0,8 de água, 1 de clorofórmio e 2 de metanol), agitou-se durante 3 min no vortex. Adicionou-se 10 mL de clorofórmio e 10 mL de sulfato de sódio a 1,5%, agitou-se durante 2 min e deixou-se decantar para separação de fases. Após a separação das duas fases, uma de clorofórmio rica em lipídeos que fica na parte inferior e a outra aquosa que contém os outros compostos da amostra. Após a separação das camadas, a porção lipídica foi coletada em um béquer previamente pesado. O béquer foi colocado em estufa a  $105^{\circ}C$  para eliminar o solvente. Após resfriamento em dessecador o béquer foi pesado e pela diferença do peso do béquer foi calculado o percentual de gordura da amostra (CECCHI, 1999).

#### 4.3.2.5. DETERMINAÇÃO DO pH

Transferiu-se uma alíquota de 10 g da amostra para um béquer e diluiu-se com 100 mL de água destilada. Utilizou-se um pHmetro da Digimed DM-20, previamente calibrado para medida do pH.

#### 4.3.2.6. DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ EM ÁCIDO LÁCTICO

Pesou-se 10 g da amostra em um béquer, adicionou-se 10 mL de água isenta de gás carbono e misturou-se com bastão de vidro. Adicionou-se 5 gotas de fenolftaleína e titulou-se com hidróxido de sódio 0,1 M, até o aparecimento de uma coloração rósea.

#### 4.3.2.7. DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATO

O carboidrato da amostra foi determinado pelo método da diferença, no qual o teor foi obtido pela equação 4.1.

$$\text{Carboidrato} = 100 - \text{umidade} - \text{cinzas} - \text{proteínas} - \text{lipídios} \quad (4.1)$$

#### 4.3.2.8. DETERMINAÇÃO DE ENERGIA

Foi calculado com base na suposição de que o teor de carboidrato, lipídios e proteína contribuem com 4, 9 e 4 vezes respectivamente, no cálculo da energia contida em 100g de amostra como indicado na equação 4.2.

$$\text{Energia} = 4 \times \text{carboidratos} + 9 \times \text{lipídios} + 4 \times \text{proteínas} \quad (4.2)$$

#### 4.3.2.9. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

Pesou-se aproximadamente 2 g da amostra em um béquer de 100 mL. Transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL contendo 50 mL de água. Foi adicionado 2 mL da solução de sulfato de zinco a 30% e 2 mL da solução de ferrocianeto de potássio a 15%, completou-se o balão com água. Filtrou-se em papel de filtro para um frasco Erlenmeyer de 300 mL, o filtrado deverá estar límpido. Em um balão de 300 mL, adicionou-se 10 mL de cada solução de Fehling, 40 mL de água e aqueceu-se até a ebulição. Transferiu-se o filtrado para uma bureta e

adicionou-se gota a gota, sobre a solução do balão em ebulição, agitando sempre, até a solução passar de azul a incolor.

#### 4.3.2.10. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS

Pesou-se aproximadamente 5 g da amostra em um béquer de 100 mL. Transferiu-se para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de água. Acidificou com 2 mL de ácido clorídrico, aqueceu-se em banho-maria por 15 min e resfriou-se. Neutralizou-se com hidróxido de sódio a 30%, verificou-se o pH (0-14) utilizando-se fita indicadora. Transferiu-se para um balão de 250 mL, adicionou-se 5 mL da solução de sulfato de zinco a 30% e 5 mL da solução de ferrocianeto de potássio a 15%, completou-se o balão com água. Filtrou-se em papel de filtro para um frasco Erlenmeyer de 300 mL, o filtrado deverá estar límpido. Em um balão de 300 mL, adicionou-se 10 mL de cada solução de Fehling, 40 mL de água e aqueceu-se até a ebulição. Transferiu-se o filtrado para uma bureta e adicionou-se gota a gota, sobre a solução do balão em ebulição, agitando sempre, até a solução passar de azul a incolor.

#### 4.3.3. VISCOSIDADE

A viscosidade foi determinada em viscosímetro Visco Star-r, Modelo v10002, com adaptador para amostras de pequeno volume (200 mL). Utilizou-se *spindle* número R2 e velocidade angular de 50 rpm permanecendo em torno de 2 minutos sem controle de temperatura. A temperatura inicial das amostras foi de 10°C.

#### 4.3.4. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

As análises microbiológicas do leite e dos produtos lácteos fermentados por grãos de kefir foram realizadas segundo a metodologia do manual de métodos de análise microbiológica de alimentos (SILVA *et al.*, 2001).

##### 4.3.4.1. CONTAGEM TOTAL DE COLIFORMES TOTAIS E TERMO TOLERANTE

Uma alíquota de 25 g foi transferida para um frasco de homogeneização previamente esterilizado, contendo 225 mL de solução diluente (solução salina peptonada). As alíquotas

foram homogeneizadas, com finalidade de se obter a diluição inicial ( $10^{-1}$ ). A mesma foi homogeneizada em seguida foi transferido 1 mL para um tubo contendo 9 mL de Solução Salina Peptonada (SSP) 0,1% obtendo-se a diluição  $10^{-2}$  e o mesmo procedimento foi repetido para as demais diluições.

Para determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termo tolerante, utilizaram-se diluições de ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ) do alimento em estudo. Foram tomados três tubos contendo 8 mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) contendo um tubo de Durham invertido, obtendo-se três séries de cinco tubos. Foram incubados em estufa a temperatura de 35-37°C, por 24-48 h. Os positivos foram semeados em tubos contendo 8 mL de Caldo Verde Brillante Bile 2% (VB), com tubo de Durham invertido, incubando-os a 35°C, durante 24-48 h. A prova foi considerada positiva somente quando se verificou turvação do meio e produção de gás nos tubos de Durham, dentro de um período de incubação máximo de 48 h. A determinação quantitativa foi realizada de acordo com a técnica do NMP, recomendada pela American Public Health Association.

Para a etapa confirmativa de coliformes fecais tolerantes, uma alçada de cada cultura foi tomada dos tubos positivos de LST e transferida para tubos de Caldo *E. coli* (EC), contendo tubos de Durham invertidos, e incubados a 45,5°C, em banho-maria, para determinação de coliformes termo tolerantes. Após a incubação por 24-48 horas foi realizada leitura, e os tubos que apresentavam turvação do meio e produção de gás foram considerados positivos para bactérias do grupo coliformes termo tolerantes. Para cada diluição, o número de tubos positivos foi anotado e quantificado por meio da tabela de NMP, determinando, assim, o NMP de bactérias coliformes termo tolerantes por grama de produto lácteo analisado.

#### 4.3.4.2. DETECÇÃO DE *SALMONELA*

Uma alíquota de 25 g de amostra foi transferida para um frasco de homogeneização previamente esterilizado, contendo 225 mL de caldo Lactosado. As alíquotas foram homogeneizadas, e incubadas em estufa a 35°C por 18-20 h (pré-enriquecimento). Posteriormente volumes de 1 mL foram transferidos para tubos contendo 10 mL de caldo Selenito Cistina e caldo Tetracionato, respectivamente, e incubados a  $41 \pm 1^\circ\text{C}$  (enriquecimento

seletivo). Após 24 h foram realizados repiques em placas de Agar Entérico de Hectoen (HE), Ágar Bismuto Sulfito (BS) e Agar Xilose Lisina Desoxicicolato (XLD), e incubados a 36°C por 18-24 h. Colônias típicas foram re-isoladas em tubos inclinados de Agar Lisina Ferro (LIA) e Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) que foram incubados a 36°C por 18-24 h. As amostras foram submetidas aos testes de identificação bioquímica (teste de urease; teste de indol; teste de fermentação da lactose e sacarose; teste de vermelho de metila e Voges-Proskauer; teste de citrato e teste de descarboxilação da lisina em caldo).

#### 4.3.4.3. CONTAGEM DE CELULAS VIÁVEIS

Uma alíquota de 25 g de amostra foi transferida para um frasco de homogeneização previamente esterilizado, contendo 225 mL de caldo Lactosado. As alíquotas foram homogeneizadas, e posteriormente foram realizadas as diluições ( $10^{-1}$  a  $10^{-9}$ ) em tubos de ensaios contendo 9 mL de caldo lactosado, em seguida realizou-se o plaqueamento de 1 mL de produto lácteo em placas de petri contendo Agar de Man Rogosa & Sharpe (MRS), as quais foram incubadas a 30°C por 48 a 72 horas em atmosfera microaerófila.

#### 4.3.5. ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa com o número de Protocolo 150311. Os leites foram analisados seguindo a metodologia da diferença do padrão. Os leites com remoção parcial de colesterol utilizando PIM ou MP foram comparados com o padrão (leite integral tipo C). A equipe da análise sensorial foi composta por 30 provadores não treinados, foram selecionados aleatoriamente e convidados a participar do estudo pessoas da faixa etária entre 18 e 60 anos, de ambos os sexos, que possuíam hábito de consumir produtos lácteos. Pessoas com aversão aos produtos foram excluídas. Cada provador atribuiu uma nota de acordo com a proximidade dos parâmetros sensoriais em relação à amostra padrão. As amostras foram servidas em cabines individuais e utilizou a escala de 10 pontos, como mostra a Figura 4.5 para o teste sensorial da diferença do padrão.

Nome: _____		Data: ____/____/____											
<p>Prove primeiramente a amostra padrão e posteriormente prove as amostras codificadas da esquerda para a direita. Em seguida as compare com o padrão utilizando os valores ao lado.</p>													
Amostra _____:	_____	<table border="1"> <tr> <td>9- Extremamente diferente do padrão.</td> </tr> <tr> <td>8-</td> </tr> <tr> <td>7-</td> </tr> <tr> <td>6-</td> </tr> <tr> <td>5-</td> </tr> <tr> <td>4-</td> </tr> <tr> <td>3-</td> </tr> <tr> <td>2-</td> </tr> <tr> <td>1-</td> </tr> <tr> <td>0- Igual ao padrão</td> </tr> </table>		9- Extremamente diferente do padrão.	8-	7-	6-	5-	4-	3-	2-	1-	0- Igual ao padrão
9- Extremamente diferente do padrão.													
8-													
7-													
6-													
5-													
4-													
3-													
2-													
1-													
0- Igual ao padrão													
Amostra _____:	_____												
Amostra _____:	_____												
Amostra _____:	_____												

**Figura 4.5** - Ficha de avaliação sensorial pelo método da diferença do padrão.

Após esta etapa foi realizada uma análise sensorial pelo método da aceitação, na qual foram avaliados os parâmetros sensoriais aparência, aroma, sabor, textura e impressão global. A equipe da análise sensorial foi composta por 30 provadores com as características descritas anteriormente, cada provador atribuiu à nota de acordo com as características dos parâmetros sensoriais analisados. Junto com as amostras foi fornecida água à temperatura ambiente e um biscoito tipo água e sal a fim de eliminar a interferência de sabor residual na avaliação entre as amostras. Os provadores atribuíram uma nota a cada parâmetro analisado de acordo com uma escala hedônica estruturada de 9 pontos e indicaram a intenção de compra como mostra a Figura 4.6.

Com relação às bebidas lácteas sem e com adição de polpa de mangaba e siriguela, foram analisadas sensorialmente pelo método da aceitação, seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente e foi indicada a intenção de compra dos provadores.

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

Prove e avalie a amostra conforme a escala a seguir:

ESCALA	
Valor	Característica
1	Desgostei muitíssimo
2	Desgostei muito
3	Desgostei moderadamente
4	Desgostei ligeiramente
5	Nem gostei/Nem desgostei
6	Gostei ligeiramente
7	Gostei moderadamente
8	Gostei muito
9	Gostei muitíssimo

Número da amostra: \_\_\_\_\_

Aparência: \_\_\_\_\_

Aroma: \_\_\_\_\_

Sabor: \_\_\_\_\_

Textura: \_\_\_\_\_

Impressão Global: \_\_\_\_\_

Em relação à intenção de compra:

( ) Eu certamente compraria este produto

( ) Eu provavelmente compraria

( ) Não sei se compraria este produto

( ) Eu provavelmente não compraria este produto

( ) Eu certamente não compraria este produto

Observação: \_\_\_\_\_

**Figura 4.6** - Ficha de avaliação sensorial pelo método da aceitação.

#### 4.3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados usando o software Statistic Analysis System (SAS) versão 7.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A análise de variância (ANOVA) foi usada para detectar a diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as amostras. Foi utilizado o teste de Tukey para determinar os valores médios significativos.

O desvio padrão para a determinação de carboidratos e valor energético foi obtido pela técnica da propagação do erro, segundo a equação 4.3.

$$\sigma_y^2 = \sum_{i=1}^n \left( \frac{\partial y}{\partial x_i} \right)^2 \sigma_{x_i}^2 \quad (4.3)$$

Em que:  $\sigma_y$  é o desvio padrão da função  $y$ ,  $\sigma_{x_i}$  é o desvio padrão da função  $x_i$ ,  $\partial y$  é a derivada parcial da variável  $y$  e  $\partial x_i$  é a derivada parcial da variável  $x_i$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e analisados os principais resultados obtidos durante o desenvolvimento do trabalho. A Tabela 5.1, orienta o leitor sobre a sequência de apresentação e discussão dos principais resultados obtidos, assim como o item da metodologia empregada para coleta dos dados.

**Tabela 5.1** – Disposição geral dos ensaios realizados

Ensaio realizado	Resultados e Discussão	Metodologia
• Aplicação do polímero impresso molecular e da matriz pura em coluna de adsorção no processo em batelada à temperatura ambiente.	5.1	4.2.1, 4.2.2
• Curva de remoção de colesterol no processo em batelada à temperatura ambiente	5.2	4.2.2
• Curva de remoção de colesterol no processo contínuo com temperatura controlada	5.3	4.2.3
• Curva de remoção e dessorção de colesterol no processo contínuo com temperatura controlada e com ampliação da escala da coluna de adsorção	5.4	4.2.4
• Curva de remoção de proteína do leite em processo contínuo com temperatura controlada utilizando adsorvente PIM ou MP.	5.5	4.2.3, 4.3.3
• Curva de ruptura para remoção do colesterol do leite em processo contínuo	5.6	4.2.3
• Caracterização do leite sem e com remoção parcial do colesterol.	5.7	4.3.2
• Análise sensorial de diferença de padrão, aceitação e intenção de compra para o leite sem e com remoção parcial de colesterol.	5.8	4.3.5
• Caracterização da bebida láctea utilizando leite, sem e com remoção parcial do colesterol sem adição de polpa de fruta.	5.9	4.3.2
• Caracterização da bebida láctea utilizando leite, sem e com remoção parcial do colesterol com adição de polpa de manga e siriguela.	5.10	4.3.2
• Teor de remoção do colesterol das bebidas lácteas fermentadas por grãos de kefir.	5.11	4.3.1
• Viscosidade das bebidas lácteas fermentadas por grãos de kefir.	5.12	4.3.3
• Análise microbiológica.	5.13	4.3.4
• Avaliação do potencial probiótico utilizando um simulador estômago-duodeno.	5.14	4.2.6
• Otimização do processo fermentativo utilizando biorreator de bancada.	5.15	4.2.5, 4.3.4
• Análise sensorial de aceitação e intenção de compra para a bebida láctea sem adição de polpa de fruta.	5.16	4.3.5
• Análise sensorial de aceitação e intenção de compra para a bebida láctea com adição de polpa de fruta.	5.17	4.3.5
• Proposta de adequação de Layout das instalações.	5.18	

## 5.1. APLICAÇÃO DO POLÍMERO IMPRESSO MOLECULAR E DA MATRIZ PURA EM COLUNA DE ADSORÇÃO NO PROCESSO EM BATELADA À TEMPERATURA AMBIENTE

O estudo da remoção de colesterol foi realizado utilizando coluna de adsorção recheada com adsorventes PIM ou MP, com partículas de granulometria de 60 mesh (0,250 mm) em diferentes alturas de leito (1, 2, 3, 4 e 5 cm). Inicialmente foram realizados estudos com solução sintética de colesterol e em seguida com leite tipo C. As Tabelas 5.2 e 5.3 apresentam os dados referentes à remoção de colesterol em coluna de leito fixo recheada por PIM utilizando solução sintética e leite, respectivamente. De forma geral, na literatura relata-se que a robustez do método cromatográfico para quantificação de diferentes compostos é avaliada a partir da influência de vários parâmetros analíticos em relação à área, tempo de retenção ou de residência, número de pratos teóricos relacionados ao comprimento da coluna, teor do composto de interesse, entre outros (UBHAYASEKERA *et al.*, 2004; CÉSAR e PIANETTI, 2009). Portanto, neste estudo de forma similar a quantificação de colesterol utilizou-se parâmetros analíticos com objetivo de avaliar a extração de colesterol de solução sintética e de leite. E observou-se que durante os experimentos preliminares, a vazão do eluente (solução sintética ou leite) diminuiu e o tempo de residência aumentou de acordo com a elevação da altura do leito da coluna de adsorção.

**Tabela 5.2** - Dados das colunas de adsorção utilizando PIM na granulometria de 60 mesh, utilizando solução sintética de colesterol.

Altura do Leito (cm)	Tempo de Percolação (s)	Vazão (mL/s)	Remoção de Colesterol (%)	Razão Altura: diâmetro
1	29	0,3448	30,38±1,30	1
2	65	0,1538	31,87±1,71	2
3	120	0,0833	49,21±0,95	3
4	140	0,0714	40,57±0,77	4
5	223	0,0448	33,96±0,11	5

\*Concentração inicial da solução sintética (1 g/L).

**Tabela 5.3** - Dados das coluna de adsorção utilizando PIM na granulometria de 60 mesh, utilizando leite.

<b>Altura do Leito (cm)</b>	<b>Tempo de Percolação (s)</b>	<b>Vazão (mL/s)</b>	<b>Remoção de Colesterol (%)</b>	<b>Razão Altura: diâmetro</b>
1	12	0,8333	60,22±0,11	1
2	73	0,1369	64,50±0,10	2
3	50	0,2000	78,56±0,25	3
4	52	0,1923	67,00±0,15	4
5	294	0,0340	52,24±0,26	5

\*Concentração inicial do leite (120 mg/L).

O mesmo perfil foi observado quando empregamos o adsorvente MP como recheio do leito da coluna, como apresenta as Tabelas 5.4 e 5.5 utilizando solução sintética e leite respectivamente.

**Tabela 5.4** - Dados das coluna de adsorção utilizando MP na granulometria de 60 mesh, utilizando solução sintética de colesterol.

<b>Altura do Leito (cm)</b>	<b>Tempo de Percolação (s)</b>	<b>Vazão (mL/s)</b>	<b>Remoção de Colesterol (%)</b>	<b>Razão Altura: diâmetro</b>
1	22	0,4545	49,22±1,52	1
2	28	0,3571	56,07±2,10	2
3	90	0,1111	48,17±0,89	3
4	94	0,1064	58,52±2,13	4
5	96	0,1042	37,46±1,05	5

\*Concentração inicial da solução sintética (1 g/L).

**Tabela 5.5** - Dados das coluna de adsorção utilizando MP na granulometria de 60 mesh, utilizando leite.

<b>Altura do Leito (cm)</b>	<b>Tempo de Percolação (s)</b>	<b>Vazão (mL/s)</b>	<b>Remoção de Colesterol (%)</b>	<b>Razão Altura: diâmetro</b>
1	32	0,3125	59,87±0,17	1
2	46	0,2173	70,29±0,12	2
3	50	0,2000	82,38±0,11	3
4	58	0,1724	61,49±0,15	4
5	64	0,1562	67,99±0,05	5

\*Concentração inicial do leite (120 mg/L).

As tabelas 5.6 e 5.7 apresentam os valores referentes à dessorção do colesterol contido no adsorvente PIM quando utilizamos como fluido a solução sintética e o leite respectivamente.

**Tabela 5.6** - Dados das colunas de dessorção utilizando PIM na granulometria de 60 mesh, utilizando solução sintética de colesterol.

<b>Altura do Leito (cm)</b>	<b>Tempo de Percolação (s)</b>	<b>Vazão (mL/s)</b>	<b>Remoção de Colesterol (%)</b>	<b>Razão Altura: diâmetro</b>
1	21	0,4761	65,25±3,42	1
2	57	0,1754	73,09±6,18	2
3	117	0,0854	89,71±6,40	3
4	132	0,0758	79,09±6,00	4
5	211	0,0474	65,52±2,56	5

\*Concentração inicial da solução sintética (1 g/L).

**Tabela 5.7** - Dados das colunas de dessorção utilizando PIM na granulometria de 60 mesh, utilizando leite.

<b>Altura do Leito (cm)</b>	<b>Tempo de Percolação (s)</b>	<b>Vazão (mL/s)</b>	<b>Remoção de Colesterol (%)</b>	<b>Razão Altura: diâmetro</b>
1	10	1,000	37,76±0,10	1
2	21	0,4761	49,94±0,21	2
3	28	0,3571	47,42±0,23	3
4	32	0,3125	43,34±0,16	4
5	190	0,0917	48,56±0,08	5

\*Concentração inicial do leite (120 mg/L).

Com relação às tabelas 5.8 e 5.9, apresentam os valores referentes à dessorção do colesterol removido pelo adsorvente MP. Quando comparamos os valores encontrados na dessorção, com os encontrados na remoção para os parâmetros (vazão e tempo de retenção), observa-se um comportamento similar, quando variamos a altura do leito da coluna de adsorção.

**Tabela 5.8** - Dados das colunas de dessorção utilizando MP na granulometria de 60 mesh, utilizando solução sintética de colesterol.

Altura do Leito (cm)	Tempo de Percolação (s)	Vazão (mL/s)	Remoção de Colesterol (%)	Razão Altura: diâmetro
1	18	0,5555	40,23±2,88	1
2	25	0,4000	61,14±0,49	2
3	83	0,1204	67,00±5,05	3
4	89	0,1124	62,46±0,14	4
5	91	0,1098	57,11±1,77	5

\*Concentração inicial da solução sintética (1 g/L).

**Tabela 5.9** - Dados das colunas de dessorção utilizando MP na granulometria de 60 mesh, utilizando leite.

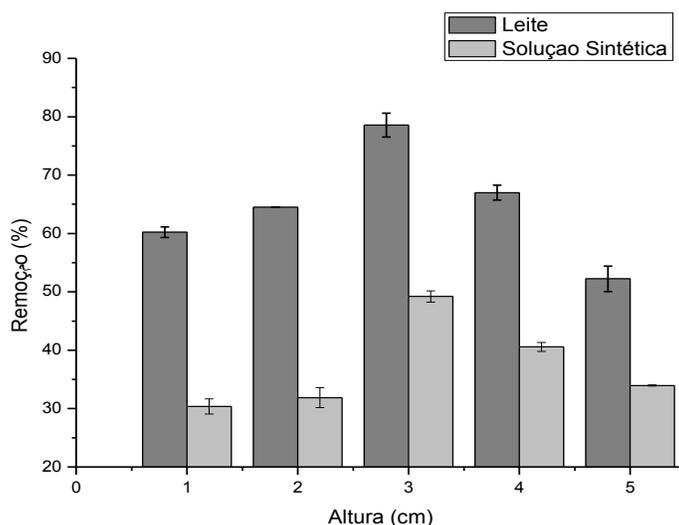
Altura do Leito (cm)	Tempo de Percolação (s)	Vazão (mL/s)	Remoção de Colesterol (%)	Razão Altura: diâmetro
1	32	0,3125	29,96±0,03	1
2	46	0,2173	54,92±0,15	2
3	46	0,2173	34,20±0,09	3
4	58	0,1724	30,47±0,07	4
5	64	0,1562	29,28±0,04	5

\*Concentração inicial do leite (120 mg/L).

Observa-se na Figura 5.1 que a melhor remoção de colesterol, cerca de 49% na solução sintética ocorreu utilizando leito com 3 cm de altura, quando substituímos o fluido para o leite, a maior remoção foi também com altura de 3 cm e cerca de 78%.

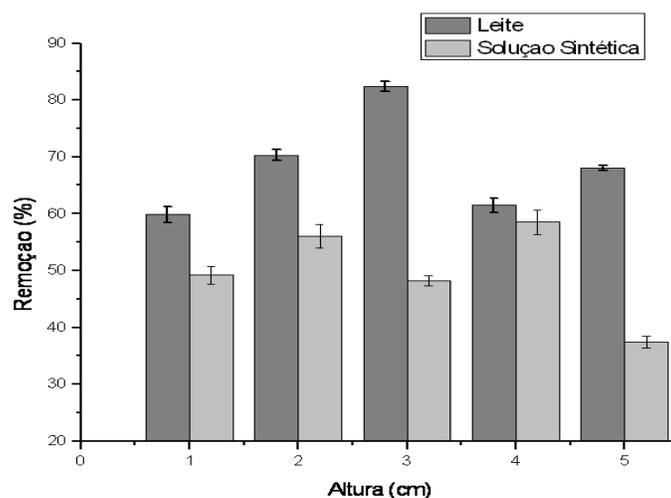
Os melhores resultados obtidos na remoção de leite utilizando a técnica de impressão molecular neste trabalho para remoção de colesterol foram superiores ao descrito por UBHAYASEKERA *et al.* (2004) onde estudou-se o uso da cromatografia gasosa e de massas associados a saponificação ou esterificação para a determinação de colesterol em solução sintética devido a indisponibilidade de métodos padrões. Dentre os métodos testados verificou-se que o maior nível de recuperação de colesterol foi de 60% obtidos após a saponificação e determinação em CG.

De acordo com HAN *et al.* (2007) conseguiram remover cerca de 90,7% de colesterol na nata do leite empregando  $\beta$ -ciclodextrina, usando como agente de reticulação o ácido adípico no processo em batelada.



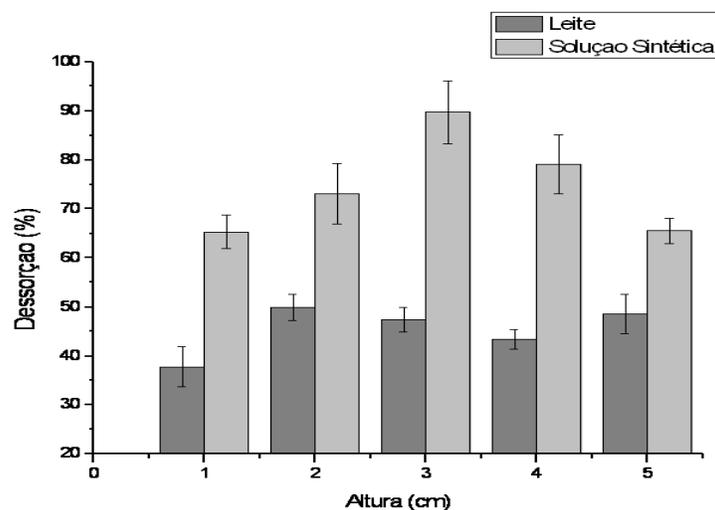
**Figura 5.1** - Remoção do colesterol em coluna de adsorção utilizando PIM com granulometria de 60 mesh em diferentes alturas do leito.

Na Figura 5.2 pode-se observar que a melhor remoção de colesterol, foi cerca de 58% na solução sintética no leito de 4 cm de altura. Com a substituição do fluido para o leite, observou-se uma diminuição da altura do leito da coluna (4 para 3 cm) e uma remoção de 82%. Provavelmente, devido ao aumento da quantidade de sólidos suspensos do leite foi observada a diminuição da altura do leito de adsorção. De acordo com estudos realizados por FERREIRA *et al.* (2007) utilizando a metodologia de complexação com adição de beta-ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e com a formação do complexo colesterol- $\beta$ -CD a remoção máxima do colesterol da manteiga foi de 88%. A dosagem do colesterol foi determinada por método colorimétrico.



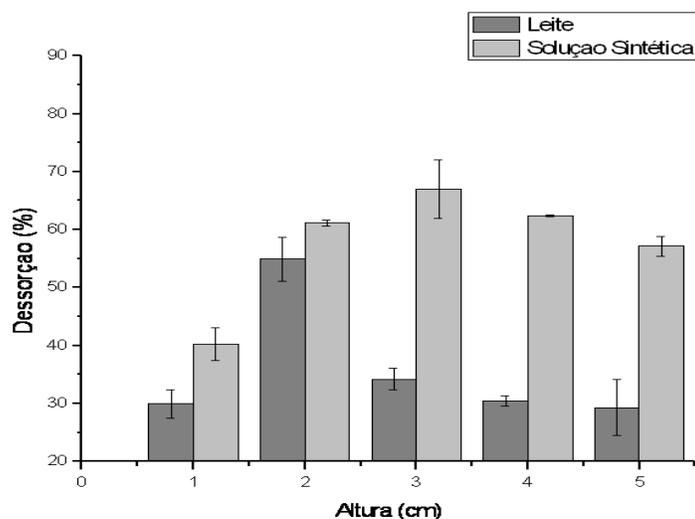
**Figura 5.2-** Remoção do colesterol em coluna de adsorção utilizando MP com granulometria de 60 mesh em diferentes alturas do leito.

A Figura 5.3 mostra que a dessorção do colesterol na coluna recheada com partículas de PIM utilizando a solução sintética apresentou uma melhor dessorção com valores superiores a 89% com altura do leito de 3 cm, no entanto, para a coluna utilizando o leite a melhor dessorção foi de 49% para uma altura do leito de 2 cm e 47% para altura de 3 cm



**Figura 5.3 -** Dessorção do colesterol em coluna de adsorção utilizando PIM com granulometria de 60 mesh em diferentes alturas do leito.

A Figura 5.4 mostra que para dessorção do colesterol na coluna recheada com partículas de MP utilizando a solução sintética apresentou uma melhor remoção com valores superiores a 67% com altura do leito de 3 cm, no entanto, para a coluna utilizando o leite a melhor dessorção foi de 54% para uma altura de 2 cm e 34% para altura de 3 cm. Segundo QUEIROZ *et al.* (2001), o mecanismo de separação na extração em fase sólida é baseado em uma combinação de exclusão e partição. As moléculas, tais como colesterol são parcialmente retidas nos poros e eluem rapidamente quando utilizada a técnica de dessorção.



**Figura 5.4** - Dessorção do colesterol em coluna de adsorção utilizando MP com granulometria de 60 mesh em diferentes alturas do leito.

A eficiência do método depende de uma série de fatores os quais serão observados neste trabalho tais como fluxo contínuo, vazão e temperatura.

Os parâmetros selecionados basearam-se na literatura onde se obteve 76,5 mg de colesterol por g de adsorvente PIM utilizando da matriz  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e 251 mg de colesterol por g de adsorvente MP, no tempo de retenção de 24 h, na temperatura de 25°C em regime batelada, utilizando solução sintética de colesterol a partir das isotermas de Langmuir e Freundlich (SOARES *et al.*, 2007).

Por fim os parâmetros de adsorção para solução sintética de colesterol utilizando os tipos de adsorventes foram avaliados em trabalhos anteriores deste grupo de pesquisa em reator em batelada e também estes parâmetros foram determinados utilizando diferentes adsorventes de colesterol, conforme mostra a Tabela 5.10.

**Tabela 5.10** - Comparação da eficiência de remoção de colesterol utilizando diferentes adsorventes.

Adsorvente	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Remoção de Colesterol (mg/g de sólido)
Alumina/CO <sub>2</sub> *	4	40	2,4
Terpolímeros*	24	37	17
Quitosana/ $\beta$ -D*	0,5	25	330
MP**	24	25	251
PIM/ $\beta$ -CD**	24	25	76,5

Fonte: \*CHIU *et al.*, 2006 e \*\*SOARES *et al.*, 2007.

Com relação aos dados obtidos neste estudo foram de 227 mg de colesterol por g de adsorvente PIM utilizando a molécula molde de colesterol e 238 mg de colesterol por g de adsorvente MP, no tempo de 1 h, na temperatura de 25°C em batelada, utilizando como fluido o leite. Com relação à dessorção o PIM apresentou maior eficiência quando comparado com a MP, para altura de 3 cm de leito.

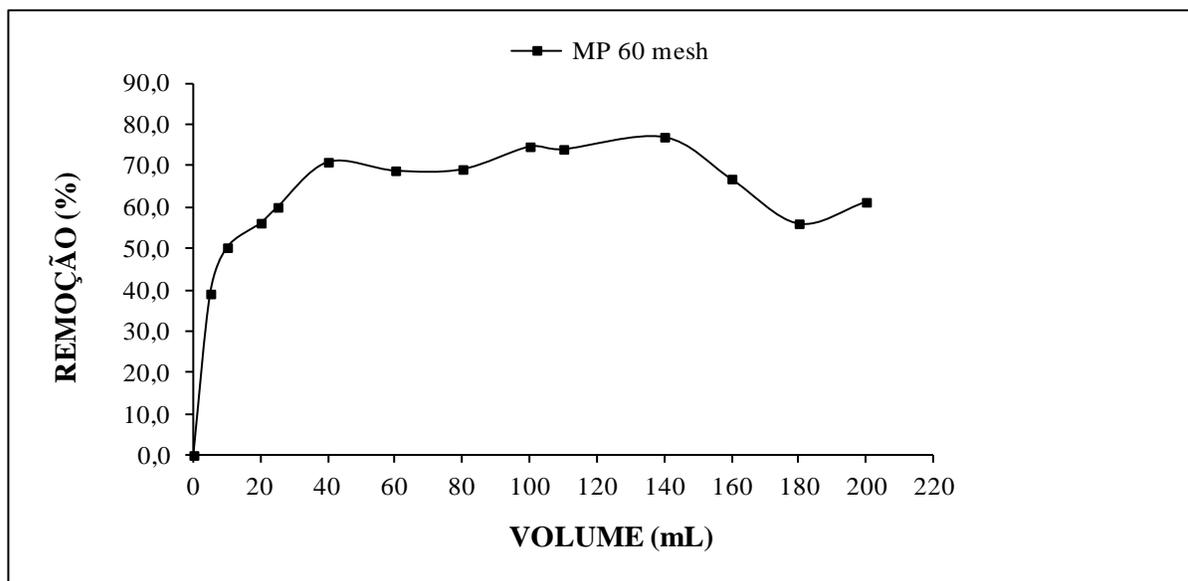
Com base nesta avaliação prévia foram determinadas as condições de aplicação do leito fixo para remoção ou dessorção do colesterol em fluxo contínuo. Assim, foi considerado que a melhor condição para a remoção e dessorção de colesterol do leite foi de 3 cm de altura.

A aplicação de polímeros impressos molecularmente em colunas de HPLC é relatada na literatura, contudo não foi verificada a avaliação da altura destas colunas de adsorção com a finalidade de aplicação em processo industrial nos trabalhos disponíveis na literatura. Entretanto, estudos para diferentes aplicações estabelecem os parâmetros de adsorção de Langmuir e Freundlich para a solução sintética de colesterol (SOARES *et al.*, 2007), fluoroquinolonas (ZHENG *et al.*, 2010), uridina (LIU *et al.*, 2012), entre outros.

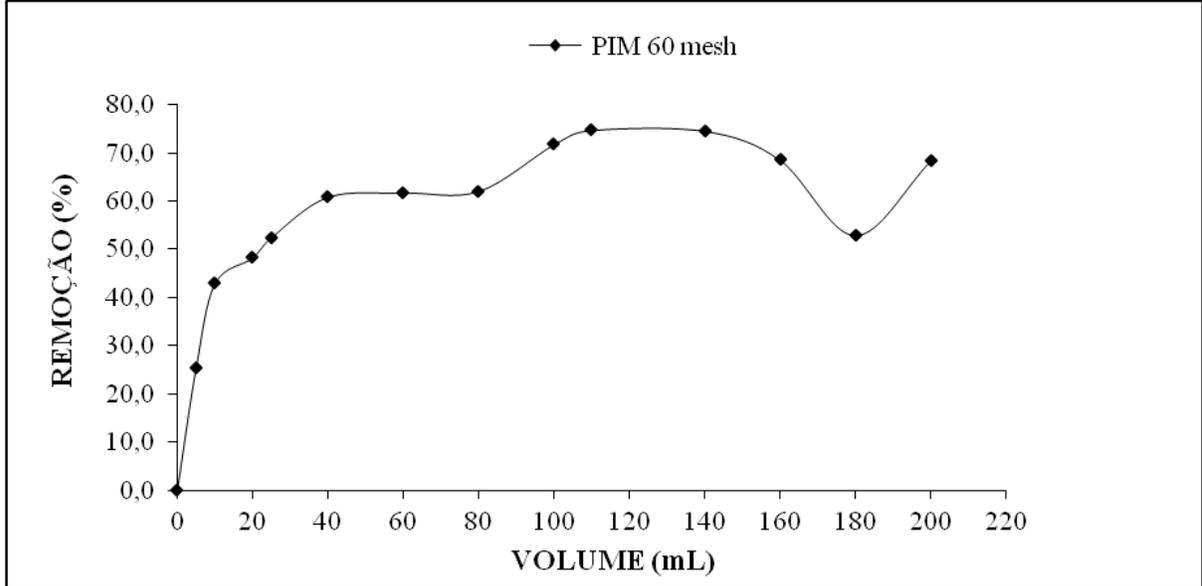
## 5.2. CURVA DE REMOÇÃO DE COLESTEROL NO PROCESSO EM BATELADA A TEMPERATURA AMBIENTE

As curvas de remoção de colesterol foram obtidas para avaliar a remoção parcial de colesterol do leite no processo em batelada na melhor condição utilizando a coluna de recheio com altura do leito de 3 cm e as demais condições das etapas descritas no item 4.2.2.

As Figuras 5.5 e 5.6 representam a curva de remoção de colesterol do leite utilizando coluna de vidro cromatográfica nas condições citadas anteriormente. Observou-se que tanto para a matriz pura (MP) como para o polímero com impressão molecular (PIM), as curvas apresentaram uma similaridade no comportamento da remoção de colesterol. Ocorrendo um aumento da remoção até um volume de 140 mL, e após esse volume até 200 mL apresentou uma diminuição, entretanto, quando adicionamos mais volume, observou-se que a remoção começou a aumentar. Este fato possivelmente deve-se ao aumento da quantidade de sólidos suspensos do leite que forma uma película sobre a sílica, dificultando assim a remoção, e quando essa película se desprende começa a aumentar a remoção.



**Figura 5.5** - Curva de remoção de colesterol do leite no leito de 3 cm de altura utilizando Matriz Pura (MP).



**Figura 5.6** - Curva de remoção de colesterol do leite no leito de 3 cm de altura utilizando Polímero com Impressão Molecular (PIM).

Segundo a literatura, além da proteína o monômero de colesterol no polímero impresso molecularmente pode interagir com a molécula de colesterol de uma forma semelhante promovendo a saturação do polímero para a adsorção seletiva da ligação de colesterol para a solução sintética (SELLERGREN *et al.*, 1998 e WYBRANÓSKA *et al.*, 2008). Portanto, para uma melhor avaliação a curva de remoção de colesterol também foi estudada quanto a variação da vazão do leite à temperatura controlada.

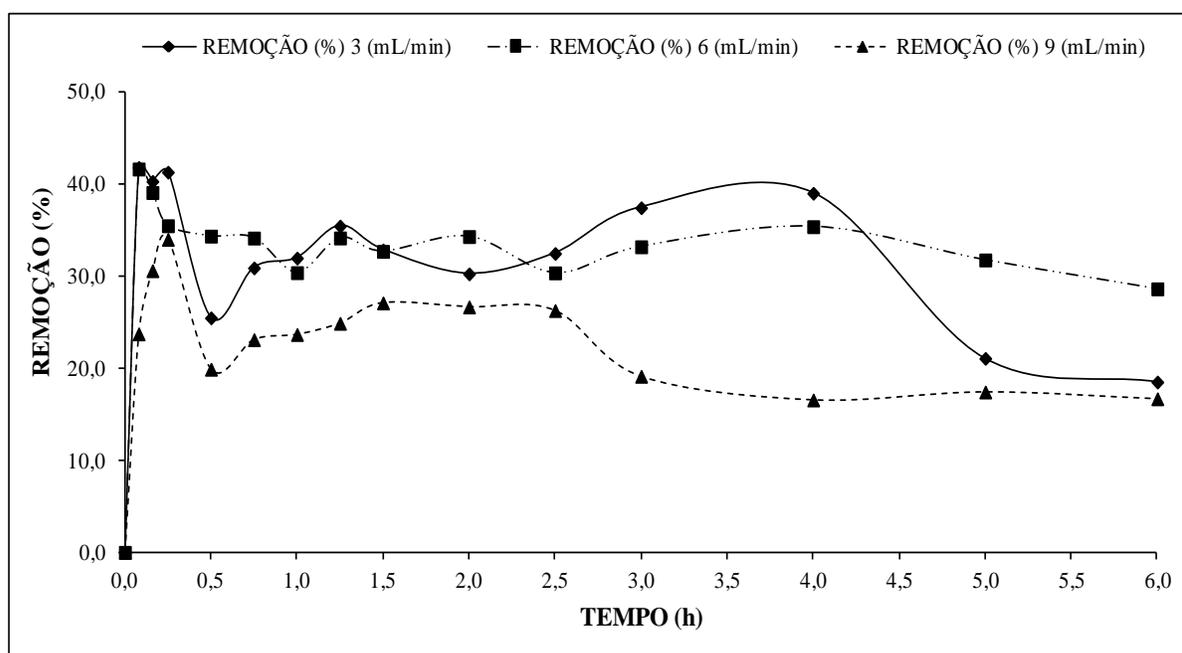
### 5.3. CURVA DE REMOÇÃO DE COLESTEROL NO PROCESSO DE FLUXO CONTÍNUO COM TEMPERATURA CONTROLADA

Na literatura não foram encontrados estudos relatando a remoção de colesterol do leite em coluna de adsorção. Portanto, nesta etapa serão apresentados os resultados e sua conclusão sem a comparação com estudos anteriores.

A temperatura controlada na faixa de 40 a 45°C foi determinada em estudos anteriores para a remoção de colesterol da nata de leite usando  $\beta$ -ciclodextrina (HAN *et al.*, 2007), e neste estudo foi estabelecido a temperatura de 42°C (valor utilizado nos laticínios).

As Figuras 5.7, 5.8 e 5.9 apresentam as curvas de remoção de colesterol do leite utilizando como adsorvente matriz pura (MP) com granulometria de 60 mesh (0,250 mm) em leitos com altura de 1, 2 ou 3 cm, e vazões de 3, 6 ou 9 mL/min, em 6 h de teste. As demais etapas foram apresentadas no item 4.2.4.

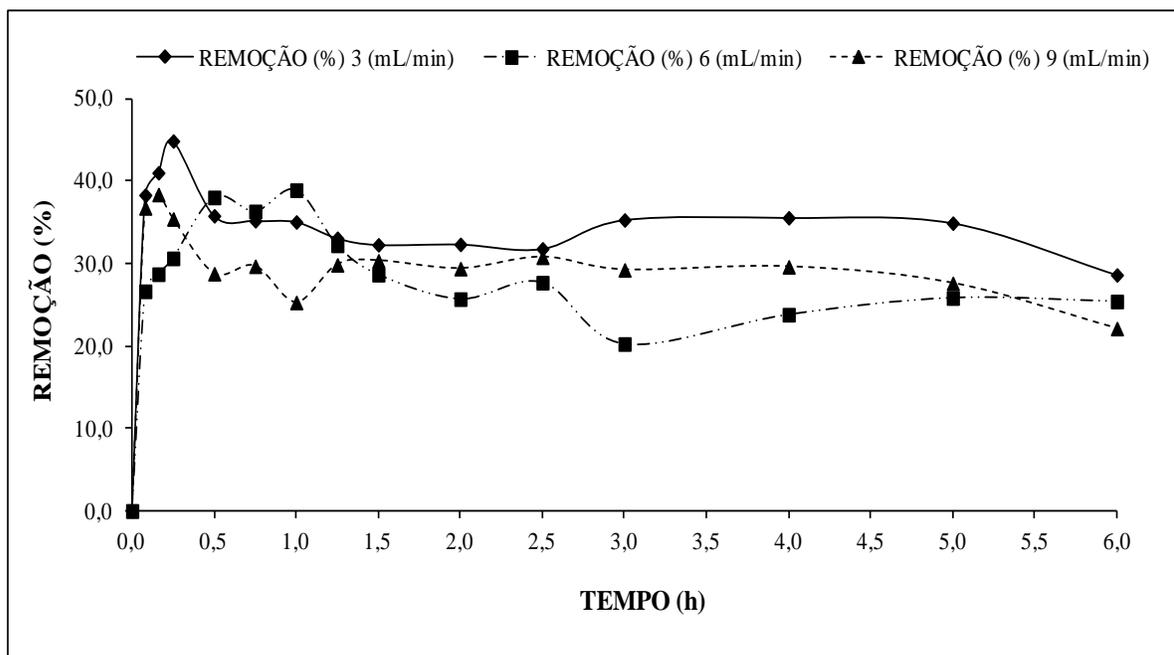
Observa-se na Figura 5.7 que houve uma maior remoção nas três vazões no tempo de 0,25 h de percolação do leite na coluna. Nas vazões 3 ou 6 mL/min ocorreu um perfil constante na remoção de colesterol com média de 36% de remoção, enquanto que na vazão de 9 mL/min houve uma remoção inferior a 30% a partir do tempo de 0,5 h. Entretanto, a partir de 4 h existiu queda da remoção nas vazões de 3 e 6 mL/min e em seguida houve uma constante na remoção.



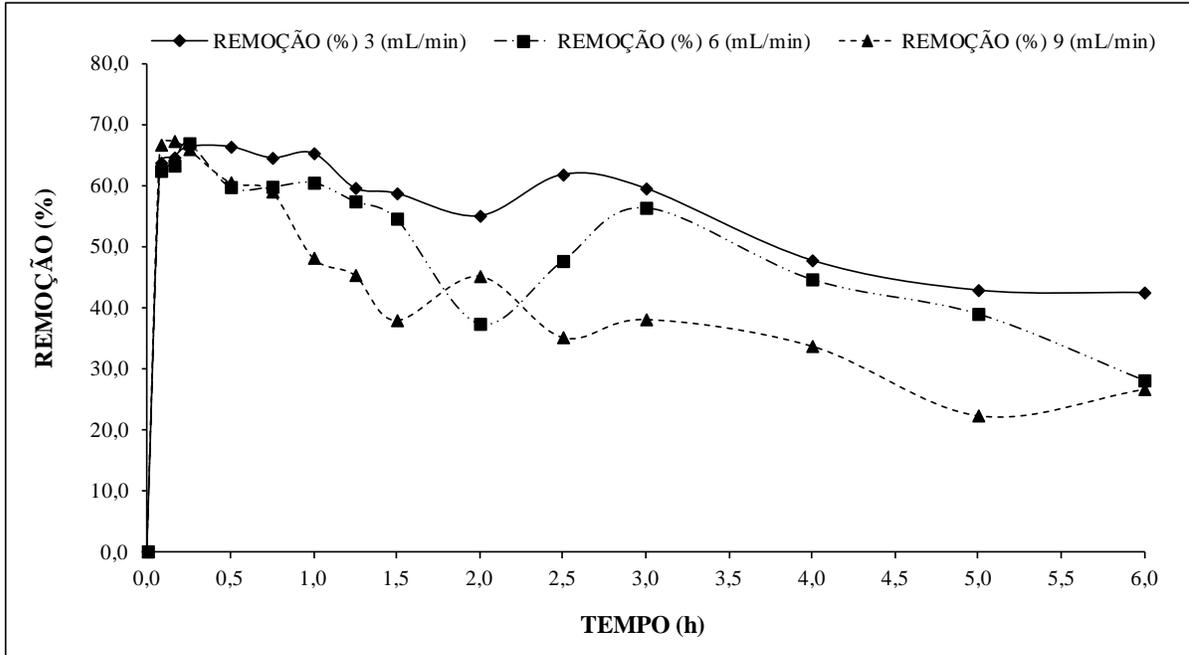
**Figura 5.7** - Curva de remoção de colesterol do leite no leito recheado de adsorvente MP na altura de 1 cm em diferentes vazões.

A Figura 5.8 apresenta um pico na remoção de colesterol do leite em 0,25 h nas vazões 3 e 9 mL/min, a partir do tempo de 1,5 h a remoção manteve-se constante para essas vazões, em torno de 35%, ocorrendo uma redução após 5 h de processo. No entanto, na vazão de 6 mL/min o maior pico de remoção ocorreu entre 0,5 e 1 h com média de 40%, a partir deste ponto a remoção diminuiu e ficou com uma média inferior a 30% mantendo-se constante até 6 h.

Com relação à Figura 5.9 a vazão que apresentou a maior remoção foi 3 mL/min acima de 60% durante o tempo de 3 h de percolação, a partir desse tempo ocorre um declínio na remoção, permanecendo uma média de 52%. Enquanto que nas vazões de 6 e 9 mL/min a maior remoção ocorreu para 0,25 h com 64% em 0,5 h, após esse tempo ocorreu uma oscilação decrescente até o tempo de 6 h.



**Figura 5.8** - Curva de remoção de colesterol do leite no leite recheado de adsorvente MP na altura de 2 cm em diferentes vazões.

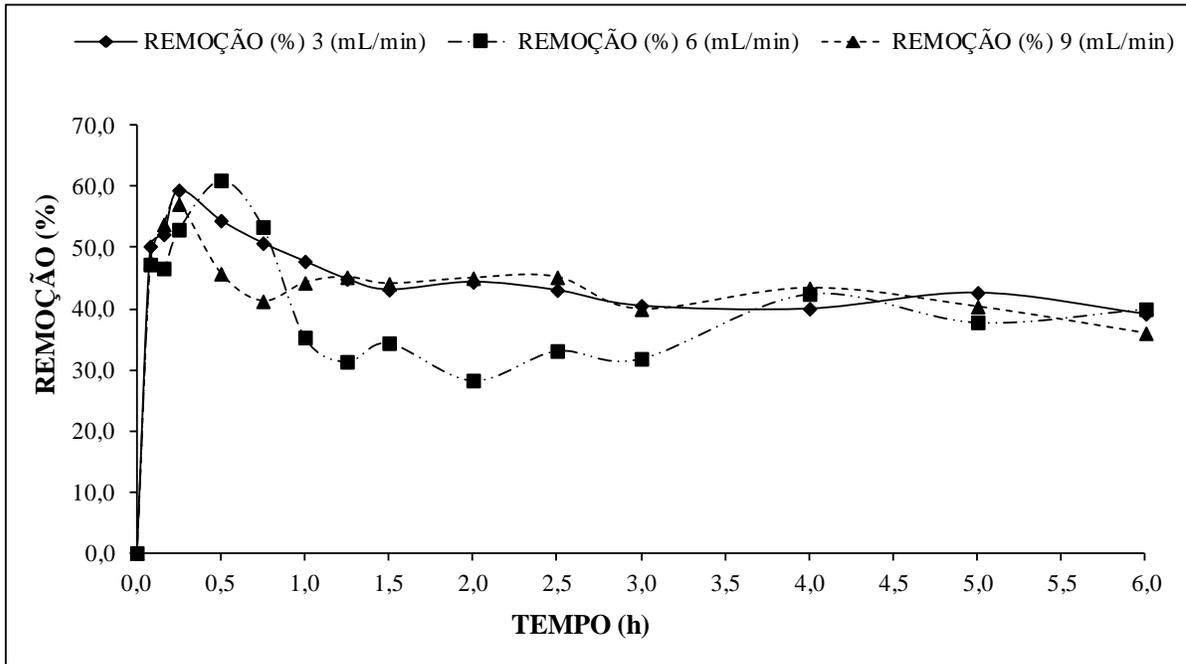


**Figura 5.9** - Curva de remoção de colesterol do leite no leito recheado de adsorvente MP na altura de 3 cm em diferentes vazões.

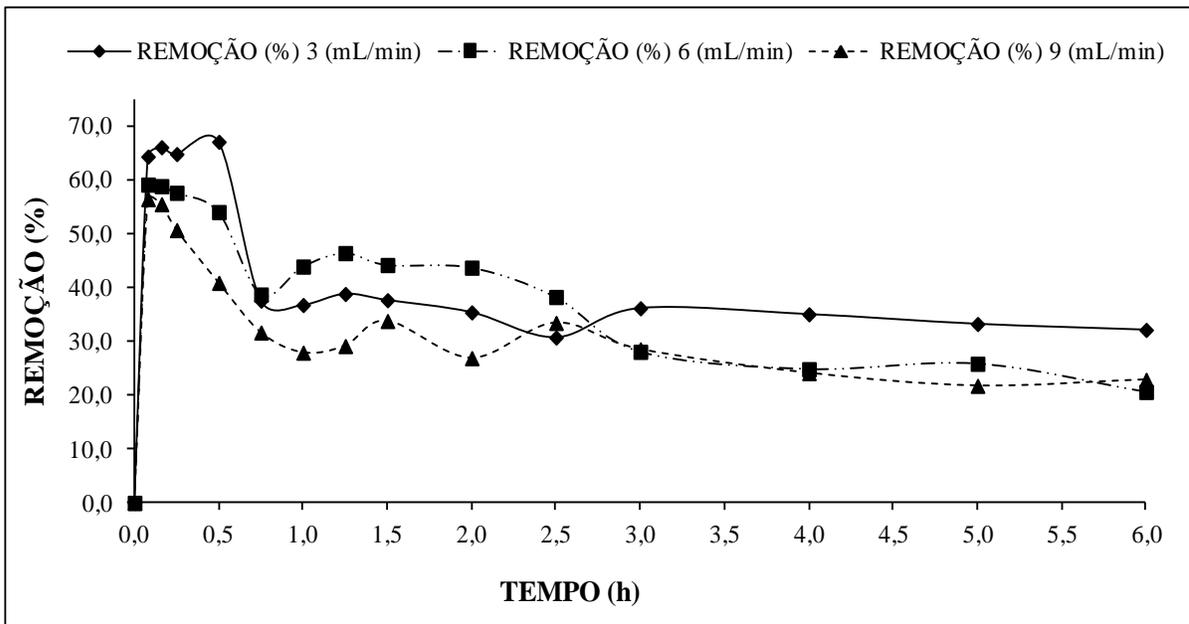
As curvas de remoção de colesterol utilizando o polímero com impressão molecular (PIM) como adsorvente nas mesmas condições acima citadas estão representadas por meio das Figuras 5.10, 5.11 e 5.12.

Pode-se observar na Figura 5.10 que ocorreu um pico no tempo de 0,25 h para as três vazões. Após o tempo de 1 h apresentou uma remoção constante com média de 44% para o tempo de 1 a 6 h no processo de remoção para as vazões de 3 e 9 mL/min. Porém nota-se que na vazão de 6 mL/min houve um declínio na remoção entre 1 e 3 h. A partir desse ponto ocorreu um aumento na remoção, apresentando uma similaridade com as demais vazões até o término de 6 h.

A Figura 5.11 mostra que nas vazões de 3, 6 e 9 mL/min a maior remoção foi de 69, 60 e 58% respectivamente em 0,25 h de percolação do leite pela coluna, após esse tempo ocorreu um decréscimo nas três vazões durante o processo com o tempo de 6 h. No entanto, a vazão de 3 mL/min apresentou uma maior remoção depois de 3 h em relação as outras vazões.

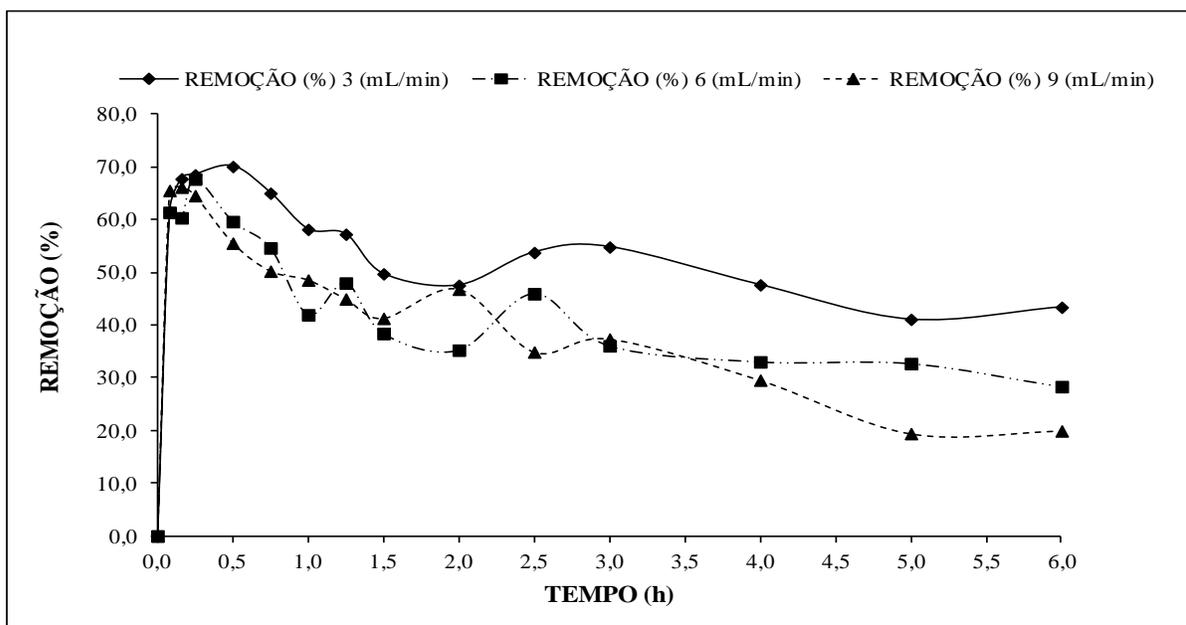


**Figura 5.10** - Curva de remoção de colesterol do leite no leito recheado de adsorvente PIM na altura de 1 cm em diferentes vazões.



**Figura 5.11** - Curva de remoção de colesterol do leite no leito recheado de adsorvente PIM na altura de 2 cm em diferentes vazões.

A Figura 5.12 mostra as curvas de remoção de colesterol no leito de 3 cm de altura onde as vazões apresentaram a maior remoção no tempo de 0,25 h com 69% e posteriormente um decréscimo até 6 h. Observa-se que a vazão de 3 mL/min apresentou uma remoção superior as demais durante todo o tempo de percolação do leite que foi de 6 h, obteve uma variação na remoção de colesterol em torno de 69 a 52%, durante o processo.



**Figura 5.12** - Curva de remoção de colesterol do leite no leito recheado de adsorvente PIM na altura de 3 cm em diferentes vazões.

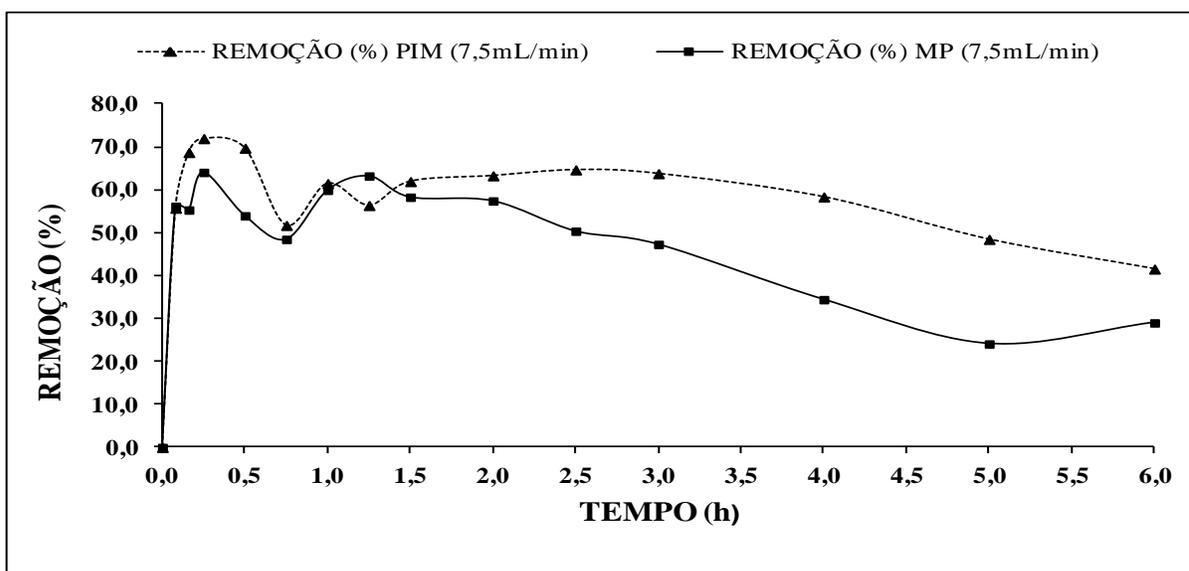
Como foi apresentado anteriormente e pode-se verificar nas curvas de remoção de colesterol das Figuras 5.7 a 5.12, a variação na remoção do colesterol do leite durante o processo, possivelmente deve-se a formação de uma película composta de sólidos solúveis sobre a sílica, dificultando a remoção devido a película de proteína ou mesmo a interação da molécula de colesterol de uma forma semelhante promovendo a saturação do polímero para a adsorção seletiva da ligação de colesterol para a solução sintética (SELLERGREN *et al.*, 1998 e WYBRAŃSKA *et al.*, 2008).

Portanto, por meio dos resultados obtidos, a melhor condição de remoção do colesterol do leite foi de 3 cm de altura de leito e vazão de 3 mL/min para o adsorvente PIM ou MP.

Para efeito comparativo deste estudo, podemos citar que a literatura relata a extração de olaquinox do frango por extração utilizando os polímeros molecularmente impressos como materiais de fase sólida. Os polímeros foram preparados usando olaquinox como o modelo do ácido metacrílico utilizado como o monômero funcional, e dimetacrilato de etileno glicol como o agente de ligação cruzada. O material impresso foi caracterizado por experiências estáticas e cinéticas de adsorção. Na curva de remoção utilizando a adsorção estática foi verificado que a capacidade de adsorção foi de 62,7% após 30 min, 86,2% em 60 min e atingiu o equilíbrio em 120 min. De acordo com os autores as rápidas cinéticas de adsorção do adsorvente impresso é uma vantagem óbvia para a sua aplicação na extração em fase sólida de dispersão (ZHANG *et al.*, 2012).

#### **5.4. CURVA DE REMOÇÃO E DESSORÇÃO DE COLESTEROL NO PROCESSO DE FLUXO CONTÍNUO COM TEMPERATURA CONTROLADA, E COM AMPLIAÇÃO DA ESCALA DA COLUNA DE ADSORÇÃO**

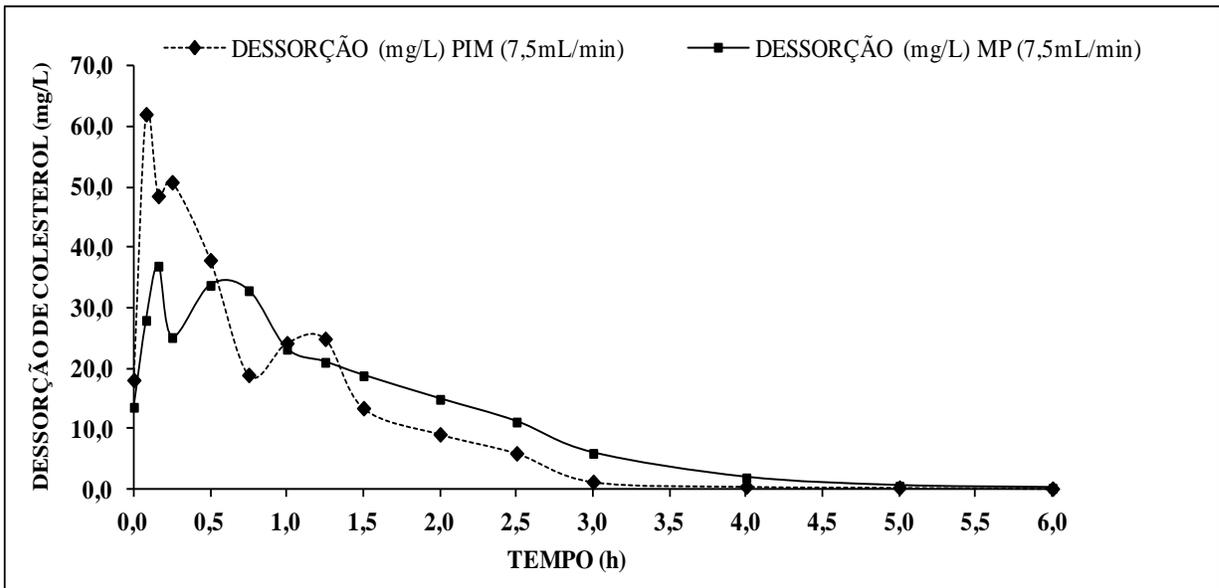
A Figura 5.13 apresenta as curvas de remoção de colesterol do leite utilizando como leito o polímero impresso molecularmente (PIM) e matriz pura (MP) com granulometria de 60 mesh (0,250 mm), ampliando a escala da coluna de vidro encamisada para 7,5 cm de altura do leito e da vazão para 7,5 mL/min. As demais condições foram apresentadas no item 4.2.5. Observa-se que a maior remoção de colesterol ocorreu utilizando o PIM como adsorvente no recheio da coluna, atingindo 51% em 6 h. Enquanto na presença do adsorvente MP, conseguimos uma remoção de 32% no final do mesmo período.



**Figura 5.13** - Curva de remoção de colesterol do leite no leito com altura de 7,5 cm, utilizando adsorvente PIM ou MP.

A Figura 5.14 mostra as curvas de dessorção de colesterol no leito em coluna com 7,5 cm de altura e com vazão de 7,5 mL/min. Observa-se que na curva representada pelo polímero impresso molecularmente (PIM) o tempo máximo para que ocorra a dessorção do colesterol foi cerca de 3 h (a quantidade mínima de 1350 mL de solução de dessorção para a eluição total de colesterol), com relação a curva da matriz pura (MP) esse tempo foi de aproximadamente 5 h (a quantidade mínima de 2250 mL de solução de dessorção para a eluição total de colesterol).

Desta forma, por meio dos resultados obtidos, conclui-se que o polímero impresso molecular (PIM) foi o que apresentou uma maior remoção de colesterol do leite e proporcionou um dessorção do colesterol do leite em menor tempo.



**Figura 5.14** - Curva de dessorção de colesterol no leito com altura de 7,5 cm, utilizando adsorvente PIM ou MP.

A fim de testar o efeito da quantidade de eluente em outra molécula alvo e outra técnica de elaboração dos polímeros impressos molecularmente, estudo recente relatado na literatura realizou uma série experiência que delinearão a quantidade de metanol para a eluição total de olaquinox (ZHANG *et al.*, 2012). Similar ao realizado neste estudo para a molécula de colesterol com etanol aquecido à 50°C.

### **5.5. CURVA DE REMOÇÃO DA PROTEÍNA DO LEITE EM PROCESSO DE FLUXO CONTÍNUO COM TEMPERATURA CONTROLADA UTILIZANDO ADSORVENTE PIM OU MP**

A Figura 5.15 apresenta as curvas de proteína do leite após a remoção parcial do colesterol, utilizando a melhor condição citada anteriormente no item 5.3, empregando como adsorvente o polímero impresso molecularmente (PIM) ou a matriz pura (MP). Observa-se que o leite antes de percolar a coluna recheada de adsorvente apresenta cerca de 3,8% de proteína, durante o processo esse teor de proteína tende a diminuir. Segundo a literatura, o leite de vaca,

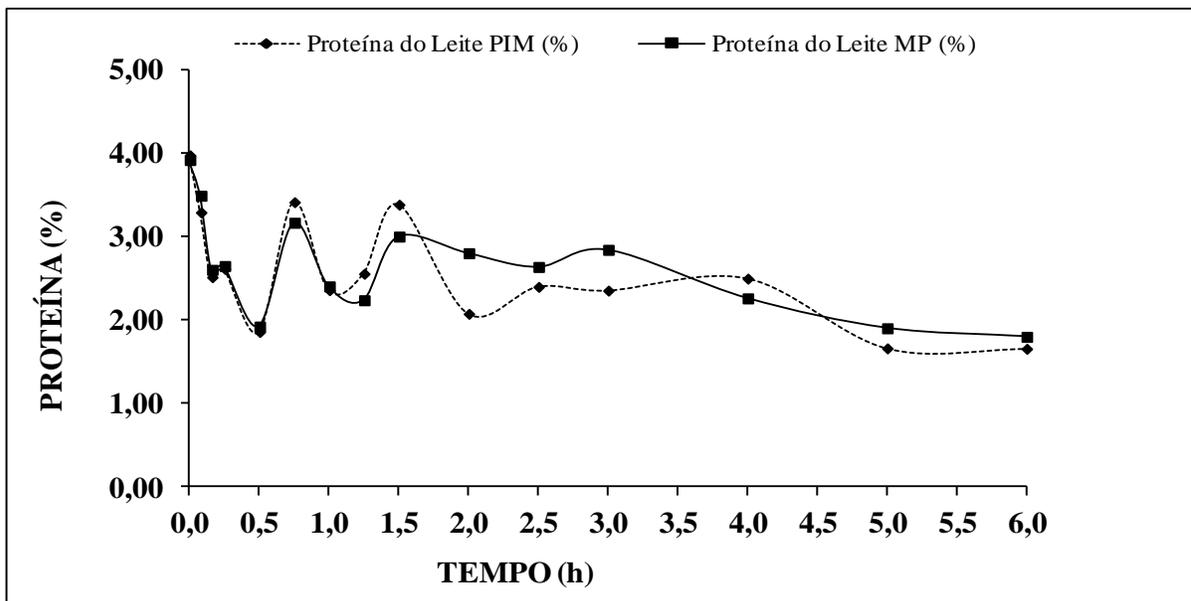
é composto de água com cerca de 87,3%, e 12,7% sólidos totais assim distribuídos: 3,3 a 4,10% de proteínas totais, 3,4 a 3,8% de gordura; 4,9% de lactose, além de 0,7% minerais e vitaminas (SGARBIERI, 2005; LEONARDI *et al.*, 2011).

Neste estudo nas primeiras 2 h do estudo da adsorção da proteína nos adsorventes avaliados apresentaram uma faixa de variação de 2,07 a 3,40% de proteína, após esse período verificou-se a manutenção de cerca de 50% do percentual da proteína inicial até o final do processo.

Esse comportamento confirma que os adsorventes utilizados não removem apenas o colesterol mais efetivamente, mas em menores proporções os outros constituintes do leite como proteína, lipídeos e minerais. Porém, o adsorvente PIM removeu mais proteína quando comparado com MP.

Deve-se ressaltar que a massa molar do colesterol é de aproximadamente 386,65 g/mol e da principal proteína do leite é de 23,5 a 24 g/mol (SGARBIERI, 2005; SMIDDY *et al.*, 2012).

Portanto, se o mecanismo de separação é baseado em uma combinação de exclusão e partição, as moléculas grandes tais como proteínas no caso PIM, possivelmente conseguiram penetrar parcialmente nos poros do adsorvente induzidos para a molécula de colesterol as quais possuem massa molecular maior. Contudo, mais de 50% das proteínas foram eluídas rapidamente durante a continuidade do processo de remoção de colesterol do leite (Figura 5.15) e este fenômeno deve-se provavelmente ao tipo de aprisionamento destas proteínas. Já para o colesterol cujo aprisionamento foi mais efetivo, cerca de 50 a 70% das moléculas de colesterol entram nos poros e foram retidas (Figura 5.13), e somente após posterior eluição na etapa de dessorção que o colesterol foi recuperado (Figura 5.14).

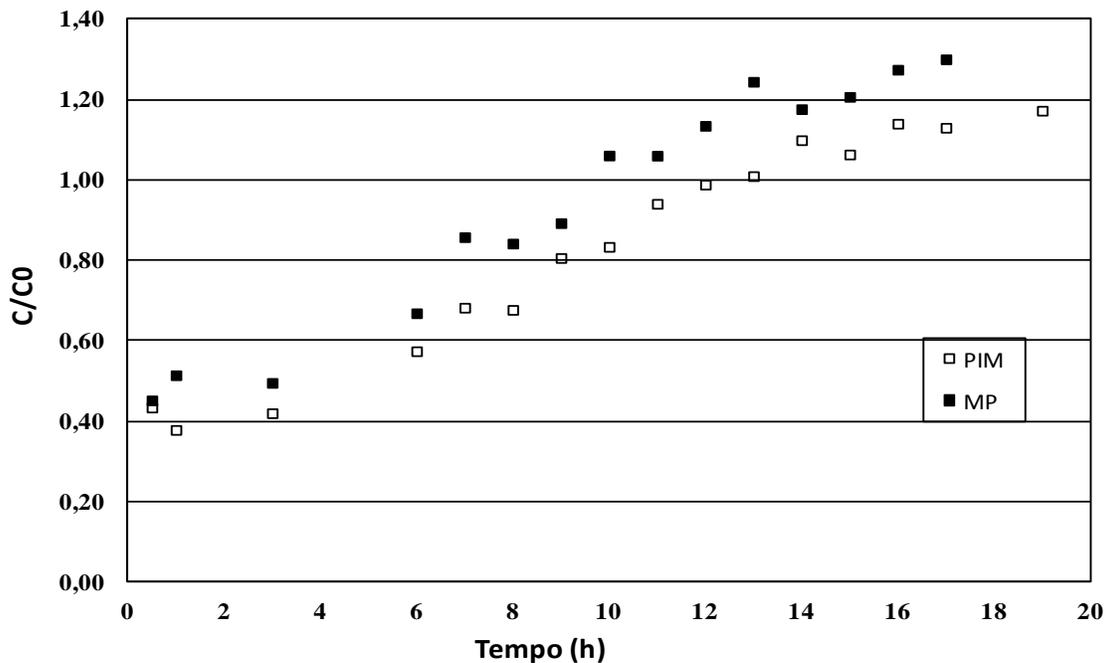


**Figura 5.15** - Curva de remoção da proteína do leite no leito com 3 cm de altura e vazão de 3 mL/min, utilizando adsorvente PIM ou MP.

## 5.6. CURVA DE RUPTURA PARA REMOÇÃO DO COLESTEROL DO LEITE EM PROCESSO DE FLUXO CONTÍNUO

As curvas de ruptura para remoção de colesterol do leite em colunas de leito fixo recheadas pelos adsorventes denominados de polímeros puros (MP) e polímeros com impressão molecular (PIM) são apresentadas na Figura 5.16.

Como pode ser observado na Figura 5.16, as curvas de ruptura tanto para PIM como para MP, tiveram uma característica atípica da descrita na literatura (MCCABE *et al.*, 2001). A relação  $C/C_0$  começou em 0,4, e passou da unidade, além de apresentar uma cauda longa. Este comportamento pode estar relacionado a vários fatores:



**Figura 5.16** - Curvas de ruptura para remoção do colesterol do leite em colunas de leito fixo recheadas de matriz pura e matriz impressa molecularmente.

- O leite é uma mistura multicomponente, e segundo SUBRA *et al.* (1998), para misturas líquidas multicomponentes, a relação  $C/C_0$  pode extrapolar o limite da unidade, pois considera-se as diferentes afinidades de adsorção dos vários solutos. De acordo com ARROYO *et al.* (2000), curvas deste tipo refletem o fenômeno da troca sequencial, na qual um soluto, mais seletivo, consegue remover do sítio um outro soluto anteriormente trocado, que é liberado ao meio líquido. Observa-se que esta relação é maior para a coluna MP, devido ao fato dela adsorver, além do colesterol, outros componentes do leite, como por exemplo, proteínas e substâncias aromáticas.
- Quanto à relação  $C/C_0$  começar somente em 0,4, pode estar ocorrendo *bypass* na coluna, devido a um empacotamento inadequado da mesma, ou formação de bolhas, pois na forma de operação atual, os poros da matriz estão preenchidos com ar, antes da circulação do leite pela coluna de leito fixo.
- A característica de cauda alongada da curva de ruptura pode estar relacionada com um processo de resistência à transferência de massa muito acentuada.

- Como estamos trabalhando com uma substância natural, o leite, temos uma mistura multicomponente, e isto pode dificultar a remoção do colesterol, devido à seletividade do sólido para cada um dos componentes.
- E também deve se salientar que na literatura alguns autores relatam que as rápidas cinéticas de adsorção do adsorvente impresso é uma vantagem óbvia para a sua aplicação na extração em fase sólida de dispersão como, por exemplo, na preparação e aplicação da técnica de impressão molecular em colunas de HPLC para a determinação do olaquinox em frangos (ZHANG *et al.*, 2012).

## **5.7. CARACTERIZAÇÃO DO LEITE SEM E COM REMOÇÃO PARCIAL DO COLESTEROL**

A Tabela 5.11 mostra a composição físico-química obtida para o leite sem e com remoção parcial de colesterol, nas seguintes condições: 3 cm de altura do leito, 3 mL/min de vazão do eluente a temperatura de 42°C. Observa-se que apenas o pH e a acidez são estatisticamente iguais para os três tipos de leite. No entanto os outros constituintes apresentaram diferença significativa entre o leite integral e os leites com remoção parcial de colesterol utilizando PIM e MP. Os constituintes que apresentaram maior redução foram proteína e lipídios no leite com remoção parcial de colesterol, quando comparado com o leite integral. Os valores observados para o leite “integral” foram de 3,44% de proteínas e 1,88% de lipídios. Após a percolação na coluna com recheio de polímero impresso molecularmente a composição do leite foi de 2,08% de proteína e 1,40% de lipídios (Tabela 5.11). Os valores para o leite percolado na coluna recheada com matriz pura também apresentaram redução destes constituintes, 2,22% de proteína e 1,43% de lipídios. Esses valores são inferiores aos encontrados na literatura que foram de 4,10% de proteína e 3,40% de lipídios (LEONARDI *et al.*, 2011). As demais composições tiveram uma menor diminuição. De acordo com FRANCO (1992) o valor energético para o leite é de 63 kcal/100 g, acima do encontrado neste trabalho que foram entre 33 a 46,20 kcal/100 g. No conteúdo mineral a porcentagem de cinzas do leite sem e com remoção foram menores quando comparado ao leite integral encontrado na literatura que foi de 0,80% (CUNHA *et al.*, 2008). O leite apresentou uma maior acidez quando

comparado ao leite integral utilizado por CUNHA *et al.* (2008) que foi de 0,17 (g de ácido láctico/100g). Essas diferenças dos resultados encontrados possivelmente devem-se ao fato de que os componentes do leite variam de acordo com a raça, idade, período de lactação e alimentação dos animais (TORRES *et al.*, 2000).

**Tabela 5.11** - Composição físico-química do leite sem e com remoção parcial de colesterol.

Constituintes	Sem remoção	Com remoção PIM	Com remoção MP
Umidade (%)	90,21±0,22 <sup>a*</sup>	93,16±0,49 <sup>b*</sup>	92,52±0,94 <sup>b*</sup>
Cinzas (%)	0,59±0,08 <sup>a*</sup>	0,34±0,02 <sup>b*</sup>	0,49±0,02 <sup>c*</sup>
Proteína (%)	3,44±0,44 <sup>a*</sup>	2,08±0,11 <sup>b*</sup>	2,22±0,15 <sup>b*</sup>
Lipídios (%)	1,88±0,06 <sup>a*</sup>	1,40±0,12 <sup>b*</sup>	1,43±0,03 <sup>b*</sup>
Carboidrato (%)	3,88±1,42 <sup>a*</sup>	3,02±0,52 <sup>b*</sup>	3,34±0,95 <sup>b*</sup>
Energia (kcal/100g)	46,20±2,74 <sup>a*</sup>	33,00±1,12 <sup>b*</sup>	35,11±1,92 <sup>b*</sup>
pH	6,08±0,03 <sup>a*</sup>	6,02±0,25 <sup>a*</sup>	6,03±0,16 <sup>a*</sup>
Acidez T.T. (g de ácido láctico/100g)	0,21±0,01 <sup>a*</sup>	0,22±0,01 <sup>a*</sup>	0,22±0,01 <sup>a*</sup>
Açúcares Redutores (%)	1,59±0,03 <sup>a*</sup>	1,28±0,03 <sup>b*</sup>	1,38±0,03 <sup>b*</sup>
Açúcares Totais (%)	2,49±0,02 <sup>a*</sup>	1,98±0,09 <sup>b*</sup>	2,33±0,12 <sup>a*</sup>

\*Médias acompanhadas de letras iguais na mesma linha, não diferem entre si significativamente quanto à composição físico-química dos leites ( $\alpha < 0,05$ ).

## 5.8. ANÁLISE SENSORIAL DE DIFERENÇA DE PADRÃO, ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA PARA O LEITE SEM E COM REMOÇÃO PARCIAL DE COLESTEROL

A Tabela 5.12 apresenta os resultados da análise sensorial de diferença do padrão para o leite, pode-se observar que os leites sem e com remoção parcial de colesterol são estatisticamente diferentes entre si, no entanto, o leite com remoção PIM foi o que apresentou a maior diferença indicada pelos provadores em relação ao leite padrão. Possivelmente devido à manutenção parcial das características sensoriais do leite padrão integral. Entretanto apesar de diferentes não significa que são ruins.

**Tabela 5.12** - Dados sensoriais da diferença do padrão para o leite integral e com remoção parcial de colesterol.

<b>Leite</b>	<b>Nota sensorial</b>
Padrão integral	2,03±1,58 <sup>a*</sup>
Com remoção (MP)	3,87±2,10 <sup>b*</sup>
Com remoção (PIM)	5,60±2,21 <sup>c*</sup>

\*Médias acompanhadas de letras iguais na mesma coluna, não diferem entre si significativamente quanto à diferença de padrão dos leites ( $\alpha < 0,05$ ).

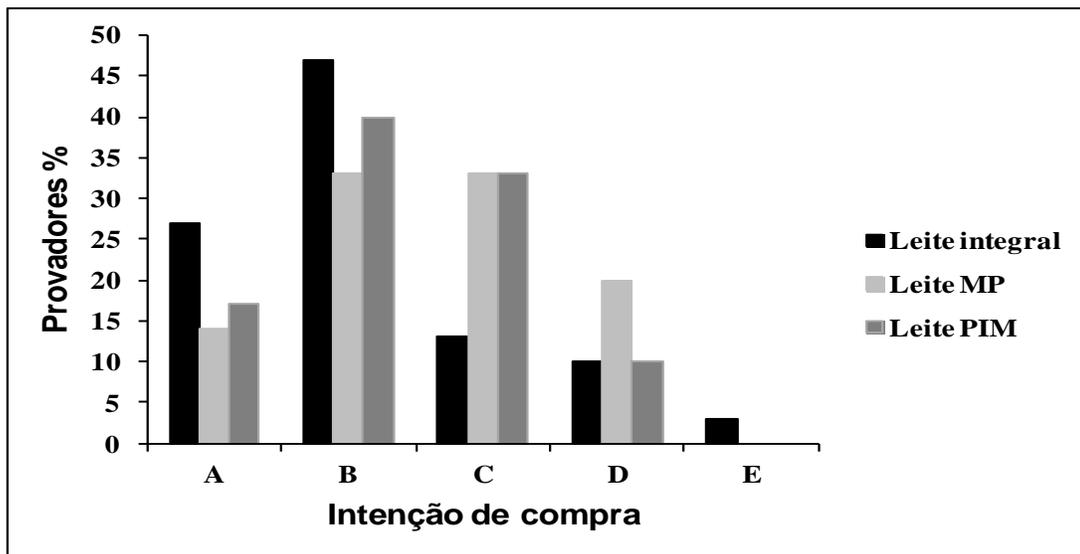
A Tabela 5.13 mostra que em relação à análise de aceitação para os três tipos de leites, eles são estatisticamente iguais entre si, e as notas dos leites com remoção PIM é maior em relação aos outros comparados. Com relação aos parâmetros sensoriais o PIM apresentou maior média no aspecto aparência e impressão global.

**Tabela 5.13** - Notas sensoriais de aceitação para os leites padrão integral e com remoção parcial de colesterol.

<b>Parâmetros</b>	<b>Leite padrão integral</b>	<b>Leite com remoção (MP)</b>	<b>Leite com remoção (PIM)</b>
Aparência	6,93±1,70 <sup>a*</sup>	6,50±1,92 <sup>a*</sup>	7,00±1,59 <sup>a*</sup>
Aroma	7,07±1,59 <sup>a*</sup>	6,40±1,90 <sup>a*</sup>	6,50±1,55 <sup>a*</sup>
Sabor	7,07±1,65 <sup>a*</sup>	6,40±2,01 <sup>a*</sup>	6,90±1,42 <sup>a*</sup>
Textura	7,07±2,03 <sup>a*</sup>	6,70±2,01 <sup>a*</sup>	7,07±1,81 <sup>a*</sup>
Impressão Global	7,07±1,61 <sup>a*</sup>	6,63±1,56 <sup>a*</sup>	7,10±1,26 <sup>a*</sup>

\*Médias acompanhadas de letras iguais, na mesma linha, não diferem entre si significativamente quanto à aceitação dos leites ( $\alpha < 0,05$ ).

De acordo com a Figura 5.17, o leite com remoção PIM foi o que mais se aproximou do leite integral, apresentando 57% dos provadores com intenção de comprar o produto. A comparação sensorial entre leites integral e desnatado evidenciam uma maior aceitabilidade para leites com teores de lipídios naturais (ERTEKIM e GUZEL-SEYDIM, 2010).



**Figura 5.17** - Percentual de intenção de compra para o leite padrão integral e os leites com remoção parcial de colesterol. A – eu certamente compraria; B – provavelmente compraria; C – não sei se compraria; D – provavelmente não compraria e E – certamente não compraria.

Estudos recentes realizados com leite de cabra por ROSA *et al.* (2010), verificaram que 94% dos provadores comprariam leite de vaca quando comparados ao leite de cabra. A rejeição a compra do leite de cabra foi devido ao intenso sabor do leite de cabra aos quais os provadores não estão habituados.

Com base nestes dados, podemos afirmar que parte do grupo dos provadores poderá ser consumidores do leite com baixo teor de colesterol e possivelmente dos derivados destes leites.

### **5.9. CARACTERIZAÇÃO DA BEBIDA LÁCTEA UTILIZANDO LEITE, SEM E COM REMOÇÃO PARCIAL DO COLESTEROL SEM ADIÇÃO DE POLPA DE FRUTA**

A Tabela 5.14 apresenta a caracterização físico-química do produto final (bebida láctea kefir) desenvolvidas com leite sem e com remoção parcial de colesterol utilizando como adsorvente PIM ou MP. Observa-se que somente o pH é estatisticamente igual para as três bebidas lácteas em estudo. Observa-se que os valores de pH encontrados nesse trabalho foram

superiores ao descrito na literatura que foi entre 5,14 e 4,61 (ALMEIDA *et al.* 2011). Pode-se observar que em todas as formulações o teor mineral foi maior ao encontrado na literatura que variou entre 0,60 e 0,65 (CUNHA *et. al.* 2008).

Segundo TORRES *et al.* (2000), o teor de umidade foi de 85,87% para o iogurte tradicional utilizando leite UHT, quando utilizamos leite integral sem e com remoção parcial de colesterol, podemos observar que os valores obtidos neste estudo foram 79,81 a 81,98%, inferiores ao da literatura. Com relação à acidez, os valores encontrados neste trabalho foram: 0,38 (g de ácido láctico/100g) para o leite fermentado sem remoção, 0,58 (g de ácido láctico/100 g) para o leite fermentado com remoção PIM e 0,53 (g de ácido láctico/100 g) para o leite fermentado com remoção MP. Valores que não atendem aos estabelecidos pela legislação brasileira em vigor, que é de 0,60 a 2,0(g de ácido láctico/100 g) (BRASIL, 2000), as bebidas lácteas utilizando leite com remoção PIM e remoção MP foram as que apresentaram valores próximos à legislação. Com relação à proteína os teores determinados ficaram entre 4,04 a 1,98%, que são superiores ao estabelecido pela legislação brasileira em vigor, que é de no mínimo 1,2% (BRASIL, 1997).

Os teores de lipídios encontrados neste estudo foram de 5,88, 3,40 e 4,03% para as bebidas lácteas sem remoção, com remoção PIM e com remoção MP respectivamente, sendo consideradas como bebidas lácteas integrais, quando comparadas com a legislação brasileira, que apresentam a seguinte classificação quanto ao teor de lipídio: a) com creme: mínimo de 6,0%; b) integral: mínimo de 3,0%; c) parcialmente desnatado: máximo de 2,9%; e d) desnatado: máximo de 0,5% (BRASIL, 2000). Com base na Tabela 5.14, os valores encontrados para carboidratos e energia foram de 9,38% e 106,60 kcal/100 g para a bebida láctea sem remoção, 12,05% e 94,92 kcal/100 g para a bebida láctea com remoção PIM, 12,46% e 94,19 kcal/100 g para a bebida láctea com remoção MP, respectivamente, superiores ao descrito na literatura, que foram de 4,0% e 41kcal/100g para iogurte com inulina (BORTOLOZO, 2007). Os valores de açúcares redutores e totais obtidos para as formulações foram de 2,29% e 4,9% para a bebida láctea sem remoção, 1,58% e 2,98% para a bebida láctea com remoção PIM, 1,62% e 3,26% para a bebida láctea com remoção MP, respectivamente. Valores inferiores aos encontrados por SANTOS *et. al.* (2008) que obtiveram valores de 7,74% e 8,64%.

**Tabela 5.14** - Composição físico-química das bebidas lácteas sem e com remoção parcial de colesterol.

Constituintes	Sem remoção	Com remoção	Com remoção
		PIM	MP
Umidade (%)	79,81±0,55 <sup>a*</sup>	81,98±0,49 <sup>b*</sup>	80,82±0,94 <sup>a,b*</sup>
Cinzas (%)	0,89±0,08 <sup>a*</sup>	0,59±0,02 <sup>b*</sup>	0,67±0,02 <sup>b*</sup>
Proteína (%)	4,04±0,44 <sup>a*</sup>	1,98±0,11 <sup>b*</sup>	2,02±0,15 <sup>b*</sup>
Lipídios (%)	5,88±0,06 <sup>a*</sup>	3,40±0,12 <sup>b*</sup>	4,03±0,03 <sup>c*</sup>
Carboidrato (%)	9,38±1,42 <sup>a*</sup>	12,05±0,52 <sup>b*</sup>	12,46±0,95 <sup>b*</sup>
Energia (kcal/100g)	106,60±2,74 <sup>a*</sup>	94,92±1,12 <sup>b*</sup>	94,19±1,92 <sup>b*</sup>
pH	5,83±0,03 <sup>a*</sup>	5,32±0,25 <sup>a*</sup>	5,45±0,16 <sup>a*</sup>
Acidez T.T. (g de ácido láctico/100g)	0,38±0,01 <sup>a*</sup>	0,58±0,02 <sup>b*</sup>	0,53±0,01 <sup>b*</sup>
Açúcares Redutores (%)	2,29±0,03 <sup>a*</sup>	1,58±0,03 <sup>b*</sup>	1,62±0,03 <sup>b*</sup>
Açúcares Totais (%)	4,09±0,02 <sup>a*</sup>	2,98±0,09 <sup>b*</sup>	3,26±0,12 <sup>b*</sup>

\*Médias acompanhadas de letras iguais na mesma linha, não diferem entre si significativamente quanto à composição físico-química das bebidas lácteas ( $\alpha < 0,05$ ).

## 5.10. CARACTERIZAÇÃO DA BEBIDA LÁCTEA UTILIZANDO LEITE, SEM E COM REMOÇÃO PARCIAL DO COLESTEROL COM ADIÇÃO DE POLPA DE MANGABA E SIRIGUELA

A Tabela 5.15 apresenta a caracterização físico-química do produto final (bebida láctea kefir) na proporção de 15 e 30% de polpa de mangaba onde: A1 é a bebida láctea utilizando leite sem remoção e com adição de 15% de polpa; B1 é a bebida láctea sem remoção de colesterol com adição de 30% de polpa; C1 é a bebida láctea com remoção de colesterol PIM e com 15% de polpa; D1 é a bebida láctea com remoção de colesterol com PIM e 30% de polpa; E1 é a bebida com remoção MP com 15% de polpa e F1 é a bebida com remoção MP com 30% de polpa. A Tabela 5.16 apresenta a caracterização físico-química do produto final com adição de polpa de siriguela na proporção de 15 e 30% onde: A2 é a bebida láctea utilizando leite sem remoção e com adição de 15% de polpa; B2 é a bebida láctea sem remoção de colesterol com adição de 30% de polpa; C2 é a bebida láctea com remoção de colesterol PIM e com 15% de

polpa; D2 é a bebida láctea com remoção de colesterol com PIM e 30% de polpa; E2 é a bebida com remoção MP com 15% de polpa e F2 é a bebida com remoção MP com 30% de polpa. Pode-se observar que pequenas diferenças quando comparamos os valores dos constituintes das Tabelas 5.15 e 5.16. Possivelmente essa diferença é devido à composição nutricional dos frutos (mangaba e siriguela), entretanto, a variação nos teores dos constituintes quando aumenta a concentração de polpa são semelhantes para mangaba e siriguela.

Com o aumento da concentração de 15 para 30% de polpa de mangaba ou siriguela os valores de pH apresentaram uma pequena diminuição e um leve aumento na acidez. Esse valor possivelmente tenha sido potencializado pela adição da polpa de mangaba ou siriguela. RIBEIRO (2008) elaborou e avaliou iogurte *diet* sabor morango e encontrou em 4,5 h de fermentação 0,75 (g de ácido láctico/100g), no entanto, SILVA *et al.* (2010) encontraram valor 0,33 (g de ácido láctico/100 g) e CALDEIRA *et al.* (2010) encontraram valores variando de 0,22 a 0,35 (g de ácido láctico/100g), esses valores foram inferiores aos obtidos nesse trabalho, que variou de 0,45 a 0,68 e 0,61 a 0,70 (g de ácido láctico/100 g) para mangaba e siriguela, respectivamente, exceto os valores encontrados para as amostras A1 e B1, os demais valores encontrados, atendem aos estabelecidos pela legislação brasileira, que é de 0,60 a 2,0(g de ácido láctico/100g) (BRASIL, 2000). Para MARTIN (2002), o aumento da acidez, isto é a diminuição do pH, é diretamente proporcional a temperatura e ao tempo de armazenamento para o iogurte. O problema do baixo valor do pH em bebida láctea pode ser minimizados com o maior rigor no cumprimento da data de validade destes produtos. Isto obrigaria a sua retirada de mercado, uma vez que esta variação de acidez pode em muitos casos, ser seguida de outras modificações sensoriais indesejáveis, e favorecer o crescimento de outros microorganismos mais tolerantes a acidez e muitas vezes com funções indesejadas. Os valores de pH obtidos neste estudo variaram de 5,23 a 5,69 e 5,27 a 5,56 para as bebidas com adição de polpa de mangaba e siriguela respectivamente. Foram superiores ao descrito na literatura por CUNHA *et al.*, (2008) para bebida lácteas com 100% de leite e para bebida láctea com 70% de leite e 30% de soro de queijo, os valores foram 4,60 e 4,53 respectivamente.

O leite de algumas espécies animais, particularmente a bovina, contém 80% de suas proteínas como caseínas e o restante (20%) são representadas pelas proteínas de soro. A atração da caseína-caseína aumenta com a diminuição do pH do leite de 6,0 para 5,0 (Tabela 5.11, 5.14

e 5.15) durante a fermentação da bebida láctea, o que resulta na geleificação quando as caseínas se aproximam de seu ponto isoelétrico (pH 5,0 a 45°C). Quando o pH se aproxima de 5,0 as micelas de caseína são parcialmente desestabilizadas e tornam-se ligadas umas às outras na forma de agregados, as cadeias formam parte de uma matriz proteica tridimensional em que a fase líquida do leite é imobilizada. A maioria dos estudos realizados sobre as propriedades de textura da bebida láctea está relacionada com a firmeza e com a viscosidade, sabe-se que a desnaturação das proteínas do soro aumenta estes parâmetros na bebida láctea (LUCEY e SINGH, 1998; HILLER e LORENZEN, 2011).

**Tabela 5.15** - Composição físico-química das bebidas lácteas sem e com remoção parcial de colesterol com polpa de mangaba.

Constituintes	Bebida	Bebida	Bebida	Bebida	Bebida	Bebida
	Láctea A1	Láctea B1	Láctea C1	Láctea D1	Láctea E1	Láctea F1
Umidade (%)	80,89±3,7 <sup>a*</sup>	83,25±2,64 <sup>a*</sup>	84,46±1,32 <sup>a*</sup>	86,36±1,68 <sup>a*</sup>	83,06±1,39 <sup>a*</sup>	85,22±3,49 <sup>a*</sup>
Cinzas (%)	1,13±0,04 <sup>a*</sup>	1,14±0,03 <sup>a*</sup>	0,78±0,03 <sup>b*</sup>	0,96±0,08 <sup>c*</sup>	1,02±0,02 <sup>a,c*</sup>	1,07±0,06 <sup>a,c*</sup>
Proteína (%)	4,13±0,57 <sup>a*</sup>	4,81±0,83 <sup>b*</sup>	1,99±0,15 <sup>c*</sup>	2,22±0,13 <sup>a,d*</sup>	1,91±0,13 <sup>c,d*</sup>	2,30±0,20 <sup>c*</sup>
Lipídios (%)	4,70±0,40 <sup>a*</sup>	5,63±0,31 <sup>b*</sup>	3,8±0,01 <sup>c*</sup>	4,52±0,01 <sup>a,d*</sup>	3,91±0,01 <sup>c,d*</sup>	4,35±0,01 <sup>a,c,d*</sup>
Carboidrato (%)	8,22±0,96 <sup>a*</sup>	6,10±0,19 <sup>a,b*</sup>	8,97±0,11 <sup>a*</sup>	5,94±0,26 <sup>a,b*</sup>	10,10±0,49 <sup>a,c*</sup>	7,06±0,14 <sup>a,b*</sup>
Energia (kcal/100g)	100,07±1,59 <sup>a*</sup>	85,94±1,28 <sup>a,b*</sup>	78,04±1,18 <sup>b*</sup>	73,32±1,10 <sup>b*</sup>	83,23±1,08 <sup>a,b*</sup>	76,59±1,15 <sup>b*</sup>
pH	5,69±0,17 <sup>a*</sup>	5,52±0,14 <sup>a*</sup>	5,30±0,17 <sup>a*</sup>	5,23±0,10 <sup>a*</sup>	5,43±0,05 <sup>a*</sup>	5,37±0,03 <sup>a*</sup>
Acidez T.T. (g de ácido láctico/100g)	0,45±0,01 <sup>a*</sup>	0,56±0,01 <sup>a,b*</sup>	0,62±0,01 <sup>a,b*</sup>	0,65±0,01 <sup>a,b*</sup>	0,63±0,02 <sup>a,b*</sup>	0,68±0,03 <sup>b*</sup>
Açúcares Redutores (%)	2,05±0,03 <sup>a*</sup>	2,13±0,04 <sup>a,b*</sup>	1,89±0,04 <sup>a,b,c*</sup>	2,03±0,05 <sup>a,b,c*</sup>	1,66±0,03 <sup>c*</sup>	1,78±0,14 <sup>a,c*</sup>
Açúcares Totais (%)	4,14±0,11 <sup>a*</sup>	4,39±0,08 <sup>a,b*</sup>	3,52±0,06 <sup>c*</sup>	3,70±0,12 <sup>a,c*</sup>	3,44±0,02 <sup>c*</sup>	3,85±0,13 <sup>a,c*</sup>

A1-Sem remoção com 15% de polpa; B1-Sem remoção com 30% de polpa; C1-Com remoção (PIM) com 15% de polpa; D1-Com remoção (PIM) com 30% de polpa; E1-Com remoção (MP) com 15% de polpa; F1-Com remoção (MP) com 30% de polpa.

\*Médias acompanhadas de letras iguais na mesma linha, não diferem entre si significativamente quanto à composição físico-química das bebidas lácteas ( $\alpha < 0,05$ ).

Com relação aos valores de umidade obtidos neste trabalho variaram de 80,89 a 86,36% e 81,43 a 84,23% para mangaba e siriguela, respectivamente, valores similares aos encontrados na literatura por TORRES *et al.* (2000) que obtiveram umidade de 85,87% para o iogurte tradicional e por SILVA *et al.* (2010) que encontraram para bebida láctea sabor bacuri enriquecida com pólen umidades que variaram entre 82,35 a 84,71%, no entanto esses valores foram superiores aos encontrados por SANTOS *et al.* (2008) para bebida láctea sabor manga que variou entre 75,87 e 78,62%.

Os resultados para o teor de cinzas encontrados nesse trabalho fora superiores ao descrito na literatura para a bebida láctea sabor umbu que obteve 0,37% (SANTOS *et al.*, 2006).

**Tabela 5.16** - Composição físico-química das bebidas lácteas sem e com remoção parcial de colesterol com polpa de siriguela.

Constituintes	Bebida	Bebida	Bebida	Bebida	Bebida	Bebida
	Láctea A2	Láctea B2	Láctea C2	Láctea D2	Láctea E2	Láctea F2
Umidade (%)	81,43±0,58 <sup>a*</sup>	82,10±0,34 <sup>a*</sup>	84,23±1,11 <sup>a*</sup>	83,42±1,02 <sup>a*</sup>	83,88±0,94 <sup>a*</sup>	83,12±3,46 <sup>a*</sup>
Cinzas (%)	0,97±0,07 <sup>a*</sup>	1,01±0,11 <sup>a,b*</sup>	0,87±0,06 <sup>a,c*</sup>	1,04±0,07 <sup>a,b*</sup>	1,05±0,08 <sup>a,b*</sup>	1,08±0,09 <sup>b*</sup>
Proteína (%)	4,51±0,63 <sup>a*</sup>	4,98±0,18 <sup>b*</sup>	2,07±0,12 <sup>c*</sup>	2,17±0,17 <sup>c*</sup>	2,10±0,09 <sup>c*</sup>	2,12±0,22 <sup>c*</sup>
Lipídios (%)	4,98±0,01 <sup>a*</sup>	5,32±0,01 <sup>a,b*</sup>	3,91±0,01 <sup>c*</sup>	4,12±0,01 <sup>c*</sup>	4,11±0,01 <sup>c*</sup>	4,18±0,01 <sup>c*</sup>
Carboidrato (%)	8,11±0,15 <sup>a*</sup>	6,59±0,76 <sup>a,b*</sup>	8,39±0,25 <sup>a,b,c*</sup>	9,25±0,37 <sup>a,c*</sup>	8,86±0,29 <sup>a,c*</sup>	9,50±0,54 <sup>a,c*</sup>
Energia (kcal/100g)	95,26±1,67 <sup>a*</sup>	94,16±1,97 <sup>a,b*</sup>	77,03±1,25 <sup>c*</sup>	82,76±1,86 <sup>c*</sup>	80,83±1,52 <sup>c*</sup>	84,10±1,09 <sup>a,c*</sup>
pH	5,45±0,09 <sup>a*</sup>	5,27±0,08 <sup>a*</sup>	5,51±0,13 <sup>a*</sup>	5,30±0,11 <sup>a*</sup>	5,56±0,12 <sup>a*</sup>	5,36±0,01 <sup>a*</sup>
Acidez T.T. (g de ácido láctico/100g)	0,61±0,01 <sup>a*</sup>	0,65±0,01 <sup>a*</sup>	0,68±0,01 <sup>a*</sup>	0,70±0,02 <sup>a*</sup>	0,62±0,02 <sup>a*</sup>	0,65±0,01 <sup>a*</sup>
Açúcares Redutores (%)	2,13±0,09 <sup>a*</sup>	2,29±0,12 <sup>a,b*</sup>	1,78±0,03 <sup>c*</sup>	1,75±0,04 <sup>c*</sup>	1,59±0,02 <sup>c*</sup>	1,83±0,07 <sup>c*</sup>
Açúcares Totais (%)	4,07±0,07 <sup>a*</sup>	4,18±0,16 <sup>a,b*</sup>	3,69±0,16 <sup>b,c*</sup>	3,54±0,59 <sup>c*</sup>	3,34±0,13 <sup>c*</sup>	3,76±0,27 <sup>a,b,c*</sup>

A2-Sem remoção com 15% de polpa; B2-Sem remoção com 30% de polpa; C2-Com remoção (PIM) com 15% de polpa; D2-Com remoção (PIM) com 30% de polpa; E2-Com remoção (MP) com 15% de polpa; F2-Com remoção (MP) com 30% de polpa.

\*Médias acompanhadas de letras iguais na mesma linha, não diferem entre si significativamente quanto à composição físico-química das bebidas lácteas ( $\alpha < 0,05$ ).

Com relação aos teores de proteínas as bebidas lácteas apresentaram uma elevação com o aumento do percentual de polpa, os valores encontrados ficaram entre 1,91 a 4,81% e 2,07 a 4,98% para mangaba e siriguela respectivamente, valores superiores ao mínimo descrito pela legislação que é de 1,2 g de proteína/100 g de produto, valor ultrapassado nas bebidas lácteas formuladas (BRASIL, 2000). Os teores de proteínas das bebidas lácteas neste trabalho foram maiores que os encontrados por SILVA *et. al.* (2010), que obtiveram entre 0,76 e 1,25% em bebidas lácteas sabor bacuri.

Quanto aos teores de lipídios encontrados variaram de 3,80 a 5,63% e 3,91 a 5,32% para mangaba e siriguela, respectivamente, valores superiores aos encontrados por CUNHA *et. al.* (2008), que foi de 3,03%, sendo considerada como iogurtes integrais quando comparadas com a legislação brasileira vigente, que é no mínimo 3,0% (BRASIL, 2000).

Com base nos resultados, os valores de açúcares redutores e totais obtidos para as formulações variaram de 1,66 a 2,13% e 3,44 a 4,39% respectivamente para mangaba e de 1,59 a 2,29% e 3,34 a 4,18% respectivamente para siriguela. Valores inferiores ao encontrado para bebida láctea sabor manga por SANTOS *et. al.* (2008).

## **5.11. TEOR DE REMOÇÃO DO COLESTEROL DAS BEBIDAS LÁCTEAS FERMENTADAS POR GRÃOS DE KEFIR**

Na Tabela 5.17 estão apresentados os teores de remoção do colesterol das bebidas lácteas fermentadas por grãos de kefir, utilizando leite sem e com remoção parcial de colesterol e sem e com adição de 15 e 30% de polpa de mangaba e siriguela. Observa-se que durante o processo fermentativo ocorreu uma redução de colesterol para todas as formulações após a fermentação. No entanto, a bebida láctea produzida com o leite percolado pela coluna recheada com os polímeros impressos molecularmente (PIM) foi a que proporcionou um melhor resultado variando de 42,42 a 48,25% de remoção de colesterol. Com relação à variação da concentração das polpas de mangaba e de siriguela, nota-se que com o acréscimo do percentual de polpa, a

remoção aumenta. Isso ocorre possivelmente pela diluição da bebida láctea pela a água contida na polpa.

Portanto, pode-se recomendar o uso de leite com remoção parcial de colesterol obtido com polímero impresso molecularmente (PIM) para a produção de bebida láctea funcional com presença ou ausência de polpa de mangaba e siriguela. Além de valorizar o uso de fruta regional na elaboração da bebida láctea.

**Tabela 5.17** - Teor de remoção do colesterol das bebidas lácteas fermentadas por grãos de kefir.

<b>Descrição das amostras</b>	<b>Remoção (%)</b>
B. láctea sem remoção de colesterol e sem adição de polpa (Y)	19,39±0,76
B. láctea com remoção PIM e sem adição de polpa (K)	42,42±1,17
B. láctea com remoção MP e sem adição de polpa (W)	33,17±1,81
B. láctea sem remoção com 15% de polpa de mangaba (A1)	26,71±2,52
B. láctea sem remoção com 30% de polpa de mangaba (B1)	29,16±1,60
B. láctea com remoção (PIM) com 15% de polpa de mangaba (C1)	44,65±0,59
B. láctea com remoção (PIM) com 30% de polpa de mangaba (D1)	48,25±0,75
B. láctea com remoção (MP) com 15% de polpa de mangaba (E1)	35,90±1,19
B. láctea com remoção (MP) com 30% de polpa de mangaba (F1)	38,76±1,41
B. láctea cem remoção com 15% de polpa de siriguela (A2)	25,25±1,54
B. láctea cem remoção com 30% de polpa de siriguela (B2)	27,21±0,92
B. láctea com remoção (PIM) com 15% de polpa de siriguela (C2)	43,20±0,54
B. láctea com remoção (PIM) com 30% de polpa de siriguela (D2)	44,47±1,05
B. láctea com remoção (MP) com 15% de polpa de siriguela (E2)	33,49±1,98
B. láctea com remoção (MP) com 30% de polpa de siriguela (F2)	38,60±2,19

Estudos realizados por VALENTE (2000) apresentaram uma remoção de até 95% do colesterol do óleo de manteiga por adsorção, utilizando uma coluna cromatográfica com sílica gel com diferentes granulometrias.

SOCANTAYPE (2008) estudou a utilização do etano na remoção do teor de gordura e colesterol em alguns produtos alimentícios e no óleo de manteiga, obtiveram uma remoção de praticamente todo o colesterol nos extratos (98%) pela adsorção seletiva em alumina e sem interferir com o fracionamento da gordura.

## **5.12. VISCOSIDADE DAS BEBIDAS LÁCTEAS FERMENTADAS POR GRÃOS DE KEFIR**

A Tabela 5.18 apresenta os resultados da viscosidade das bebidas lácteas fermentadas por grãos de kefir utilizando leite sem e com remoção parcial de colesterol, e com e sem adição de polpa de mangaba e siriguela. Pode-se observar que a remoção parcial do colesterol do leite esta associada a diminuição da viscosidade, possivelmente devido à remoção de outros constituintes que estão presentes na composição do leite. Nota-se que a utilização do polímero com impressão molecular reduz essa diferença. Esse comportamento permanece quando é adicionada polpa de mangaba e de siriguela nas bebidas lácteas produzidas com leite sem e com remoção parcial do colesterol. Com o aumento da concentração de polpa na proporção de 0, 15 e 30%, a viscosidade tende a diminuir, possivelmente pela alta umidade presente nas polpas de mangaba e siriguela.

De acordo com KOKSOY e KILIC (2004), a viscosidade sofre a influência do teor de sólidos secos, possivelmente pela compactação da caseína. Estudos anteriores realizados por GAMA (2010) indicam que os leites fermentados com maiores viscosidade, apresentaram maior nível de aceitação por parte dos consumidores, e mostraram um potencial probiótico satisfatório.

Segundo MONTANUCI, *et al.* (2010), o teor de gordura presente no leite pode afetar diretamente na viscosidade da bebida láctea, quanto maior a quantidade de gordura maior a viscosidade, justificando a baixa viscosidade das amostras analisadas.

**Tabela 5.18** - Avaliação da viscosidade das bebidas lácteas fermentadas por grãos de kefir.

Descrição da amostra	Viscosidade (cp)
B. láctea sem remoção de colesterol e sem adição de polpa (Y)	2840±2,48
B. láctea com remoção PIM e sem adição de polpa (K)	2012±1,28
B. láctea com remoção MP e sem adição de polpa (W)	1354±0,96
B. láctea sem remoção com 15% de polpa de mangaba (A1)	1450±3,76
B. láctea sem remoção com 30% de polpa de mangaba (B1)	981,67±0,23
B. láctea com remoção (PIM) com 15% de polpa de mangaba (C1)	1660±1,83
B. láctea com remoção (PIM) com 30% de polpa de mangaba (D1)	756,67±0,05
B. láctea com remoção (MP) com 15% de polpa de mangaba (E1)	770±0,87
B. láctea com remoção (MP) com 30% de polpa de mangaba (F1)	540±3,08
B. láctea sem remoção com 15% de polpa de siriguela (A2)	1081±7,64
B. láctea sem remoção com 30% de polpa de siriguela (B2)	851,67±5,29
B. láctea com remoção (PIM) com 15% de polpa de siriguela (C2)	1169±1,73
B. láctea com remoção (PIM) com 30% de polpa de siriguela (D2)	616,92±5,05
B. láctea com remoção (MP) com 15% de polpa de siriguela (E2)	774±4,87
B. láctea com remoção (MP) com 30% de polpa de siriguela (F2)	640±1,28

### 5.13. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Pode-se observar na Tabela 5.19 que os resultados obtidos para coliformes termo tolerante, coliformes total e *Salmonella sp.*, encontram-se dentro dos parâmetros propostos pela legislação brasileira vigente, que são 10 NMP/g, 10<sup>2</sup> NMP/g e Ausente, respectivamente (BRASIL 2001). Atendendo assim aos requisitos mínimos de qualidade para o consumo humano.

Com relação às bactérias lácteas os valores encontrados apresentaram uma grandeza entre 1,42 x 10<sup>8</sup> e 3,75 x 10<sup>9</sup> UFC (Tabela 5.19). A literatura relata que os probióticos devem ser ingeridos diariamente para que seu efeito seja contínuo, a dosagem recomendada para adulto é de 5 bilhões de unidades formadoras de colônias (UFC)/dia/g ou mL de produto (ou seja, 5 x 10<sup>9</sup> UFC/dia/g ou mL). E ainda recomenda-se que para ocorrer os efeitos terapêuticos

os probióticos possam doses com grandezas variando de  $10^6$  a  $10^9$  UFC (STEIDLER, *et al.*, 2000; SAAD, 2006).

**Tabela 5.19** - Resultados microbiológicos das bebidas lácteas.

Descrição das amostras	Cel. viáveis (UFC/mL)	Coliforme termo tolerante (NMP/g)	Coliforme total (NMP/g)	<i>Salmonella sp.</i> (UFC/g)
B. láctea Y	$3,75 \times 10^9$	< 1(NMP/100 mL)	< 1(NMP/100 mL)	Ausente
B. láctea K	$2,97 \times 10^9$	< 1(NMP/100 mL)	< 1(NMP/100 mL)	Ausente
B. láctea W	$3,05 \times 10^9$	< 1(NMP/100 mL)	< 1(NMP/100 mL)	Ausente
B. láctea A1	$2,68 \times 10^8$	< 1(NMP/100 mL)	< 1(NMP/100 mL)	Ausente
B. láctea B1	$1,85 \times 10^8$	< 1(NMP/100 mL)	< 1(NMP/100 mL)	Ausente
B. láctea C1	$2,11 \times 10^8$	< 1(NMP/100 mL)	< 1(NMP/100 mL)	Ausente
B. láctea D1	$1,42 \times 10^8$	< 1(NMP/100 mL)	< 1(NMP/100 mL)	Ausente
B. láctea E1	$2,18 \times 10^8$	< 1(NMP/100 mL)	< 1(NMP/100 mL)	Ausente
B. láctea F1	$1,61 \times 10^8$	< 1(NMP/100 mL)	< 1(NMP/100 mL)	Ausente
B. láctea A2	$2,80 \times 10^8$	< 1(NMP/100 mL)	< 1(NMP/100 mL)	Ausente
B. láctea B2	$1,90 \times 10^8$	< 1(NMP/100 mL)	< 1(NMP/100 mL)	Ausente
B. láctea C2	$2,72 \times 10^8$	< 1(NMP/100 mL)	< 1(NMP/100 mL)	Ausente
B. láctea D2	$1,84 \times 10^8$	< 1(NMP/100 mL)	< 1(NMP/100 mL)	Ausente
B. láctea E2	$2,65 \times 10^8$	< 1(NMP/100 mL)	< 1(NMP/100 mL)	Ausente
B. láctea F2	$1,68 \times 10^8$	< 1(NMP/100 mL)	< 1(NMP/100 mL)	Ausente

Y- Bebida láctea sem remoção de colesterol e sem adição de polpa; K- Bebida láctea com remoção PIM e sem adição de polpa; W- Bebida láctea com remoção MP e sem adição de polpa; A1-Sem remoção com 15% de polpa de mangaba; B1-Sem remoção com 30% de polpa de mangaba; C1-Com remoção (MIP) com 15% de polpa de mangaba; D1-Com remoção (MIP) com 30% de polpa de mangaba; E1-Com remoção (MP) com 15% de polpa de mangaba; F1-Com remoção (MP) com 30% de polpa de mangaba; A2-Sem remoção com 15% de polpa de siriguela; B2-Sem remoção com 30% de polpa de siriguela; C2-Com remoção (MIP) com 15% de polpa de siriguela; D2-Com remoção (MIP) com 30% de polpa de siriguela; E2-Com remoção (MP) com 15% de polpa de siriguela; F2-Com remoção (MP)

De acordo com SOARES *et al.* (2011) durante a vida de prateleira, o alimento deve atender às exigências de qualidade determinadas pela legislação vigente, principalmente quanto

à viabilidade de micro-organismos probióticos. A legislação brasileira estabelece um limite mínimo de  $10^7$  UFC/mL para as bactérias lácticas totais na bebida láctea, determinando que esses micro-organismos específicos sejam viáveis, ativos e abundantes no produto final e durante toda sua vida de prateleira (BRASIL, 2000). Dessa forma as bebidas lácteas fermentadas utilizando grãos de kefir e saborizada com polpa de mangaba e siriguela podem ser consideradas como alimentos probióticos.

#### **5.14. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO UTILIZANDO UM SIMULADOR ESTÔMAGO-DUODENO**

A Tabela 5.20 mostra o potencial probiótico das bebidas lácteas fermentadas por grãos de kefir e da bebida láctea comercial, utilizando um simulador estômago-duodeno. A bebida láctea comercial apresentou um potencial probiótico com grandeza de  $10^5$  UFC/mL na entrada do estômago, após 60 min de processo no simulador, ocorreu um decréscimo no seu potencial probiótico atingindo uma grandeza de  $10^2$  UFC/mL no final do duodeno, com esse resultado o produto não é caracterizado como probiótico pela legislação. Com relação às bebidas lácteas fermentadas por grãos de kefir utilizando os leites sem e com remoção parcial de colesterol e sem e com adição de 15% de polpa de mangaba e de siriguela, apresentaram uma variação na entrada do estômago de  $10^7$  a  $10^9$  UFC/mL, chegando ao final do duodeno com uma variação de  $10^4$  a  $10^6$  UFC/mL. Com esses resultados, observou-se que as bebidas lácteas fermentadas com grãos de kefir apresentam um potencial probiótico maior quando comparado à bebida láctea comercial utilizada neste estudo e podem ser consideradas com um produto probiótico pela legislação brasileira.

Segundo a literatura um produto probiótico para fornecer benefícios à saúde, deve superar obstáculos físicos e químicos tais como o ácido e a bÍlis encontrados no aparelho gastrointestinal, dessa forma os micro-organismos precisam ser viáveis, ativos e abundantes, com uma concentração mínima de  $10^6$  UFC/mL de produto (GUO *et al.*, 2009). De acordo com THAMER e PENNA (2005), desenvolver um produto lácteo com alta concentração de micro-organismos probióticos é imprescindível, para que pelo menos cerca de  $10^3$  a  $10^4$  UFC/mL chegue ao intestino.

**Tabela 5.20** – Número de células viáveis em simulador estômago-duodeno.

Descrição das amostras		Cel. viáveis	Cel. viáveis	Cel. viáveis	Cel. viáveis
		(UFC/mL)	(UFC/mL)	(UFC/mL)	(UFC/mL)
		0 (min)	30 (min)	45 (min)	60 (min)
B. láctea Z	Estômago	1,71 x 10 <sup>5</sup>	2,28 x 10 <sup>4</sup>	1,2 x 10 <sup>3</sup>	3,1 x 10 <sup>3</sup>
	Duodeno	-	5,9 x 10 <sup>3</sup>	1,3 x 10 <sup>2</sup>	3,9 x 10 <sup>2</sup>
B. láctea Y	Estômago	1,16 x 10 <sup>9</sup>	3,58 x 10 <sup>4</sup>	2,42 x 10 <sup>5</sup>	1,14 x 10 <sup>6</sup>
	Duodeno	-	2,24 x 10 <sup>4</sup>	1,06 x 10 <sup>4</sup>	1,08 x 10 <sup>5</sup>
B. láctea K	Estômago	1,74 x 10 <sup>9</sup>	4,52 x 10 <sup>4</sup>	1,56 x 10 <sup>5</sup>	1,67 x 10 <sup>6</sup>
	Duodeno	-	3,44 x 10 <sup>4</sup>	1,89 x 10 <sup>5</sup>	1,94 x 10 <sup>6</sup>
B. láctea W	Estômago	2,22 x 10 <sup>9</sup>	3,86 x 10 <sup>4</sup>	1,24 x 10 <sup>5</sup>	1,06 x 10 <sup>5</sup>
	Duodeno	-	2,98 x 10 <sup>3</sup>	1,08 x 10 <sup>4</sup>	1,34 x 10 <sup>5</sup>
B. láctea A1	Estômago	1,38 x 10 <sup>8</sup>	2,02 x 10 <sup>4</sup>	1,02 x 10 <sup>5</sup>	1,36 x 10 <sup>5</sup>
	Duodeno	-	9,4 x 10 <sup>4</sup>	5,2 x 10 <sup>5</sup>	1,2 x 10 <sup>5</sup>
B. láctea C1	Estômago	9,8 x 10 <sup>7</sup>	5,3 x 10 <sup>5</sup>	8,3 x 10 <sup>4</sup>	4,5 x 10 <sup>5</sup>
	Duodeno	-	2,8 x 10 <sup>4</sup>	5,7 x 10 <sup>4</sup>	8,8 x 10 <sup>4</sup>
B. láctea E1	Estômago	1,98 x 10 <sup>8</sup>	6,6 x 10 <sup>5</sup>	7,5 x 10 <sup>4</sup>	2,8 x 10 <sup>5</sup>
	Duodeno	-	1,8 x 10 <sup>4</sup>	4,5 x 10 <sup>4</sup>	1,01 x 10 <sup>6</sup>
B. láctea A2	Estômago	1,8 x 10 <sup>9</sup>	1,02 x 10 <sup>5</sup>	9,5 x 10 <sup>5</sup>	3,1 x 10 <sup>5</sup>
	Duodeno	-	1,5 x 10 <sup>5</sup>	6,6 x 10 <sup>5</sup>	4,5 x 10 <sup>5</sup>
B. láctea C2	Estômago	2,03 x 10 <sup>8</sup>	1,9 x 10 <sup>5</sup>	3,3 x 10 <sup>4</sup>	2,1 x 10 <sup>5</sup>
	Duodeno	-	1,1 x 10 <sup>5</sup>	9,2 x 10 <sup>5</sup>	3,6 x 10 <sup>5</sup>
B. láctea E2	Estômago	1,27 x 10 <sup>8</sup>	7,6 x 10 <sup>5</sup>	5,3 x 10 <sup>4</sup>	3,3 x 10 <sup>6</sup>
	Duodeno	-	2,9 x 10 <sup>5</sup>	6,9 x 10 <sup>5</sup>	4,9 x 10 <sup>6</sup>

Z – Comercial; Y - Sem remoção de colesterol e sem adição de polpa; K - Com remoção (PIM) e sem adição de polpa; W - Com remoção (MP) e sem adição de polpa; A1 - Sem remoção com 15% de polpa de mangaba; C1 - Com remoção (PIM) com 15% de polpa de mangaba; E1 - Com remoção (MP) com 15% de polpa de mangaba; A2 - Sem remoção com 15% de polpa de siriguela; C2 - Com remoção (PIM) com 15% de polpa de siriguela; E2 - Com remoção (MP) com 15% de polpa de siriguela.

Os valores obtidos neste estudo foram inferiores ao descrito na legislação brasileira que estabelece um limite mínimo de  $10^7$  UFC/g ou mL do produto (BRASIL, 2000). Com base nos resultados obtidos, pode-se considerar que as bebidas lácteas fermentadas por grãos de kefir apresentam características probióticas.

### **5.15. ESTUDO DO PROCESSO FERMENTATIVO UTILIZANDO BIORREATOR DE BANCADA**

Neste item, ocorreu a variação da agitação e da aeração durante o processo fermentativo. A Tabela 5.21 apresenta os dados de viscosidade, tempo para finalização do processo (pH 5.40) e nº de células viáveis durante os processos fermentativos em biorreator utilizando leite sem e com remoção parcial do colesterol. O aumento da agitação mecânica do meio de cultura ou mesmo o borbulhamento de ar retardou o tempo para a finalização do processo, e a viscosidade da bebida láctea obtida foi menor, ou seja, menos consistente.

Com relação ao número de células viáveis os resultados encontrados foram na grandeza de  $10^9$  UFC/mL, atendendo ao valor recomendada pela legislação brasileira para um produto ser probiótico o limite mínimo é de  $10^7$  UFC/mL (BRASIL, 2000).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.21, a fermentação estática foi a que apresentou a maior viscosidade máxima, o maior nº de células viáveis e o menor tempo para o pH ficar constante quando comparada com as outras condições utilizadas. Sendo assim, a fermentação estática foi a ideal para o desenvolvimento do processo fermentativo utilizando grãos de kefir como agente biológico.

**Tabela 5.21** – Avaliação da viscosidade, do tempo para o pH ficar constante e n° de células viáveis durante a otimização do processo fermentativo.

Condições		Viscosidade máxima (cp)		#Tempo (h)		N° de Cel. Viáveis em 12 h (UFC/mL)	
Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	Integral	Com remoção (PIM)	Integral	Com remoção (PIM)	Integral	Com remoção (PIM)
0	0	1880 (12 h)	957 (12 h)	12	10	5,96*10 <sup>9</sup>	4,20* 10 <sup>9</sup>
25	0	624 (24 h)	768 (24 h)	18	18	2,11*10 <sup>9</sup>	2,70* 10 <sup>9</sup>
50	0	208 (24 h)	212 (24 h)	20	20	1,14*10 <sup>9</sup>	1,70* 10 <sup>9</sup>
0	0,25	704 (24 h)	829 (24 h)	14	14	3,32*10 <sup>9</sup>	3,68* 10 <sup>9</sup>
0	0,50	631 (24 h)	771 (24 h)	20	16	2,64*10 <sup>9</sup>	2,89* 10 <sup>9</sup>

# tempo para o pH ficar constante

## 5.16. ANÁLISE SENSORIAL DE ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA PARA A BEBIDA LÁCTEA SEM ADIÇÃO DE POLPA DE FRUTA

A Tabela 5.22 apresenta as notas referentes à aceitação dos produtos pelos provadores. Na avaliação de aceitação, os provadores atribuem notas de 1 a 9 para diferentes parâmetros da bebida láctea integral e com remoção parcial de colesterol utilizando kefir. Foram observadas notas estatisticamente idênticas, e ainda deve-se salientar que a maior média foi atribuída a bebida láctea preparada com leite percolado em coluna recheada com polímero impresso molecularmente. Apesar dos provadores não conhecerem a bebida láctea utilizando kefir, podemos afirmar que a remoção parcial de colesterol e de mais algumas propriedades não influenciaram na aceitabilidade sensorial (Tabela 5.22).

Os produtos integrais e com remoção de colesterol utilizando a matriz PIM ou MP não diferiram estatisticamente entre si, demonstrando que o processo aplicado de redução de

colesterol do leite não altera a aceitação do leite. E as médias de notas atribuídas foram acima de 6.00 para a maioria dos casos demonstrando que o produto apresenta uma boa aceitação.

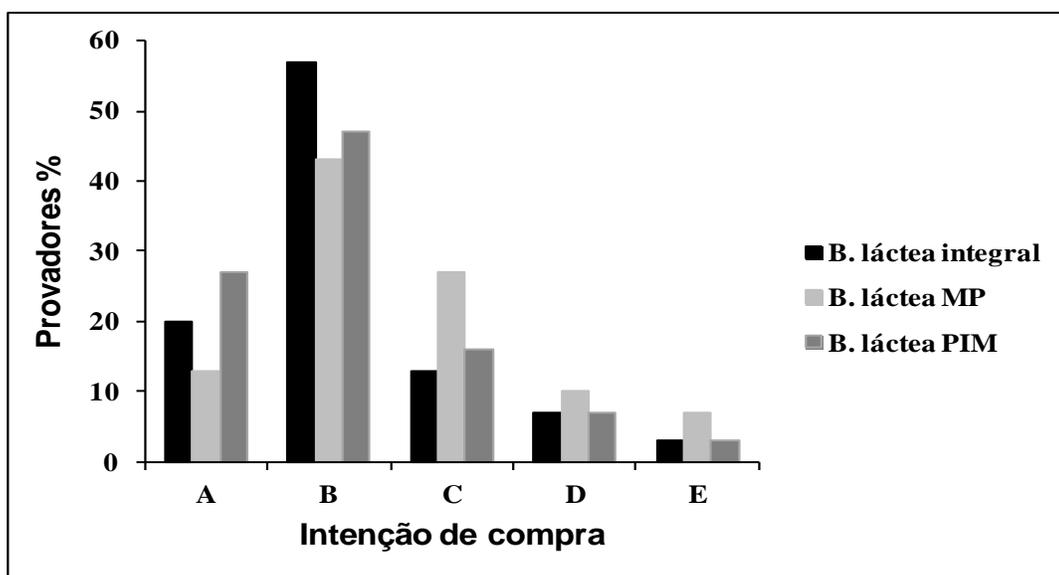
**Tabela 5.22** - Notas sensoriais de aceitação para as bebidas lácteas integrais e com remoção parcial de colesterol.

<b>Parâmetros</b>	<b>Bebida láctea integral</b>	<b>Bebida láctea com remoção (MP)</b>	<b>Bebida láctea com remoção (PIM)</b>
Aparência	6,53±2,12 <sup>a*</sup>	6,13±1,92 <sup>a*</sup>	5,83±2,27 <sup>a*</sup>
Aroma	6,90±1,68 <sup>a*</sup>	6,47±1,75 <sup>a*</sup>	6,43±1,90 <sup>a*</sup>
Sabor	7,23±1,92 <sup>a*</sup>	6,30±2,18 <sup>a*</sup>	7,17±1,70 <sup>a*</sup>
Textura	6,20±2,26 <sup>a*</sup>	6,10±2,11 <sup>a*</sup>	6,53±1,85 <sup>a*</sup>
Impressão Global	7,03±1,84 <sup>a*</sup>	6,33±1,91 <sup>a*</sup>	7,80±1,80 <sup>a*</sup>

\*Médias acompanhadas de letras iguais, na mesma linha, não diferem entre si significativamente quanto à aceitação dos leites ( $\alpha < 0,05$ ).

A semelhança estatística para os parâmetros sensoriais são também vistos na análise de intenção de compra apresentado na Figura 5.18. Verifica-se que aproximadamente 74% dos provadores compraria a nova bebida láctea utilizando o leite com teor de colesterol reduzido obtido a partir da coluna com matriz PIM e de 56% para a coluna com matriz MP.

Para aumentar as notas sensoriais aplicou-se a saborização da bebida láctea com frutas exóticas regionais.



**Figura 5.18** - Percentual de intenção de compra para as bebidas lácteas integrais e com remoção parcial de colesterol sem adição de polpa. A – eu certamente compraria; B – provavelmente compraria; C – não sei se compraria; D – provavelmente não compraria e E – certamente não compraria.

### **5.17. ANÁLISE SENSORIAL DE ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA PARA A BEBIDA LÁCTEA COM ADIÇÃO DE POLPA DE MANGABA E SIRIGUELA**

As bebidas lácteas desenvolvidas neste estudo, utilizando grãos de kefir e leites com baixo teor de colesterol apresentaram uma aceitabilidade extremamente positiva. A partir desses resultados, foram adicionadas polpas de mangaba e siriguela variando as concentrações em 15 e 30% de polpa, para a avaliação da aceitabilidade sensorial das bebidas lácteas com adição de polpa.

As Tabelas 5.23, 5.24, 5.25 e 5.26, apresentam as médias dos parâmetros sensoriais para as bebidas lácteas com adição de 15 e 30% de polpa de mangaba e siriguela respectivamente. Observa-se que as bebidas são estatisticamente iguais, quando adicionamos as mesmas concentrações para cada fruta. Entretanto, a bebida láctea formulada com leite com remoção parcial de colesterol utilizando o polímero com impressão molecular foi aquela que apresentou a maior média para a impressão global do produto, exceto, quando foi adicionado 30% de polpa de siriguela. O uso do leite com baixo teor de colesterol e adição da polpa da mangaba e da

siriguela, tem a finalidade de agregar valor ao produto final e melhorar a comercialização dessas frutas que são altamente perecíveis.

**Tabela 5.23** - Notas sensoriais de aceitação para as bebidas lácteas integrais e com remoção parcial de colesterol, com 15% de polpa de mangaba.

Parâmetros	Bebida láctea integral com 15% de polpa	Bebida láctea com remoção (MP) com 15% de polpa	Bebida láctea com remoção (PIM) com 15% de polpa
Aparência	6,87±1,77 <sup>a*</sup>	6,73±1,98 <sup>a*</sup>	6,83±1,99 <sup>a*</sup>
Aroma	6,80±1,79 <sup>a*</sup>	7,23±1,47 <sup>a*</sup>	6,97±1,71 <sup>a*</sup>
Sabor	7,13±1,85 <sup>a*</sup>	7,03±1,71 <sup>a*</sup>	7,37±1,54 <sup>a*</sup>
Textura	6,80±1,93 <sup>a*</sup>	6,87±1,38 <sup>a*</sup>	7,20±1,44 <sup>a*</sup>
Impressão Global	7,20±1,66 <sup>a*</sup>	6,93±1,63 <sup>a*</sup>	7,37±1,44 <sup>a*</sup>

\*Médias acompanhadas de letras iguais, na mesma linha, não diferem entre si significativamente quanto à aceitação dos bolos ( $\alpha < 0,05$ ).

Estudos realizados por DALLA SANTA *et al.*, (2006) mostram uma aceitação sensorial de 64% dos provadores para a bebida láctea kefir com adição de 10% de polpa de morango.

**Tabela 5.24** - Notas sensoriais de aceitação para as bebidas lácteas integrais e com remoção parcial de colesterol, com 30% de polpa de mangaba.

Parâmetros	Bebida láctea integral com 30% de polpa	Bebida láctea com remoção (MP) com 30% de polpa	Bebida láctea com remoção (PIM) com 30% de polpa
Aparência	5,90±1,53 <sup>a*</sup>	5,93±1,70 <sup>a*</sup>	6,63±1,62 <sup>a*</sup>
Aroma	6,53±1,59 <sup>a*</sup>	6,50±1,85 <sup>a*</sup>	7,07±1,33 <sup>a*</sup>
Sabor	6,30±1,46 <sup>a*</sup>	6,37±1,58 <sup>a*</sup>	6,93±1,33 <sup>a*</sup>
Textura	5,90±1,68 <sup>a*</sup>	5,67±1,93 <sup>a*</sup>	6,57±1,77 <sup>a*</sup>
Impressão Global	6,30±1,31 <sup>a*</sup>	6,13±1,65 <sup>a*</sup>	6,73±1,33 <sup>a*</sup>

\*Médias acompanhadas de letras iguais, na mesma linha, não diferem entre si significativamente quanto à aceitação das bebidas lácteas com 30% de polpa de mangaba ( $\alpha < 0,05$ ).

De acordo com a literatura, a variação de pH está diretamente relacionada a acidez e esta, por sua vez, ao aroma do produto. Segundo a literatura nos iogurtes ou bebidas lácteas existe a formação de estruturas de gel características mediante as reações de interação grupo tiol com as ligações dissulfeto com outras proteínas, bem como interações  $\beta$ -lactoglobulina e caseína que podem ser comprometida por uma oxidação enzimática ou espontânea de sulfidrilos das proteínas ou pela diminuição das interações hidrofóbicas das proteínas (HILLER e LORENZEN, 2011). Portanto, o aumento da intenção de compra deve estar associado a diminuição das interações hidrofóbicas das proteínas modificando por sua vez o aroma do produto.

**Tabela 5.25** - Notas sensoriais de aceitação para as bebidas lácteas integral e com remoção parcial de colesterol, com 15% de polpa de siriguela

<b>Parâmetros</b>	<b>Bebida láctea integral com 15% de polpa</b>	<b>Bebida láctea com remoção (MP) com 15% de polpa</b>	<b>Bebida láctea com remoção (MIP) com 15% de polpa</b>
Aparência	6,53±1,45 <sup>a*</sup>	7,03±1,18 <sup>a*</sup>	6,80±1,29 <sup>a*</sup>
Aroma	6,87±1,69 <sup>a*</sup>	6,87±1,47 <sup>a*</sup>	6,83±1,83 <sup>a*</sup>
Sabor	6,20±1,89 <sup>a*</sup>	6,70±1,70 <sup>a*</sup>	6,73±1,91 <sup>a*</sup>
Textura	6,83±1,46 <sup>a*</sup>	6,87±1,52 <sup>a*</sup>	6,47±2,09 <sup>a*</sup>
Impressão Global	6,43±1,67 <sup>a*</sup>	6,63±1,54 <sup>a*</sup>	6,77±1,77 <sup>a*</sup>

\*Médias acompanhadas de letras iguais, na mesma linha, não diferem entre si significativamente quanto à aceitação das bebidas lácteas com 15% de polpa de siriguela ( $\alpha < 0,05$ ).

A atividade do kefir causa mudanças químicas específicas liberando compostos voláteis com grupo carbonil, como o ácido láctico e acético, acetaldeído, cetonas e diacetil (FARNWORTH, 2005; ERTEKIN e GUZEL-SEYDIM, 2010), que contribuem para a percepção da acidez, aroma e sabor da bebida láctea.

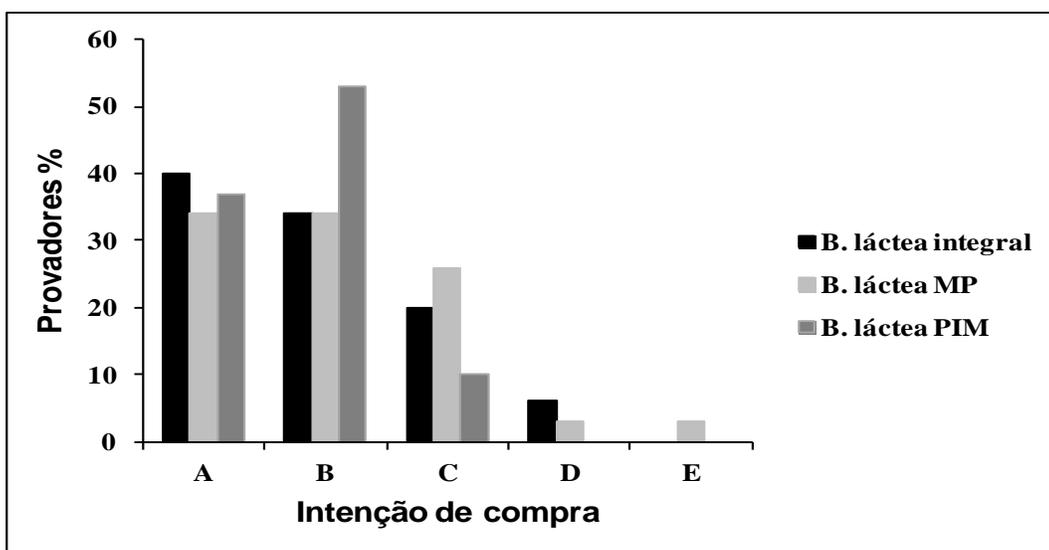
**Tabela 5.26** - Notas sensoriais de aceitação para as bebidas lácteas integral e com remoção parcial de colesterol, com 30% de polpa de siriguela

<b>Parâmetros</b>	<b>Bebida láctea integral com 30% de polpa</b>	<b>Bebida láctea com remoção (MP) com 30% de polpa</b>	<b>Bebida láctea com remoção (MIP) com 30% de polpa</b>
Aparência	6,97±1,18 <sup>a*</sup>	6,43±1,75 <sup>a*</sup>	6,53±1,59 <sup>a*</sup>
Aroma	6,80±1,44 <sup>a*</sup>	7,03±1,56 <sup>a*</sup>	6,73±1,51 <sup>a*</sup>
Sabor	6,90±1,53 <sup>a*</sup>	7,00±1,80 <sup>a*</sup>	6,80±1,67 <sup>a*</sup>
Textura	6,70±1,39 <sup>a*</sup>	6,90±1,78 <sup>a*</sup>	6,27±1,38 <sup>a*</sup>
Impressão Global	6,97±1,24 <sup>a*</sup>	6,90±1,60 <sup>a*</sup>	6,63±1,40 <sup>a*</sup>

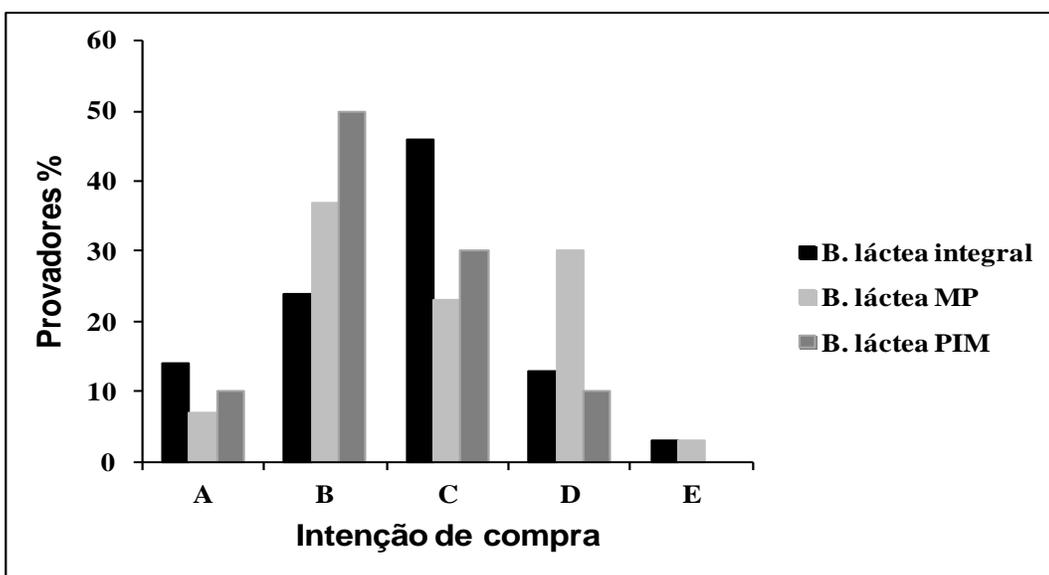
\*Médias acompanhadas de letras iguais, na mesma linha, não diferem entre si significativamente quanto à aceitação das bebidas lácteas com 30% de polpa de siriguela ( $\alpha < 0,05$ ).

As Figuras 5.19 e 5.20 representam a intenção de compra das bebidas lácteas com adição de 15 e 30% de polpa de mangaba respectivamente, atribuídas pelos provadores. Observa-se que as bebidas lácteas com adição de 15 e 30% de polpa de mangaba alcançaram 90 e 60% da taxa positiva da intenção de compra dos provadores respectivamente. Essa preferência dos provadores pela bebida láctea com 15% de polpa de mangaba pode ter ocorrido devido à menor quantidade de água presente na polpa deixando o produto com viscosidade maior.

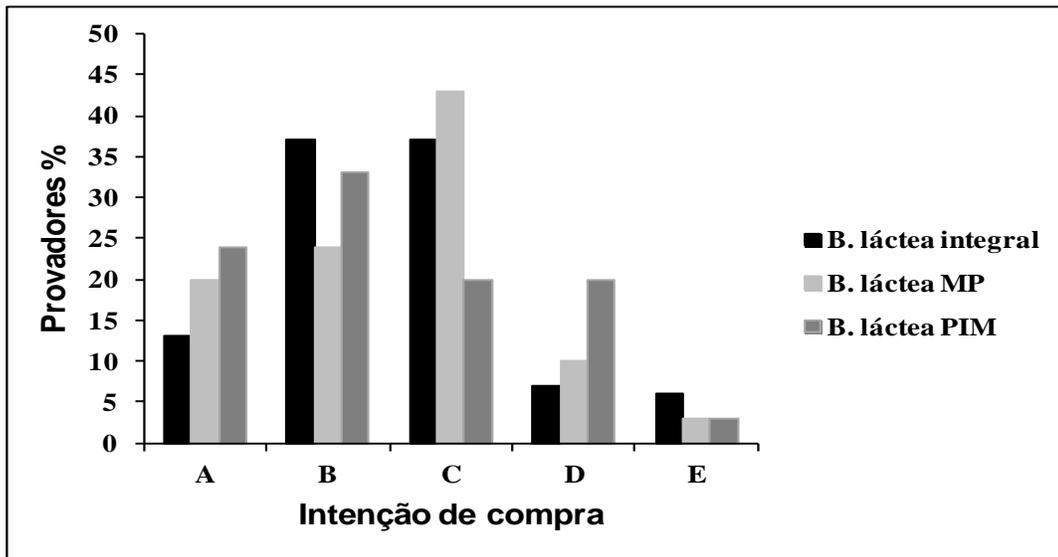
Com relação a taxa positiva da intenção de compra da bebida láctea com adição de 15 e 30% de polpa de siriguela (Figuras 5.21 e 5.22) foram 57 e 60% respectivamente, observa-se que, ocorre um comportamento inverso ao da adição da polpa de mangaba, em que a preferência dos provadores foi para a bebida láctea com maior concentração. Possivelmente pela siriguela apresentar menos aroma em comparação com a mangaba que é um fruto com aroma forte. De acordo com os resultados obtidos neste estudo pode-se considerar o produto como promissor devido à aceitação na análise sensorial e a indicação de compra entre 57 e 90% dos novos produtos pelos provadores.



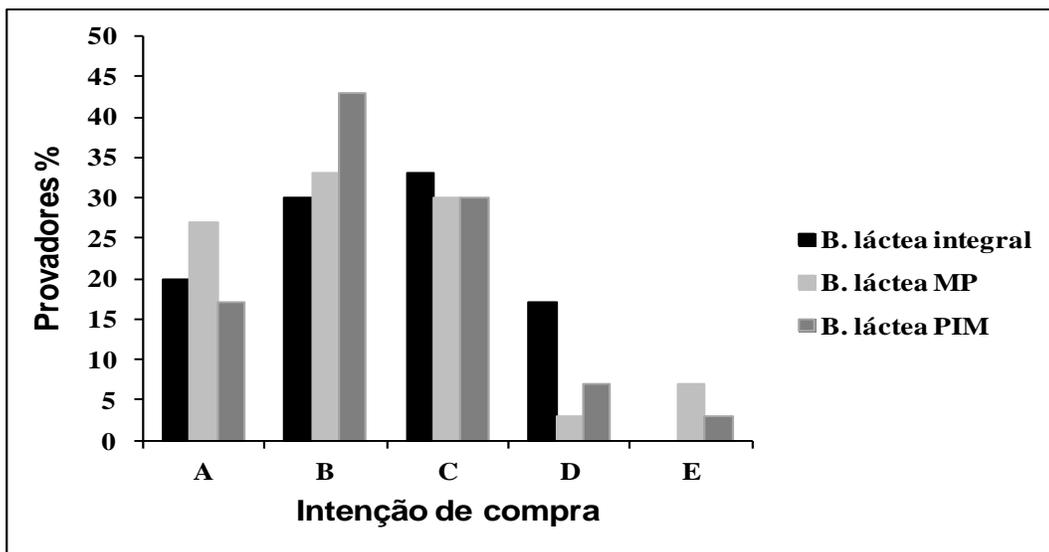
**Figura 5.19** - Percentual de intenção de compra para a bebida láctea integral e as bebidas lácteas com remoção parcial de colesterol, com 15% de polpa de mangaba. A – eu certamente compraria; B – provavelmente compraria; C – não sei se compraria; D – provavelmente não compraria e E – certamente não compraria.



**Figura 5.20** - Percentual de intenção de compra para a bebida láctea integral e as bebidas lácteas com remoção parcial de colesterol, com 30% de polpa de mangaba. A – eu certamente compraria; B – provavelmente compraria; C – não sei se compraria; D – provavelmente não compraria e E – certamente não compraria.



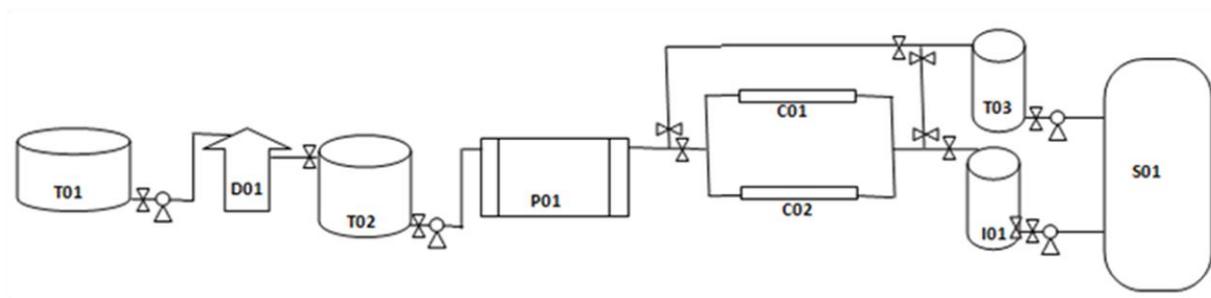
**Figura 5.21** - Percentual de intenção de compra para a bebida láctea integral e as bebidas lácteas com remoção parcial de colesterol, com 15% de polpa de siriguela. A – eu certamente compraria; B – provavelmente compraria; C – não sei se compraria; D – provavelmente não compraria e E – certamente não compraria.



**Figura 5.22** - Percentual de intenção de compra para a bebida láctea integral e as bebidas lácteas com remoção parcial de colesterol, com 30% de polpa de siriguela. A – eu certamente compraria; B – provavelmente compraria; C – não sei se compraria; D – provavelmente não compraria e E – certamente não compraria.

## 5.18. PROPOSTA DE ADEQUAÇÃO DE LAYOUT DAS INSTALAÇÕES

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, foi sugerida a introdução de uma ou mais colunas de adsorção contendo polímero impresso molecular (PIM), com a finalidade de remover parte do colesterol do leite. As colunas poderão ser colocadas na jusante do pasteurizador da linha de produção. A Figura 5.23 apresenta o fluxograma de adequação do Layout das instalações de um laticínio.



**Figura 5.23** - Fluxograma de adequação de Layout das instalações de um laticínio.

Em que:

T01; T02 e T03 – Tanque 01; Tanque 02; Tanque 03;

D01 – Desnatadeira ou Padronizadora 01;

P01 – Pasteurizado 01;

C01 e C02 – Coluna de adsorção do colesterol 01 e 02;

I01 – Iogurteira 01;

S01 – Sala de envase 01;

⋈ - Válvula;

⊕ - Bombas.

## 6. CONCLUSÃO FINAL

Os produtos funcionais e probióticos se caracterizam por oferecer vários benefícios à saúde, além do valor nutritivo inerente à sua composição química, podendo desempenhar um papel potencialmente benéfico na redução do risco de doenças crônicas degenerativas. As principais conclusões obtidas, com a realização deste trabalho foram:

1 - Na aplicação do polímero impresso molecular e da matriz pura em coluna de adsorção do colesterol do leite no processo em batelada a temperatura ambiente, a melhor condição de remoção de colesterol foi a utilização de uma coluna com 3 cm de altura do leito do adsorvente PIM para a percolação do leite;

2 - No processo de fluxo contínuo, os parâmetros mais eficientes para a curva de remoção de colesterol com temperatura controlada foi o uso de uma coluna com 3 cm de altura do recheio do leito (PIM) e vazão de 3 mL/min do leite percolado na coluna de adsorção;

3 - Na ampliação da escala da coluna no estudo de adsorção e dessorção do colesterol do leite foram verificadas as melhores condições do processo contínuo do adsorvente PIM. A adsorção mais eficiente foi de cerca de 51% de remoção do colesterol do leite em 6 h de processo e apresentou um menor tempo de dessorção do colesterol, cerca de 3 h;

4 - Neste trabalho foi sugerido o Layout da linha de produção de um laticínio com a introdução de uma ou mais colunas de adsorção contendo polímero impresso molecular (PIM);

5 - A bebida láctea utilizando o leite percolado na coluna recheada com os polímeros impressos molecularmente (PIM) em processo contínuo, apresentou uma maior redução de colesterol no produto final, atingindo cerca de 42,42% para a bebida sem adição de polpa de fruta, 44,65 e 48,25% para as bebidas com 15 e 30% de polpa de mangaba respectivamente e 43,20 e 44,47%, para as bebidas com 15 e 30% de polpa de siriguela respectivamente;

6 - A fermentação em biorreator de bancada realizada nas condições citadas anteriormente para o leite integral e leite com remoção PIM, verificou-se que a melhor condição foi a estática, por apresentar uma viscosidade máxima, o maior nº de células viáveis e o pH ficou constante em menor tempo, 12 e 10 h respectivamente;

7 - As bebidas lácteas desenvolvidas neste estudo após o percurso gastro-intestinal apresentaram valores com grandeza variando entre  $10^4$  a  $10^6$  UFC/mL, e que de acordo com a Legislação Brasileira é caracterizado produto probiótico;

8 - As análises sensoriais mostram que leite integral com remoção e sem remoção parcial do colesterol são estatisticamente diferentes. No entanto o leite com remoção PIM apresentou 57% da intenção de compra dos provadores;

9 - A taxa positiva da intenção de compra das bebidas láctea com remoção parcial de colesterol cerca de 74% indicaram que comprariam o novo produto utilizando o leite com teor de colesterol reduzido obtido a partir da coluna com recheio de PIM. No entanto, com adição de 15 e 30% de polpa de mangaba e 15 e 30% de polpa de siriguela, os provadores indicaram sua preferência de intenção de compra em 90, 60, 57 e 60% respectivamente, para os produtos obtidos com leite com remoção parcial utilizando PIM.

A partir dos resultados apresentados ao longo do trabalho, pode-se concluir que os objetivos inicialmente propostos foram alcançados, ou seja, desenvolvimento de produtos lácteos fermentados por grãos de kefir com teor de colesterol reduzido e saborizados com frutas tropicais por uma nova metodologia, ainda não tão difundida na literatura.

Nesse aspecto, a preocupação com o desenvolvimento de tecnologias que aproveitem matérias-primas do estado de Sergipe de modo a agregar valor ao agronegócio principalmente na bacia de leiteira do norte do estado com os Arranjos Produtivos Locais (APL) foi atingido cuja a finalidade foi o desenvolvimento da bebida láctea com teor de colesterol reduzido e saborizados com frutas tropicais.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, E. S.; PINHEIRO, M. A. L. N.; TORRES, E. A. F. S. Elaboração de um Sistema de Pontos para Intervenções Dietéticas em Indivíduos Hiperlipidêmicos, *Revista Brasileira de Cardiologia*, 23(5), p. 18-25, 2010.

ALMEIDA, F. A.; ÂNGELO, F. F.; SILVA, S. L.; SILVA, S. L. Análise sensorial e microbiológica de kefir artesanal produzido a partir de leite de cabra e de leite de vaca, *Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"*, nº 378, 66, p. 51-56, 2011.

ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, M. A. Molecular imprinted polymers for drug delivery, *Journal of Chromatography B- Analytical Technologies in the Biomedical and life Sciences*, 804(1), p. 231-245, 2004.

ALVES, C. C. O. **Pós obtidos da polpa de pequi (*Caryocar brasiliensi Camb.*) liofilizada: higroscopicidade e microrstrutura.** Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Lavras, 146p, 2007.

AN, F.; GAO, B.; HUANG, X.; ZHANG, Y.; LI, Y.; XU, Y.; ZHANG, Z.; GAO, J.; CHEN, Z. Selectively removal of Al(III) from Pr(III) and Nd(III) rare earth solution using surface imprinted polymer, *Reactive & Functional Polymers*, (2012), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.22.08.2012>.

ANSELMO, G. C. S.; MATA, M. E. R. M. C.; ARRUDA, P. C.; SOUSA, M. C. Determinação da higroscopicidade do cajá em pó por meio da secagem por atomização, *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 6(2), p. 58-65, 2006.

ARROYO, P. A.; BARROS, M. A. S. D.; QUERINO, M. V.; FERREIRA JR., I. A.; SOUSA AGUIAR, E. F. “Troca multicomponente dinâmica em sistemas zeolíticos”, *Revista Tecnológica*, Ed. Especial, p. 31-38, 2000.

AUGUSTO, P. E. D.; CRISTIANINI, M.; IBARZ, A. Effect of temperature on dynamic and steady-state shear rheological properties of siriguela (*Spondias purpurea* L.) pulp, *Journal of Food Engineering*, 108, p. 283-289, 2012.

BARROS, M. A. S. D. **Avaliação do mecanismo de troca iônica de cromo em sistemas zeolíticos**. Tese de doutorado, PEQ/DEQ/UEM, Maringá – PR, 2003.

BENSMIRA, M.; JIANG, B. Effect of some operating variables on the microstructure and physical properties of a novel Kefir formulation, *Journal of Food Engineering*, 108, p. 579-584, 2012.

BICAS, J. L.; MOLINA, G.; DIONÍSIO, A. P.; BARROS, F. F. C.; WAGNER, R.; MARÓSTICA, M. R.; PASTORE, G. M. Volatile constituents of exotic fruits from Brazil, *Food Research International*, 44, p. 1843-1855, 2011.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Microbiologia: Conceitos e aplicações**. 2 ed, Makron Books, São Paulo, 2001.

BORTOLOZO, E. Q.; QUADROS, M. H. R. Aplicação de inulina e sucralose em iogurte, *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 01(01), p. 37-47, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, disponível em: < [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm) > acesso em : 26/04/2005.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Decreto nº 2.224 de 4 de junho de 1997, Diário Oficial da União, Brasília, 5 jun. 1997, Seç. I, p. 11555 (altera dispositivos do Dec. nº 30.691 de 29 de março de 1952).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução n.5 de 13 de Novembro de 2000. (D.O.U. 02/01/2001) Dispõe sobre o regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados.

CALDEIRA, L. A.; FERRÃO, S. P. B.; FERNANDES, S. A. A.; MAGNAVITA, A. P. A.; SANTOS, T. D. R. Desenvolvimento de bebida láctea sabor morango utilizando diferentes níveis de iogurte e soro lácteo obtido com leite de búfala, *Ciência Rural, Santa Maria*, 40(10), p. 2193-2198, 2010.

CALVERT, F. R. J. Reduced Carbohydrate Milk Product and Process for Manufacturing Such Milk Prodct. Patente. WO2004/075666 A2, 2004.

CARPINÉ, D. **Recuperação do aroma álcool feniletílico por adsorção em batelada e em coluna.** Dissertação de mestrado, Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2011.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos.** Campinas, SP: Editora da Unicamp, 1999.

CÉSAR, I. C.; PIANETTI, G. A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45, p. 235-240, 2009.

CHEN, L.; XU, S.; LI, J. Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications, *Chem. Soc. Rev*, 40, p. 2922-2942, 2011.

CHIU, S. H.; CHUNG, T. Z.; GIRIDHAR, R.; WU, W. T. Immobilization of  $\beta$ -cyclodextrin in chitosan beads for separation of cholesterol from egg yolk. *Food Research International*, 2004, 37, 213-223.

CIRILLO, G.; CURCIO, M.; PARISI, O. I.; PUOCI, F.; LEMMA, F.; SPIZZIRRI, U. G.; RESTUCCIA, D.; PICCI, N. Molecularly imprinted polymers for the selective extraction of glycyrrhizic acid from liquorice roots, *Food Chemistry*, 125, p. 1058-1963, 2011.

COSTA, M. C.; BRITO, L. L.; BARBOSA, P. J. B.; LESSA, I. Adiponectina e baixo risco cardiometabólico em obesas, *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia*, 50(2), p. 146-154, São Paulo, 2011.

CUNHA, T. M.; CASTRO, F. P.; BARRETO, P. L. M.; BENEDET, H. D.; PRUDÊNCIO, E. S. Avaliação físico-química, microbiológica e reológica de bebida láctea e leite fermentado adicionados de probióticos, *Ciências Agrárias*, 29(1), p. 103-116, 2008.

DALLA SANTA, O. R.; CARDOSO, F.; MOTA, G.; RIGO, M.; BASTOS, R. G.; DALLA SANTA, H. S. Obtenção e avaliação sensorial de bebida láctea fermentada com grãos de Kefir. In: *SEMINÁRIO DE PESQUISA*, 18, Guarapuava: Unicentro, 2006.

DMJ Biotech Corp, Disponível na internet via [://www.kefir.co.kr/eng/kefir-grain.php](http://www.kefir.co.kr/eng/kefir-grain.php), Acessado em 09/02/2009.

DUDO, A.; CHOI, D. H.; SCHEUFELE, D. A. Food nanotechnology in the news. Coverage patterns and thematic emphase during the last decade, *Appetite*, 56, p. 78-89, 2011.

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P.C. *Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação*. São Paulo: Artliber, 2006.

ERTEKIN, B.; GUZEL-SEYDİM, Z. Effect of fat replaces on kefir quality, *Journal of Science Food Agriculture*, 90(4), p. 1-6, 2010.

FARRINGTON, K.; MAGNER, E.; REGAN, F. Predicting the performance of molecularly imprinted polymers: Selective extraction of caffeine by molecularly imprinted solid phase extraction, *Analytica Chimica ACTA*, 566, p. 60-68, 2006.

FAO/OMS, Food Standars, Codex Alimentarius, Disponível na internet via [www.url: http://www.codexalimentarius.net/web/standard\\_list.do?lang=em](http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=em), Codex Standard 243, 2003, Acessado em 14/02/2009.

FARNWORTH, E. R. Kefir – a complex probiotic. In: *Food Science and Technologies Bulletin: Functional Foods*, 2(1), p.1-17, Canadá, 2005.

FERREIRA, C. L. L. F. **Produtos Lácteos Fermentados: Aspectos bioquímicos e tecnológicos**. 2 ed. Viçosa: UFV, 2001.

FERREIRA, L. R.; DIAS, H. M. A. M.; RODELLA, J. R. T.; DALLAGO, P. Z.; PEREIRA, P. G. C.; BERBICZ, F.; MATIOLI, G. REMOÇÃO DO COLESTEROL DA MANTEIGA COM CICLODEXTRINA. In: Anais do XVI Encontro Anual de Iniciação Científica, EAIC, Setembro 2007.

FERNANDES, M. F. M.; FILGUEIRAS, C. A. L. Um Panorama da Nanotecnologia no Brasil (e seus macro-desafios), *Química Nova*, 31(8), p. 2205-2213, 2008.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1992, 307p.

FRANÇOSO, I. L. T.; COUTO, M. A. L.; CANNIATTI-BRAZOCA, S. G.; ARTHUR, V. Alterações físico-químicas em morangos (*Fragaria anassa* Duch.) irradiados e armazenados, *Ciências e Tecnologia de alimentos*, 28(3), p. 614-619, 2008.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; ANTONI, G. L. Inhibitory Power of Kefir: The Role of Organic Acids, *Journal of Food Protection*, 63, p. 364-369, 2000.

GAMA, J. A. **Desenvolvimento de Produto Lácteo Probiótico a Base de Kefir**. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Processos, Universidade Tiradentes – UNIT, Aracaju, SE, Brasil, 2010.

GAVRILOVIC, I.; MITCHELL, K.; BRAILSFORD, A. D.; COWAN, D. A.; KICMAN, A. T.; ANSELL, R. J. A molecularly imprinted receptor for separation of testosterone and epitestosterone, based on a steroidal cross-linker, *Steroids*, 2011.

GEANKOPLIS, C. J., **Transport Processes and Unit Operations**, 3rd ed., PTR Prentice Hall, USA, 1998.

GHAZINOORY, S.; DIVSALAR, A.; SOOFI, A. S. A new definition and framework for the development of a national technology strategy: The case of nanotechnology for Iran, *Technological Forecasting & Social Chang*, 76, p 835-848, 2009.

GLIBOWSKI, P.; KOWALSKA, A. Rheological, texture and sensory properties of kefir with high performance and native inulin, *Journal of Food Engineering*, 111, p. 299-304, 2012.

GONKU, A.; ALPKENT, Z. Sensory and chemical properties of white pickled cheese produced using, yoghurt or a commercial cheese culture as a starter, *International Dairy Journal*, 15, p. 771-776, 2005.

GUO, Z.; WANG, J.; YAN, L.; CHEN, W.; LIU, X.; ZHANG, H. In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains, *Food Science and Technology*, 42, p. 1640-1646, 2009.

GUPTA, R.; KUMAR, A. Synthesis and characterization of sol-gel-derived molecular imprinted polymeric materials for cholesterol recognition, *J Sol-Gel Sci Technol.*, 58, p. 182-194, 2011.

GUTIERREZ, R. M. V.; MONTEIRO FILHA, D. C.; KAUSS, I. F.; OLIVEIRA, M. J. Complexo eletrônico: Displays e nanotecnologia, *BNDS Setorial*, 23, p. 27-84, 2006.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; KOK-TAS, T.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Review: Functional Properties of Kefir, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, p. 261-268, 2011.

HAN, E. M.; KIM, S. H.; AHN, J.; KWAK, H. S. Optimizing cholesterol removal from cream using  $\beta$ -cyclodextrin cross-linked with adipic acid, *International Journal of Dairy Technology*, 6(1) p. 143-147, 2007.

HE, H.; FU, G.; WANG, Y.; CHAI, Z.; JIANG, Y.; CHEN, Z. Imprinting of protein over silica nanoparticles via surface graft copolymerization, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, p. 760-765, 2010.

HILLER, B.; LORENZEN, P.C. Properties of set-style skim milk yoghurt as affected by enzymatic or Maillard reaction induced milk protein oligomerisation, *LWT – Food Science and Technology*, 44, p. 811-819, 2011.

HOSSAIN, M. A.; MIHARA, H.; UENO, A. Fluorescence resonance energy transfer in a novel cyclodextrin-peptide conjugate for detecting steroid molecule, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13(24), 4305-4308, 2003.

<http://www.quimica.com.br/revista/qd450/achema4.html>, consultado em 14/09/2007.

<http://www.kefir.co.kr/eng/kefir-grain.php>, consultado em 09/02/2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE (2010). Disponível na internet em: <http://cenariosdesenvolvimento.blogspot.com/2010/08/expansao-da-pecuaria-de-leite-em.html>.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. (2005) **Normas analíticas, métodos químicos e físicos de alimentos**. 4.ed. SãoPaulo: IAL,. 1, 553p.

IVANOVA, L. N; ROZHKOVA, I. V; SEMENIKHINA, V. F; KNYAZEVA, T. N; CHAGAROVSKY, A. P. Process for Producing Kefir. Patente. US4957752 A, 1990.

JIN, G.; ZHANGA, B.; TANGA, Y.; ZUOA, X.; WANGC, S.; TANGA, J. Imprinted functionalized sílica sol-gel for solid-phase extraction of triazolamin, *Talanta*, 84, p. 644-650, 2011.

KEMPKA, A. P.; KRUGER, R. L.; VALDUGA, E.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R.; OLIVEIRA, D. Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego utilizando substratos e cultura probiótica, *Ciências e Tecnologia dos Alimentos*, 28(Supl.), p. 170-177, 2008.

KOKSOY, A.; KILIC, M. Use of hydrocolloids in textural stabilization of a yoghurt drink, ayran, *Food Hydrocolloids*, 18, p.593-600, 2004.

LEE, S.C.; CHUANG, F.L.; TSAI, Y.L.; CHEN, H. Studies on the preparation and properties of sol-gel molecularly imprinted polymer based on tetraethoxysilane for recognizing sulfonamides, *J. Polym Res.*, 17, p. 737-744, 2010.

LEITE, Z. T. C.; VAITSMAN, D. S.; DUTRA, P. B. Leite e alguns de seus derivados – da antiguidade à atualidade, *Química Nova*, 29 (4), p. 876-880, 2006.

LEITE, A. M. O.; MAYO, B.; RACHID, C. T. C. C.; PEIXOTO, R. S.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F.; DELGADO, S. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis, *Food Microbiology*, 31, p. 215-221, 2012.

LENHINGER, A. L.; NELSON D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**, Ed. Sarvier, Rio de Janeiro, 1995.

LEON, J.; SHAW, P. E. Spondias: the red mombin and related fruits In: *Nagy, S. Shaw, P.E., Wardowski, W.F. Fruits of tropical and subtropical origin. Composition, properties and uses.* Lake Alfred: FSS. p. 116-126, 1990.

LEONARDI, A. L.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; ARTHUR, V. Disponibilidade de cálcio em leite bovino tratado por raios gama, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31 (1), p. 31-40, 2011.

LI, G. Intestinal Probiotics: Interactions with Bile Salts and Reduction of Cholesterol, *Procedia Environmental Sciences*, 12, p. 1180-1186, 2012.

LIU, Y.; WU, L.; ZHAO, X.; LUO, A. Synthesis and Adsorption Property of Hydrophilic Uridine Molecularly Imprinted Polymers, *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 17, p. 38-47, 2012.

LUCEY, J.A.; SINGH, H. Formation and physical properties of acid milk gels: a review, *Food Research International*, 30 (7), p. 529-542, 1998.

MAGALHÃES, K. T.; DRAGONE, G.; PEREIRA, G. V. M.; OLIVEIRA, J. M.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A.; SILVA, J. B. A.; SCHWAN, R. F. Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir, *Food Chemistry*, 126, p. 249-253, 2011.

MAINVILLE, I.; ARCAND, Y.; FARNWORTH, E. R. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics, *International Journal of Food Microbiology*, 99, p. 287-296, 2005.

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

MCCABE, W. L.; SMITH, J. C.; HARRIOT, P. UNIT OPERATIONS OF CHEMICAL ENGINEERING, **McGraw-Hill International**, Ed. 6th ed., 2001.

MARTINS, L. P.; SILVA, S. M.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C. Desenvolvimento de frutos de siriguelira (*Spondias purpurea* L.), *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25(1), p. 11-14, 2003.

MARTIN, A. F. **Armazenamento do iogurte comercial e o efeito na proporção das bactérias lácticas**. Dissertação de Mestrado em Ciência, Escola Superior de Agricultura “Luis de Quiroz”, São Paulo, SP, Brasil, 2002.

MONTANUCI, F. D.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H. Caracterização sensorial e aceitação de Kefir adoçado integral e desnatado com inulina, *Braz. J. Food Technol.*, 6º SENSIBER, p. 79-90, 19-21, 2010.

NOVION, H. P. I.; BAPTISTA, F. M. O certificado de procedência legal no Brasil: estado da arte da implementação da legislação. Documentos de investigación: iniciativa para la prevención de la biopiratería. Instituto Socioambiental, ano 2, n. 5, 2006. Disponível

em:<<http://www.socioambiental.org/inst/docs/download/estudocertificadopatentes.pdf>>.

Acessado em: 15 jul. 2010.

OLIVEIRA, A. L.; SILVA, M. G. F.; SOBRAL, P. J. A.; OLIVEIRA, C. A. F.; HABITANTE, A. M. Q. B. Propriedades físicas de misturas para sherbet de mangaba, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40(6), p. 581-586, 2005.

OLIVEIRA, C. P.; SILVA, J. A. Leite fermentado probiótico e suas implicações na saúde, *Revista Verde*, 6(3), p. 25-31, 2011.

ORDONEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

OTLES, S.; CAGINDI, O. Kefir: Dairy composition, nutritional and therapeutic Aspects In Pakistan, *Journal of Nutrition*, p. 54-59, Turquia, 2003.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e aplicações**. 2ªed, Makron Books, São Paulo, 1996.

PEREIRA, B. M.; LIMA, F. R. B.; MENEZES, A. C. S.; SILVA, G. M. Avaliação sensorial de bebidas lácteas fermentadas sabor cajá com potencial probiótico. In: *X Jornada De Ensino, Pesquisa E Extensão – JEPEX 2010 – UFRPE: Recife, 2010*.

PLESSAS, S.; PHERSON, L.; BEKATOROU, A.; NIGAM, P.; KOUTINAS, A. A. Bread making using kefir grains as baker's yeast, *Food Chemistry*, 93, p. 585-589, 2004.

PUCI, F.; LEMMA, F.; CIRILLO, G.; CURCIO, M.; PARISI, O. I.; SPIZZIRRI, G.; PICCI, N. N. New restricted Access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective recognition/release in water media, *European Polymer Journal*, 45, p. 1634-1640, 2009.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDEM, C. S. I. Método de extração e / ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica, *Química Nova*, 24(1), p. 68-76, 2001.

RIBEIRO, M. M. **Desenvolvimento e caracterização sensorial de iogurte diet sabor morango enriquecido com concentrado protéico de soro.** Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, 2008.

ROCHA, C.; COBUCCI, R. M. A.; MAITAN, V. R.; SILVA, O. C. Elaboração e avaliação de iogurte sabor frutos do cerrado, *B. CEPPA*, 26(2), p. 255-266, 2008.

ROSA, L. P.; SILVA, M. K. C.; SOUSA, V. M.; ROSANOVA, C. Análises sensoriais comparativas entre leite de cabra e leite de vaca pasteurizados. Instituto Federal de Educação, *Ciência e Tecnologia*, Tocantins, 2010.

ROSTAMIZADEH, K.; VAHEDPOURB, M.; BOZORGIB, S. Synthesis, characterization and evaluation of computationally designed nanoparticles of molecular imprinted polymers as drug delivery systems, *International Journal of Pharmaceutics*, 424, p. 67-75, 2012.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 42(1), 2006.

SANTIAGO-SILVA, P.; LABANCA, R. A.; GLORIA, M. B. A. Functional potential of tropical fruits with respect to free bioactive amines, *Food Research International*, 44, p. 1264-1268, 2011.

SANTOS, C. T.; MARQUES, G. M. R.; FONTAN, G. C. R.; FONTAN, R. C. I.; BONOMO, R. C. F.; BONOMO, P. Elaboração e caracterização de uma bebida láctea fermentada com polpa de umbu (*Spondias tuberosa* sp.), *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 8(2), p. 111-116, 2006.

SANTOS, C. T.; COSTA, A. R.; FONTAN, G. C. R.; FONTAN, R. C. I.; BONOMO, R. C. F. Influência da concentração de soro na aceitação sensorial de bebida láctea fermentada com polpa de manga, *Alimentos. Nutrição.*, 19(1), p. 55-60, 2008.

SANTOS, P. V.; FERREIRA, C. L. L. Kefir: o alimento funcional. In: *Leites & Derivados*, 2008.

SANTOS, A. F.; SILVA, S. M.; MENDONÇA, R. M. N.; ALVES, R. E. Conservação pós-colheita de mangaba em função da maturação, atmosfera e temperatura de armazenamento, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29(1), p. 85-91, 2009.

SANTOS, M. L. C.; SIMÃO, I.; SANTANA, C. A.; TOLEDO, V. C. V.; LUSTOSA, M. C. S.; ROSA, F. A. Bebida Láctea Sabor Paçoca/Amendoim. Patente. PI0505132-0 A, 2007.

SELLERGRÉN, B.; WIESCHEMEYER, J.; BOOS, K. S.; SEIDEL, D. Imprinted Polymers for Selective Adsorption of Cholesterol from Gastrointestinal Fluids, *Chemistry of Materials*, 10, p. 4037-4046, 1998.

SENNA, E. Processo para Produção Industrial de Composição de Uso Farmacêutico, Cosmético e Alimentício á Base de Levedura de Kefir. Patente. PI0703742-2 A2, 2009.

SGARBIERI, V. C. Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite, *Braz. J. Food Technol.*, 8(1), p. 43-56, 2005.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001.

SILVA, K. R.; SHEILA, A. R.; FILHO, L. X.; LIMA, A. S. Antimicrobial Activity of Broth Fermented with Kefir Grains, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152, p. 316-325, 2009.

SILVA, E. V. C.; MEDEIROS, L. F. P. S.; MONTEIRO, D. B.; SILVA, G. F. Elaboração de bebida láctea pasteurizada sabor bacuri enriquecida com pólen, *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 4(1), p. 01-09, 2010.

SMIDDY, M.A.; HUPPERTZ, T.; RUTH, S.M.V. Triacylglycerol and melting profiles of milk fat from several species, *International Dairy Journal*, 24, p. 64-69, 2012.

SOARES JÚNIOR, M. S.; CALIARI, M.; VERA, R.; SOUZA, A. G. Conservação pós-colheita de mangaba sob refrigeração e modificação da atmosfera de armazenamento, *Pesquisa agropecuária Tropical*, 38(2): 78-86, 2008.

SOARES, C. M. F.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; SANTOS, O. A. A.; CASTRO, H. F. Molecular imprinting of B-cyclodextrin/cholesterol template into a silica polymer for cholesterol separation, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57, p. 79-82, 2007.

SOARES, D. S.; FAI, A. E. C.; OLIVEIRA, A. M.; PIRES, E. M. F.; STAMFORD, T. L. M. Aproveitamento de soro de queijo para produção de iogurte probiótico, *Arquivo Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63(4), p. 996-1002, 2011.

SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S.; SANTOS, A. V.; FREITAS, L. S.; BALIEIRO, A. L.; JESUS, M. S.; SANTOS, F. M. S.; RESENDE, I. T. M.; LIMA, D. B. M.; SANTANA, R. F. Processo Industrial de Obtenção de Leite e Derivados de Teor de Colesterol Reduzido. Depósito de pedido de patente com nº 0000221108562820, 20 de Setembro de 2011.

SOCANTAYPE, F. V. H. **Remoção de colesterol e fracionamento do óleo de manteiga com etano supercrítico**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

SOUSA, M. D.; BARBOSA, C. M. Polímeros com capacidade de reconhecimento molecular no controle da libertação de fármacos parte 1: Síntese e caracterização, *Química Nova*, 32, p. 1609-1619, 2009.

STEIDLER L.; HANS, W.; SCHOTTE L. Treatment of murine colitis by *Lactobacillus lactis* secreting interleukin-10, *Science*, 28(9), p. 1352-1355, 2000.

SUBRA, P.; VEGA-BANCEL, A.; REVERCHON, E. Breakthrough curves and adsorption isotherms of terpene mixtures in supercritical carbon dioxide, *The Journal of Supercritical Fluids*, 12 (1), p. 43-57, 1998.

TETRA PAK. Soluções em filtração por membranas para indústria de laticínios. Disponível em: [www.tetrapark.com](http://www.tetrapark.com).

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutoligossacarídeo sobre a população de bactérias probióticas em bebidas fermentadas, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41(3), p. 393-400, 2005.

THAMER, K. G. PENNA, A. L.B Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico, *Ciências e Tecnologia dos Alimentos*, 26(3), p. 589-595, 2006.

TOMINAGA, Y.; KUBO, T.; YASUDA, K.; KATO, K.; HOSOYA, K. Development of molecularly imprinted porous polymers for selective adsorption of gaseous compounds, *Microporous and Mesoporous Materials*, 156, p. 161-165, 2012.

TORRES, E. A. F. S.; CAMPOS, N. C.; DUARTE, M.; GARBELOTTI, M. L.; PHILIPPI, S. T.; RODRIGUES, R. S. M. Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 20(2), p. 145-150, 2000.

TREYBAL, R. E. **Mass-Transfer Operations**. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, 1980.

UBHAYASEKERA, S. J. K. A.; VERLEYEN, T.; DUTTA, P. C. Evaluation of GC and GC-MS methods for the analysis of cholesterol oxidation products, *Food Chemistry*, 84, p. 149-157, 2004.

VALENTE, G., F., S. **Remoção de colesterol da gordura do leite por adsorção em sílica gel**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

VERHEYEN, E.; SCHILLEMANS, J. P.; WIJK, M. V.; DEMENIEX, M. A.; HENNINK, W. E.; NOSTRUM, C. F. V. Challengers for the effective molecular imprinting of proteins, *Biomaterials*, xxx, p. 1-13, 2011.

VINDEROLA, G. Dried cell-free fraction of fermented milks: new functional additives for the food industry, *Trends in Food Science & Technology*, 19, p. 40-46, 2008.

VIEIRA NETO, R. D. Frutíferas potenciais para os tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas, *Embrapa Tabuleiros Costeiros*, p. 117-160, 2002.

XANTHOPOULOS, V.; IPSILANDIS, C. G.; TZANETAKIS, N. Use of a selected multi-strain potential probiotic culture for the manufacture of set-type yogurt from caprine Milk, *Small Ruminant Research*, 106, p. 145-153, 2012.

XAVIER, L. J.; LIMA, A. S.; RODRIGUES, S. A.; LIMA, A. M. X. A. Produto Fermentado de Carboidratos para o Tratamento de infecções. Patente. PI0300108-3.

ZACARCHENCO, P. B.; MASSAGUER-ROIG, S. Properties of *Streptococcus thermophilus* fermented milk containing variable concentrations of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus*, *Brazilian Journal of Microbiology*. 37(3), p. 338-344, 2006.

ZHANG, H.; WEI, Y.; ZHOU, J.; XU, Z.; TIAN, S.; HUANG, H.; HE, J. Preparation and Application of a Molecular Imprinting Matrix Solid Phase Dispersion Extraction for the Determination of Olaquinox in Chicken by High Performance Liquid Chromatography, *Food Anal. Methods*, DOI: 101007/s12161-012-9502-7, 2012.

ZHENG, M. M.; GONG, R.; ZHAO, X.; FENG, Y.Q. Selective sample pretreatment by molecularly imprinted polymer monolith for the analysis of fluoroquinolones from milk samples, *Journal of Chromatography A*, 1270, p. 2075-2081, 2010.

WEI, C.; ZHOU, H.; ZHOU, J. Ultrasensitively sensing acephate using molecular imprinting techniques on a surface plasmon resonance sensor, *Talanta*, 83, p. 1422-1427, 2011.

WYBRAŃSKA, K.; SZCZUBIALKA, K.; NOWAKOWSKA, M. Photochemical molecular imprinting of cholesterol, *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 61, p. 147-151, 2008.

## 8. LISTA DE DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS

Esta tese de doutorado foi realizada ao longo de 33 meses de estudo, durante os quais até o momento publicou-se o seguinte resultado no meios de divulgação, como segue listado:

- Patente

1) SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S.; SANTOS, A. V.; FREITAS, L. S.; BALIEIRO, A. L.; JESUS, M. S.; SANTOS, F. M. S.; RESENDE, I. T. M.; LIMA, D. B. M.; SANTANA, R. F. PROCESSO INDUSTRIAL DE OBTENÇÃO DE LEITE E DERIVADOS DE TEOR DE COLESTEROL REDUZIDO. Depósito de pedido de patente com nº 0000221108562820, 20 de Setembro de 2011.

- Trabalhos completos em anais de eventos

1) A. V. SANTOS, R. S. OLIVEIRA, M. S. JESUS, I. V. LUCENA, A. L. BALIEIRO, R. F. SANTANA, L.S. FREITAS, R. C. BERGAMASCO, F. F. MORAES, A. S. LIMA e C. M. F. SOARES. “DESENVOLVIMENTO DE IOGURTE PROBIÓTICO COM BAIXO TEOR DE COLESTEROL COM SABOR DE MANGABA”, XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ 2012, Búzios-RJ, 09 a 12 de setembro de 2012.

2) A. V. SANTOS, T. S. G. FONTES, I. V. LUCENA, R. A. SANTOS, A. L. BALIEIRO, R. F. SANTANA, L.S. FREITAS, C. M. F. SOARES e A. S. LIMA. “DESENVOLVIMENTO DE BEBIDAS LÁCTEAS FERMENTADAS COM REDUÇÃO DO TEOR DE COLESTEROL UTILIZANDO GRÃOS DE KEFIR E SABORIZADA COM POLPA DE SIRIGUELA”, XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ 2012, Búzios-RJ, 09 a 12 de setembro de 2012.

3) SANTOS, F.M.S.; MATOS, D.B.; JESUS, M.S.; ARAUJO JUNIOR, A.M.; SANTOS, A. V.; GOMES, A. V. U. S; FREITAS, L. S., LIMA, A.S.; SOARES, C. M. F. “APLICAÇÃO DA NANOTECNOLOGIA PARA A REMOÇÃO PARCIAL DE COLESTEROL DO LEITE”, XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ 2010, Foz do Iguaçu-PR, 19 a 22 de setembro de 2010.

- Capítulo de livro publicado

1) SOARES, C.M.F.; LIMA, A.S.; SANTOS, A.V.; GAMA, J.A. Desenvolvimento de Produtos Lácteos Funcionais e Probióticos. In: Antônio Martins de Oliveira Júnior; Ana Carolina Sampaio Doria Chaves; Tatiana Pacheco Nunes. (Org.). Alimentando o Conhecimento. 1ª ed. São Cristovão – SE: Editora UFS, 2012, v. 1, p. 105-122.

## ANEXO 1

### 1. PREPARAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A DOSAGEM DE COLESTEROL

A dosagem de colesterol foi determinada a partir da curva de calibração, onde foi obtida pela equação (A.1). As curvas de calibração normalmente são plotadas utilizando de 4 a 5 pontos ao longo da faixa de trabalho desejada, com algumas repetições em cada ponto, sendo que a incerteza pontual é dada pelo intervalo de confiança da média, estabelecido pelo grau de confiança desejado.

Os cromatogramas foram processados com o comprimento de onda de 210 nm. A dosagem de colesterol foi determinada a partir da curva de calibração (Tabela A.1 e Figura A.1), conforme descrito na equação abaixo (equação A.1):

$$C_{\text{colesterol}} = (\text{Área} - 107093) / 36026 \quad (\text{A.1})$$
$$r^2 = 0,9989$$

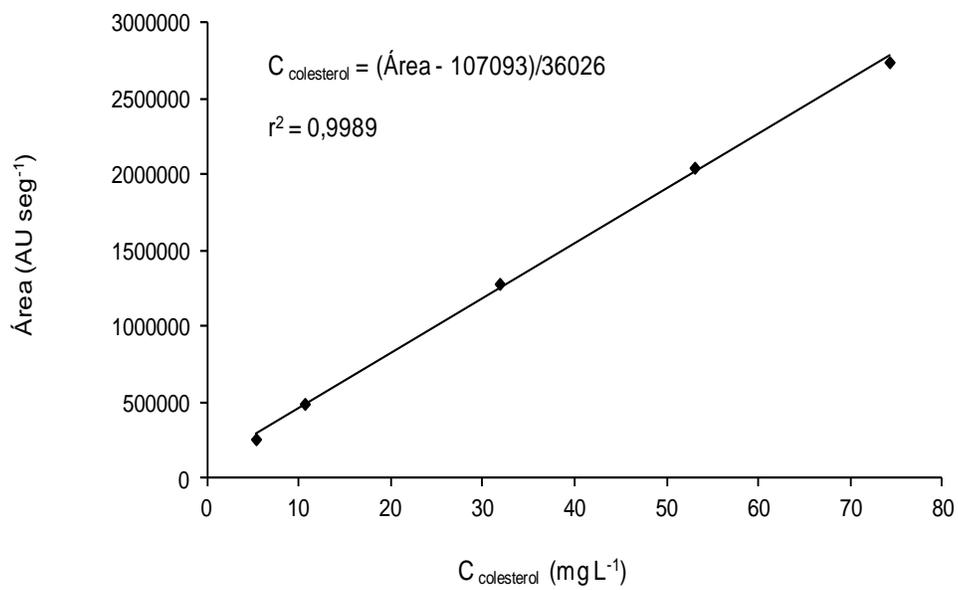
em que:

$C_{\text{colesterol}}$  = concentração de colesterol, expressa em  $\text{mg L}^{-1}$

Área = área obtida pelo método da cromatografia líquida expressa ( $\text{AU seg}^{-1}$ )

**Tabela A 1-** Dados para a obtenção da curva de calibração para a dosagem de colesterol: área em função da concentração de colesterol.

$C_{\text{colesterol}} (\text{mg L}^{-1})$	Área ( $\text{AU seg}^{-1}$ )
5,3	262324
10,6	494923
31,8	1285211
53	2049686
74,2	2744282



**Figura A 1-** Curva de calibração do colesterol.