

ARTIGO CIENTÍFICO

CARACTERIZAÇÃO E MODELAGEM PREDITIVA EM BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA PROBIÓTICA ADICIONADA DE GELATINA DO PEIXE PESCADA AMARELA (*Cynoscion acoupa*)

CHARACTERIZATION AND PREDICTIVE MODELING IN PROBIOTIC FERMENTED MILK DRINK ADDED WITH YELLOW HAKE GELATIN (*Cynoscion acoupa*)

Livia Xavier de Araújo^{1*}, Peterson Felipe Ferreira da Silva², Rikelyne Gonçalves Silva³, Neila Mello dos Santos Cortez Barbosa⁴

RESUMO: A bebida láctea é uma opção atrativa para as indústrias uma vez que há o aproveitamento do soro de leite. De modo a agregar valor a este produto, surge a tendência de adicionar grupos funcionais à sua formulação, tais como os probióticos, e outros aditivos alimentares que garantam diferenciação a bebida. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi produzir uma formulação da bebida láctea fermentada com probiótica acrescida de gelatina rica em nutrientes proveniente da pele do peixe pescada amarela (*Cynoscion acoupa*). A utilização da gelatina como agente emulsificante de baixo custo na produção de bebidas lácteas, fornece ao segmento alimentício uma nova formulação a base de produtos alternativos com subprodutos do pescado. Para a bebida láctea produzida foi utilizado leite UHT integral, açúcar refinado, soro do leite de vaca pasteurizado, gelatina de pescada amarela em pó e fermento láctico probiótico (*Lactobacillus casei*). As análises físico-químicas foram realizadas segundo métodos analíticos oficiais, dessa forma, foi possível obter a composição da bebida com teor de umidade (81,66%), extrato seco total (18,34%), gordura (1,8%), proteínas (1,92%) e carboidratos (13,96%) e assim, sendo caracterizada como semidesnatada. Também foi realizado o controle microbiológico, onde foram obtidos resultados conformes de acordo com a legislação vigente, por fim, foi realizada a contagem de bactérias ácido lácticas, tendo a quantidade mínima para caracterizar o produto como potencial probiótico durante os 36 dias de “shelf life” acompanhado. Foi possível estudar a modelagem matemática, a partir do software MicroFit em diferentes modelos preditivos, onde o modelo logístico teve o melhor ajuste aos dados experimentais segundo os parâmetros estatísticos estudados (R^2 , fator exatidão, fator Biais e o erro médio quadrático).

Palavras-chave: Leites fermentados, Subprodutos da pesca e Microbiologia Preditiva.

ABSTRACT: The dairy beverage is an attractive option for industries, since there is the use of whey. To add value to this product. There is a tendency to add functional groups to its formulation, such as probiotics and other food additives that guarantee the beverage's differentiation. Thus, the objective of this work was to produce a formulation of a fermented dairy drink with probiotics added to nutrient-rich gelatin from the skin of hake (*Cynoscion acoupa*). The use of gelatin as a low-cost emulsifying agent in the production of dairy beverages provides the food segment with a new formulation based on alternative products with fish by-products. For the milk drink produced, whole UHT milk, refined sugar, pasteurized cow's milk whey, yellow hake gelatin powder and probiotic lactic culture (*Lactobacillus casei*) were used. The physical-chemical analyzes were carried out according to official analytical methods, thus, it was possible to obtain the composition of the beverage with moisture content (81.66%), total dry extract (18.34%), fat (1.8%), proteins (1.92%) and carbohydrates (13.96%), thus being characterized as semi-skimmed. Microbiological control was also carried out, where results were obtained in accordance with current legislation, finally, lactic bacteria counting was carried out, having the minimum amount to characterize the product as a potential probiotic during the 36 days of shelf life accompanied by. It was possible to study the mathematical modeling using the MicroFit software in different predictive models, where the logistic model was the one that best fitted the experimental data according to the analyzed statistical parameters (R^2 , accuracy factor, Bias factor and quadratic error. medium).

Key words: Fermented milks, Fishery by-products and Predictive Microbiology.

*Autor para correspondência

¹ Universidade Federal de Pernambuco/CTG/DEQ, Discente de Engenharia de Alimentos

² Universidade Federal de Pernambuco/CTG/DEQ, Discente de Engenharia de Alimentos

³ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Mestrando em Ciência e Tecnologia de Alimentos

⁴ Universidade Federal de Mato Grosso/ ICET/Araguaia, Docente do Curso de Engenharia de Alimentos.

INTRODUÇÃO

Entende-se por bebida láctea o produto lácteo resultante da mistura do leite e soro de adicionado ou não de produtos ou substâncias alimentícias. Para bebidas lácteas com adições, a base láctea deve representar pelo menos 51% da massa/massa do total de ingredientes do produto. Para as bebidas lácteas fermentadas, a fermentação deve acontecer mediante a ação de cultivo de microrganismos específicos e que não pode ser submetido a tratamento térmico após a fermentação. A contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g, no produto final, para o cultivo láctico específico empregado, durante todo o prazo de validade (BRASIL, 2005).

Em muitos laticínios, o soro é descartado junto aos efluentes líquidos, sendo considerado um forte agravante, em razão de seu elevado poder poluente. Para evitar seu descarte que culmina em um desperdício de material proteico e de outros nutrientes, cerca de 50% da produção mundial de soro é tratada e transformada em vários produtos alimentares, e em sua maior parte usada diretamente na forma líquida (ALMEIDA, et al, 2015).

Dentre as inúmeras classes de alimentos funcionais estão os chamados probióticos que são alimentos processados com microrganismos vivos que ingeridos exercem efeito benéfico na microbiota bacteriana do hospedeiro. Pela RDC nº 02 de 2002 da ANVISA, probióticos são definidos como microrganismos que têm a capacidade de atuar no equilíbrio da microbiota intestinal, gerando efeitos benéficos à saúde (BRASIL, 2002).

Os probióticos devem ser capazes de sobreviver até atingir o local de atuação no trato gastrointestinal, suportando, por exemplo, as condições de pH do ácido gástrico e da bile, além da atuação de diversas enzimas (BINNS, 2013). Desse modo, os probióticos devem resistir ao tempo entre a fabricação, comercialização e ingestão do produto, devendo atingir o organismo ainda vivos. Os principais microrganismos probióticos utilizados são *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (BRASIL, 2008).

As bactérias ácido-lácticas (BAL) é um grupo que apresenta semelhanças fisiológicas e metabólicas e têm em comum a característica de possuir ácido láctico como principal produto da fermentação de carboidratos. Elas têm sido usadas por milhares de anos para produção de alimentos como queijo, leites fermentados, vinhos, cervejas e iogurtes, pois contribuem na biopreservação dos alimentos, melhoram as propriedades nutricionais e sensoriais como sabor, odor e textura (DINEV et al., 2017).

A manutenção da viabilidade destes micro-organismos durante toda a vida de prateleira do produto a que foram adicionadas representa um grande desafio para a indústria de alimentos (DOUGLAS; SANDERS, 2008).

Segundo Almeida (2007), leites fermentados e outras bebidas lácteas probióticas são alimentos tradicionais no mercado europeu e asiático e os consumidores estão familiarizados com os benefícios relacionados ao consumo dos mesmos. O consumo de bebidas lácteas no Brasil é maior durante o café da manhã, com cerca de 46% durante o verão e 43% no inverno. As crianças de um a onze anos são as que mais consomem e equivalem a 47% do volume total de brasileiros (HERCULIAN, 2014; SILVA, 2019).

A produção pesqueira é realizada predominantemente para alimentação humana, e permanece em crescente

desenvolvimento ao longo dos anos. A pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) estar presente em todo o litoral brasileiro, principalmente na região Norte do país, sendo uma das espécies mais capturadas dos últimos anos (SILVA, 2019).

A indústria que processa o pescado gera grande quantidade de resíduos. Estes resíduos são ricos em proteínas, e normalmente utilizados para produção de ração animal ou são simplesmente descartados no ambiente sem tratamento prévio, causando poluição ambiental e ocasionando numerosos efeitos negativos sobre ecossistemas marinho (SILVA, 2004).

Uma alternativa para se reduzir os resíduos sólidos decorrentes do processamento do pescado, como a cabeça, a pele e os ossos, é a utilização desses rejeitos para extração de colágeno, e posteriormente obtenção da gelatina, podendo assim, agregar valor comercial a estes resíduos (OLIVEIRA, 2017).

Os modelos matemáticos preditivos para o crescimento microbiano, é uma ciência que relaciona o efeito das propriedades de um alimento e o crescimento de determinado microrganismo através de modelos e equações matemáticas. Na prática, essa ciência quantifica o comportamento microbiano em meios de cultura, ou em alimentos, sob condições ambientais específicas (GONZÁLEZ et al., 2019; HUANG, 2014).

A modelagem preditiva avalia os processos de conservação de alimentos para obtenção de informações confiáveis sobre crescimento, inativação e sobrevivência durante o desenvolvimento microbiano (McMEEKIN et al., 2002; SARMENTO, 2006).

A aquisição de tais informações proporciona a formação de uma base de dados, a qual torna-se uma ferramenta útil para a elaboração de sistemas de informação para monitorar a qualidade do alimento em diversas situações (ROBAZZA, 2010). Quando estes dados são tratados permite-se que uma equação matemática seja utilizada para prever o tempo de ajuste ao meio e uma velocidade de crescimento (ANASTÁCIO, 2009).

Os modelos matemáticos de primeiro nível, que é o objeto em estudo deste trabalho, descrevem o comportamento cinético da multiplicação celular em condições ambiente específicas como temperatura, pH e atividade de água (FORSYTHE, 2013).

Estes modelos cinéticos quantificam unidades formadoras de colônia por mililitro/miligramma (UFC/ml), formação de toxinas, níveis de substrato, produtos metabólicos, ou a absorvância ou impedância (MILLER, 2004).

Os modelos primários mais utilizados são o Logístico, o Gompertz, o Baranyi e Roberts, e simplificações dessas. Esses modelos foram obtidos por diversos autores, geralmente a partir de ajuste aos dados experimentais e não há um consenso sobre os que geram um maior ajuste sobre as curvas de crescimento microbiano (PLA et al., 2015).

O objetivo da pesquisa foi produzir e caracterizar uma bebida láctea fermentada com cultura probiótica e enriquecida de nutrientes pela adição de gelatina de pescada amarela, e avaliar um modelo matemático que se adeque as condições de crescimento das bactérias ácido lácticas encontradas nessa bebida.

MATERIAL E MÉTODOS

Matérias-Primas e Insumos

As amostras de leite de vaca integral UHT comercial foram adquiridas em supermercados da cidade Recife - PE. O soro de leite foi obtido da produção de queijos meia cura realizada no mesmo período do experimento no Laboratório de Origem Animal (LEITE) da UFPE. A gelatina em pó também foi cedida por uma linha de pesquisa em produção de gelatina a partir da pele do peixe de pescada amarela realizada no Centro de Ciências Biológicas da UFPE. As cepas do probiótico *Lactobacillus casei* utilizadas, foram da empresa Sacco cepa probiótica liofilizada (CSL3) na concentração de 10^{12} UFC/mL. As mesmas foram estocadas em micro tubos de polipropileno a uma temperatura de $-22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em leite estéril, através de processamento em autoclave por 5 minutos a temperatura de 110°C e pressão de 760 mm Hg.

Produção da Bebida Láctea Fermentada

Foram elaboradas quatro bebidas lácteas todas com as mesmas concentrações de 0,84% (p/v) de gelatina. Foi adicionado em uma cuba o volume de leite UHT integral (1,5L), açúcar refinado (300g) e soro do leite de vaca pasteurizado (1L), na proporção de 60% de leite e 40% de soro de leite. A mistura foi levada ao fogo para pasteurização na temperatura de 80°C e, após 30 minutos em repouso, foram submetidas a choque térmico em banho maria gelado até chegar à temperatura de 55°C , temperatura ideal para adição das gelatinas em pó. Por fim, ao alcançar a temperatura de 44°C , foi adicionada a cultura microbiológica e foi transferido para potes previamente identificados e colocados em estufa a 44°C para fermentação. A fermentação foi monitorada durante as quatro primeiras horas, com realização das análises pH, acidez ($^{\circ}\text{D}$) e contagem de Bactérias Ácido Lácteas (BAL) com intervalos de 1h30min, aproximadamente, e durante as 3 semanas seguintes onde todos os frascos eram mantidos sob refrigeração para estacionar a fermentação e posterior utilização nas a análise físico-química e microbiológica.

Ensaio Físico-químicos

As análises físico-químicas que foram realizadas nessa pesquisa foram pH, acidez titulável, umidade, gordura, proteínas, cinzas, carboidratos, extrato seco. Todas as análises físico-químicas foram feitas em duplicata e seguiram os métodos analíticos oficiais para controle de produto de origem animal, que avalia a qualidade e a composição centesimal na bebida láctea, no período seguinte ao processamento do produto, segundo a Instrução Normativa nº46/2007 (BRASIL, 2007).

Análises Microbiológicas

Os ensaios microbiológicos foram realizados de acordo com IN N°46 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2007). Os Coliformes Totais e Coliformes Termotolerantes realizada foi realizada a partir do Número Mais Provável - NMP (MERK, 2002; FRANCO e LEITE, 2005). A contagem total de bactérias lácticas viáveis foi realizada por meio de plaqueamento em profundidade e sobrecamada do meio Agar Man Rogosa & Sharpe (MRS) (SILVA, 2002).

Modelagem Matemática

Os dados experimentais obtidos a partir das contagens de BAL foram avaliadas para o modelo matemático primário Logístico, de Baranyi e Roberts e modelo Gompertz. Portanto, a partir das contagens de microrganismos nas placas, determinou-se os valores de UFC (Unidades Formadoras de Colônia) por grama de produto em cada valor de tempo em dias. Os ajustes dos dados foram realizados com auxílio do software MicroFit tornando possível o ajuste automático de dados experimentais a modelos microbiológicos de crescimento teórico, possibilitando a criação, o ajuste e validação de novos modelos de forma fácil e rápida. As curvas foram geradas neste software para que fosse possível testar e validar o experimento obtendo uma concentração dos microrganismos em função do tempo e da fase de crescimento dos mesmos (SIQUEIRA et al., 2014). Os parâmetros obtidos como resultado foram utilizados para cálculos posteriores, no Microsoft Excel, dos parâmetros estatísticos de ajustes dos modelos (Coeficiente de determinação, Fator bias e Fator exatidão).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição centesimal

Os resultados da composição centesimal da bebida láctea produzida estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Composição centesimal da bebida láctea probiótica

Parâmetros físico-químico	Bebida Láctea Fermentada
Umidade (%)	$81,66 \pm 0,14$
Extrato Seco Total (%)	$18,34 \pm 0,06$
Cinzas (%)	$0,66 \pm 0,08$
Proteínas (%)	$1,92 \pm 0,07$
Matéria Gorda (%)	$1,80 \pm 0,07$
Carboidratos (%)	$13,96 \pm 0,10$

Fonte: Autores

As bebidas lácteas em geral são elaboradas basicamente de leite e soro de leite que, em média, são constituídos por 88% e 93% de água, respectivamente (SOUSA et al., 2015). O valor de umidade (Tabela 1) da bebida láctea do presente trabalho ter dado um pouco abaixo da média é esperado tendo em visto que o produto obteve viscosidade e uma concentração maior para outros componentes e a umidade é inversamente proporcional a esses valores. Costa (2013) obteve 79,95% de umidade na formulação de bebidas lácteas adicionadas de gelatina comercial. Valor muito semelhante a este estudo para umidade foi relatado por Cunha et al. (2008) ao avaliarem as propriedades físico-químicas de bebidas lácteas, com 70% de leite e 30% de soro, o qual obteve um valor médio de 81,91%.

Para o resultado de Extrato Seco Total (Tabela 1) da bebida láctea formulada, observasse que o valor de EST aumenta proporcionalmente com a adição da gelatina. Silva (2019), que produziu a mesma gelatina de pescada amarela utilizada neste estudo nas formulações de suas bebidas lácteas, obteve valores de EST em 15,11%; 15,62%; 17,47% para as concentrações de 0%, 0,3% e 0,5% da gelatina, respectivamente. Estes resultados alegam que o valor do EST aumenta proporcionalmente com a concentração da gelatina, porque ela apresenta maiores teores de nutrientes pois é rica em aminoácidos e minerais.

Os valores de cinzas (Tabela 1) obtidos na amostra também aumentaram proporcionalmente com a concentração

de gelatina utilizada, possivelmente devido aos minerais presentes nesse componente. Silva (2019) obteve resultados de 0,54%; 0,60% e 0,62% de cinzas para as concentrações 0%; 0,3% e 0,5%, respectivamente. Thamer e Penna (2006) obtiveram valores de cinzas entre 0,53% a 0,61% na caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos, valores estes inferiores aos encontrados nesta pesquisa.

O teor de proteína (Tabela 1) encontrado para a formulação apresentou um alto valor e foi superior ao valor mínimo preconizado pela legislação vigente para bebida láctea fermentada com adição de produtos ou substâncias alimentícias que é de 1% (BRASIL, 2005). Este valor, como já mencionado, é devido a adição da própria gelatina que se oriunda da proteína colágena extraída do peixe, riquíssimo em aminoácidos, item explicado na seção 3.4 nesta pesquisa. Resultados acima do mínimo recomendado também foram encontrados na literatura, como em todas as formulações de Costa (2013) na produção de bebidas lácteas adicionadas de gelatina comercial que apresentaram conteúdo de proteínas de 2,23% a 2,67%.

Para os valores de gordura (Tabela 1), segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2007), em função do teor de gordura na base láctea, os leites fermentados são classificados da seguinte forma: 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%.

Dessa forma, a bebida láctea fermentada realizada neste trabalho pode ser categorizada como um produto semidesnatado. Isto deve-se ao fato de o soro de leite apresentar baixíssimo teor de gordura, e a única formulação realizada neste trabalho ter a proporção de 40 % de soro de leite. Porém, a bebida produzida neste estudo não pode ser padronizada como semidesnatado pois não foram feitas outras formulações.

Em geral, as bebidas lácteas disponíveis no comércio apresentam baixos teores de gordura. O conteúdo de gordura dos diferentes tipos de iogurte e bebidas lácteas, elaborado em diversas partes do mundo, varia de 0,1% a 10%, sendo necessário padronizar a composição do leite para cumprir as especificações fixadas pelas normas legais (BRANDÃO, 2002)

Quanto aos teores de carboidratos totais (Tabela 1), foi encontrado valor semelhante no presente trabalho quando comparado aos encontrados na literatura. Thamer e Penna (2006), em suas diferentes formulações de bebidas lácteas probióticas, obteve resultados de carboidratos entre 12,94% e 16,26%, atribuindo os maiores valores à riqueza de lactose proveniente do maior volume de soro de leite inserido nas bebidas.

Determinação de pH e Acidez

Os valores de pH e acidez da bebida láctea produzida com adição de 0,84% de gelatina do peixe, durante 36 dias de análise, estão descritos na Figura 1.

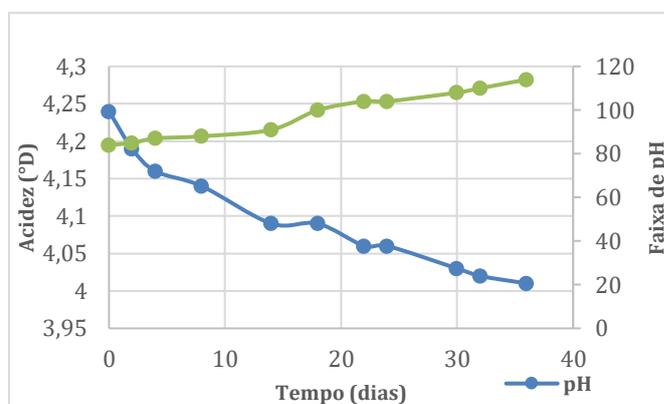


Figura 1. Gráfico dos valores de pH e Acidez por 36 dias
Fonte: Autores

A bebida láctea fermentada apresenta valores (Figura 1) iniciais de pH de 4,24 e valor final (após 36 dias) de 4,01. Os valores obtidos estão de acordo com a faixa adequada de pH estabelecida por Brasil (2007), que é de 3,6 a 4,6, mantendo a viabilidade e a conservação do produto desde a produção até os últimos dias de análise.

Observa-se também com os dados apresentados (Figura 1), que valores de acidez expressados em ácido láctico da única amostra padrão produzida, atende ao estabelecido pela legislação brasileira em vigor, no qual produtos oriundos de leites fermentados, devem apresentar uma acidez mínima de 0,6g de ácido láctico/100g de produto e máxima de 1,5g de ácido láctico/100g de produto, o que representa valores correspondentes de 60°Dornic a 150°Dornic (BRASIL, 2007).

A partir da Figura 1, observa-se uma diminuição nos valores de pH que está relacionada à pós-acidificação da bebida láctea durante o armazenamento refrigerado a 4°C. O pH e acidez estão diretamente relacionados, quando o primeiro decresce, o segundo conseqüentemente deve aumentar, pois quanto menor o valor na escala de pH mais ácido o produto se torna (COELHO et al., 2009).

Por este motivo, os mesmos fatores que podem causar variação e influenciar o pH de um produto, pode também alterar a acidez. Porém a acidez pode mudar durante o armazenamento, bem como depender da acidez inicial do produto, da temperatura de armazenamento, do poder acidificante da cultura e do resfriamento do produto, sendo responsável por cessar a atividade fermentativa em casos inadequados (DA SILVA, 2013).

Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas realizadas na bebida láctea fermentada produzidas, levaram aos resultados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados microbiológicos de bactérias patogênicas na bebida láctea após a produção

Micro-organismo	Bebida Láctea Fermentada	IN n° 46 de 2007 **
Coliformes Totais (N.M.P/mL) * (35°C)	Ausência	3 x 10 ⁰
Coliformes Termotolerantes (N.M.P/mL) * (45°C)	Ausência	1 x 10 ⁻¹
<i>Escherichia coli</i>	Ausência	Ausência

* Valores expressos em número mais provável por mililitro (NMP/mL); ** Amostras Indicativas

Fonte: Autores

Nas pesquisas de coliformes totais (Tabela 2), evidenciou-se que todos as análises os Eppendorfes da colimetria não apresentaram coloração alterada, tanto no início da produção com 4 dias como após 36 dias de armazenamento à 6°C±2°C. Logo, o número de coliformes era inferior ao determinável pelo método NMP e inferior ao permitido pela legislação, bem como para coliformes à 45°C os valores expressos representam ausência de crescimento microbiano deste meio, demonstrando estar dentro dos limites de padrão das principais legislações imputadas para iogurte e bebidas lácteas fermentadas.

Este fato representa uma excelente utilização das Boas Práticas de Fabricação, como pode também ter ocorrido devido a atividade inibidora do probiótico *L. casei* frente à microrganismos patógenos. Quanto à verificação para confirmação de coliformes termotolerantes, não foi necessário realizar o teste com a presença da luz UV pois todos os Eppendorfes apresentaram resultado negativo (sem fluorescência), o que indica que a bebida láctea produzida não apresenta risco de contaminação por coliformes termotolerantes, e conseqüentemente, indicaria a ausência da *Escherichia coli* (SILVA JÚNIOR, 2002).

Contagem de Bactérias Ácido-Lácteas

No início da fermentação foram analisados pH, acidez dornic e contagem de BAL da bebida láctea durante as 4 primeiras horas. Os dados são mostrados nas Figuras 2 e 3, referentes ao pH e acidez x BAL, respectivamente, ao longo do tempo.

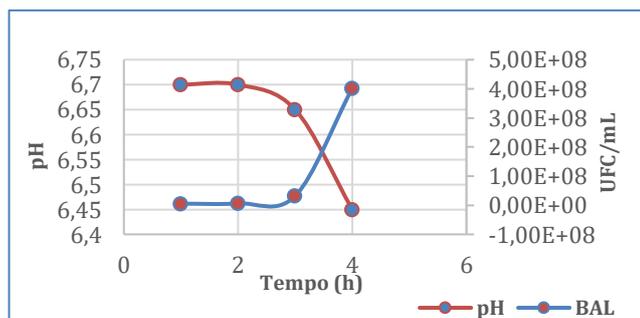


Figura 2. Curva de crescimento microbiano x pH
Fonte: Autores

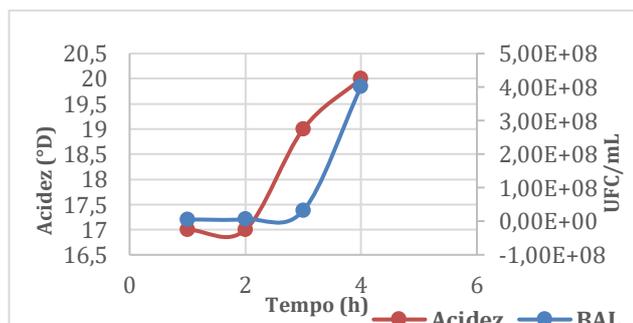


Figura 3. Curva de crescimento microbiano x Acidez
Fonte: Autores

É possível notar uma sutil redução do pH e, conseqüente, um aumento da produção da acidez para análise do crescimento microbiano. Observa-se que o tempo de fermentação de 4 horas não foi suficiente para alcançar o valor mínimo de acidez (0,6% ou 60°D) e de pH 4,6 como aborda a legislação

(BRASIL, 2007). As Figuras 2 e 3 mostram que nas primeiras 3 horas de fermentação a BAL apresenta baixo crescimento. Como a fermentação não teve tempo suficiente para ser completada, os resultados evidenciam isso. Silveira (2009) refere que as BAL crescem bem em ambientes neutros ou próximos a neutralidade, com pH variando entre 5,5- 7,5, ainda explica que o tempo de fermentação pode ser diretamente afetado a depender de vários fatores como: o tipo de cultura utilizada, da temperatura, concentração do substrato, do pH e da acidez do meio. Este pH está relacionado com a multiplicação de BAL. Por este motivo, entre 2 a 4hrs horas houve um aumento significativo da acidez (Figuras 2 e 3).

No período de armazenamento os resultados obtidos das bactérias ácido lácticas presentes na bebida produzida, estão listadas na Tabela 3 os valores da contagem de BAL ao longo dos 36 dias de estoque.

Tabela 3. Resultados da contagem das bactérias ácido lácticas ao longo do shelf-life de 36 dias de produção da bebida láctea fermentada

Tempo (dias)	Contagem de BAL (UFC/mL)	LOG (BAL)
0	1,67 x 10 ⁸	8,22
2	1,67 x 10 ⁸	8,22
4	1,73 x 10 ⁸	8,24
8	1,92 x 10 ⁸	8,28
14	4,10 x 10 ⁸	8,61
18	1,43 x 10 ⁹	9,16
22	1,58 x 10 ¹⁰	10,20
24	2,34 x 10 ¹¹	11,37
30	6,16 x 10 ¹¹	11,79
32	5,02 x 10 ¹¹	11,70
36	4,99 x 10 ¹⁰	10,70

Fonte: Autores

A Tabela 3, mostra um crescimento microbiano de bactérias ácido lácticas, onde é possível visualizar interferências de desenvolvimento para o probiótico *L. casei* inoculado. Isso deve-se a existência da própria cultura microbiana ácido láctica oriunda do leite. Na pasteurização, boa parte dos microrganismos patógenos são eliminados, mas algumas culturas lácteas nativas do leite do qual produziu-se a bebida ainda permanecem.

É possível observar que a bebida láctea fermentada produzida neste estudo apresentou valores superiores a 10⁸ UFC/mL na contagem de bactérias ácido lácticas, mostrando ser viáveis e ativas para benefícios do organismo humano ao serem ingeridas, caso o produto seja mantido em locais e refrigeração adequada (DA SILVA 2013).

Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2005), a contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10⁶ Unidades Formadoras de Colônia (UFC) no produto final, para o(s) cultivo(s) láctico(s) específico(s) empregado(s). Sendo assim, pode-se alegar que a bebida láctea fermentada produzida neste estudo é um produto viável de atividade funcional (probiótico) com shelf-life de 36 dias. Levando em conta o tempo de eminência para a sua sinérese e o tempo de vida útil para o consumo das bactérias ácido lácticas presentes.

Modelagem Matemática

A partir da contagem da BAL, pôde-se obter os dados experimentais na base logarítmica. De posse desses dados, com

o auxílio do software MicroFit, foi possível realizar a modelagem nos modelos propostos para a única formulação da bebida, e obter os parâmetros que melhor ajustam a equação aos dados experimentais. Esses dados são nos gráficos de cada modelo matemático: Logístico, Baranyi & Roberts e Gompertz nas Figuras 4, 5 e 6, respectivamente.

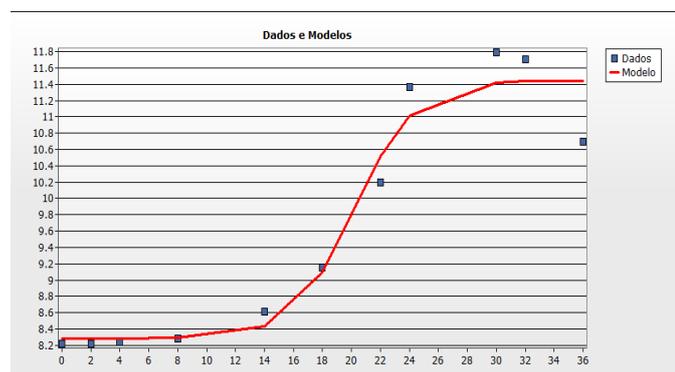


Figura 4. Curva do ajuste do modelo matemático primário Logístico em um gráfico que representa concentração de BAL (log UFC/mL) x Tempo (dias)
Fonte: Autores

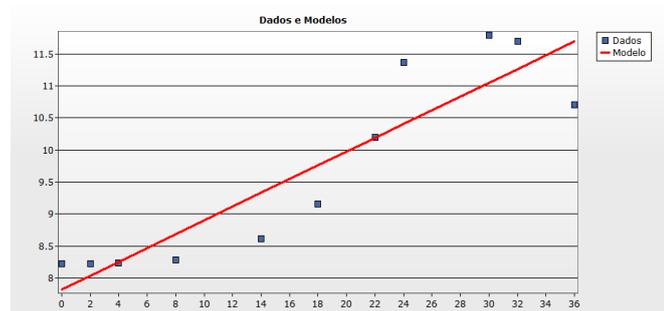


Figura 5. Curva do ajuste do modelo matemático primário Baranyi & Roberts em um gráfico que representa concentração de BAL (log UFC/mL) x Tempo (dias)
Fonte: Autores

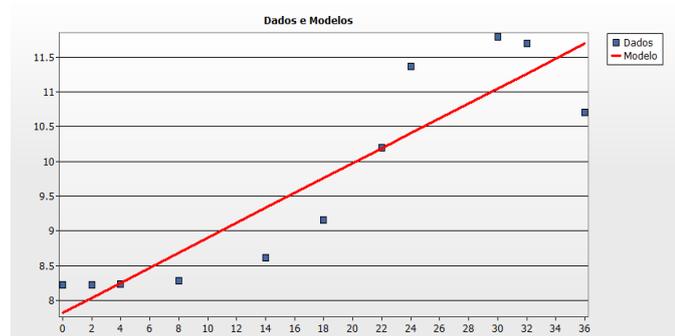


Figura 6. Curva do ajuste do modelo matemático primário Gompertz em um gráfico que representa concentração de BAL (log UFC/mL) x Tempo (dias)
Fonte: Autores

O modelo Logístico (Figura 4) tem como principal característica a simetria em torno do ponto de inflexão, o que muitas vezes prejudica a eficiência de ajuste deste modelo aos dados experimentais (LONGHI, 2012). Podemos aferir que foi o único modelo que representou um valor descritivo das condições onde observou-se um menor erro experimental (0,454) em comparação aos modelos de Baranyi & Roberts (0,881) e Gompertz (0,802).

Quanto mais próximo o valor do erro experimental estiver próximo de zero, mais confiável é o modelo utilizado para os dados experimentais nas condições prescritas. Os dois últimos modelos citados, apresentaram erros experimentais muito próximos com 0,881 e 0,802, respectivamente, o que pode ser observado através das Figuras 5 e 6 que apresentam curva de ajuste (linear) muito semelhantes em contraponto a curva de ajuste da Figura 4, referente ao modelo Logístico, onde observa-se uma maior quantidade dos pontos da contagem das culturas ($Y(\text{modelo})$) dentro de uma curva senoidal.

Segundo Longhi (2012), o modelo Logístico e modelo Gompertz são modelos com formato puramente sigmoideal em comparação ao modelo de Baranyi & Roberts, considerado um modelo sigmoideal com função de ajustes.

Quando a quantidade disponível de dados do crescimento microbiano é menor, e longas fases lag (fase de adaptação dos microrganismos) são observadas, modelos sigmoideais com função de ajuste podem ser mais hábeis em descrever o crescimento microbiano em relação aos modelos puramente sigmoideais (BATY; DELIGNETTE-MULLER, 2004).

Para os modelos puramente sigmoideais, a curva do crescimento microbiano normalmente é expressa pelo logaritmo da contagem microbiana contra o tempo ($\log(N(t))$ versus t) devido ao formato sigmoide característico produzido. Entretanto, esses modelos não são capazes de descrever a curva sigmoideal completa nestas condições, pois não são capazes de descrever a fase lag (FUJIKAWA, 2010).

Senso assim, para o modelo Logístico ter sido o melhor ajustado, deve-se aos dados do presente estudo ter apresentado mais valores na faixa do crescimento exponencial ou fase log. De acordo com a Figura 4 temos uma faixa de, aproximadamente, 8 dias de adaptação (fase lag) e uma faixa de 14 a 30 dias crescimento microbiano (fase log).

Análise Estatística dos Dados

Os parâmetros estatísticos como o coeficiente de correlação (R^2), a raiz do erro médio quadrático (RMSE), o fator exatidão e o fator bias foram utilizados para avaliar a capacidade preditiva dos modelos primários e os resultados são expressos na Tabela 4.

Tabela 4. Valores dos índices estatísticos de validação matemática dos modelos primários às curvas de crescimento da BAL na fermentação da bebida láctea

Parâmetro	Modelo Logístico	Modelo Baranyi & Roberts	Modelo Gompertz
R^2	0,95387280	0,8264622	0,8275705
RMSE	0,306369355	0,59463992	0,87888952
Fator exatidão	1,000332624	1,001531367	1,00149257
Fator Bias	1,000332624	1,001531367	1,00149257

Fonte: Autores

Percebeu-se que só o modelo Logístico (Tabela 4) apresentou um coeficiente de relação (R^2) mais próximo a 1 com 0,95% de confiança. Os outros dois modelos apresentaram coeficientes muito próximos (0,82%), isso justifica o fato dos modelos Baranyi & Roberts e Gompertz terem obtido curva de ajuste muito semelhantes nas Figuras 21 e 22. Pelo fator RMSE, o modelo Logístico apresenta valor inferior a 0,4. E pelo fator exatidão e fator de bias, que apresentaram os mesmos valores, tem-se que esse modelo obteve um desvio de

0,033% para mais ou para menos da curva ajustada para os pontos experimentais (fator exatidão = 1,00033), e os modelos Baranyi & Roberts e Gompertz com 0,15% (1,0015) e 0,14% (1,0014), respectivamente.

Dessa forma, analisando os dados estatísticos apresentados na Tabela 4 é possível verificar através dos índices, que o modelo Logístico apresentou melhor capacidade de ajuste aos valores experimentais do que os modelos de Gompertz e Baranyi & Roberts para as condições aplicadas. Confirmando as análises feitas nos gráficos das curvas dos modelos obtidos anteriormente neste estudo e que os melhores ajuste dos dados foram feitos na fase de maior crescimento das bactérias ácido lácticas (fase log).

CONCLUSÃO

A bebida láctea produzida apresentou características físico-químicas de gordura, pH, acidez, proteínas, cinzas e umidade, dentro dos padrões da IN n°46/2007 (BRASIL, 2007). Diante disto, pode-se concluir que a mesma se apresenta como um alimento seguro permanecendo dentro da legislação vigente RDC n°331/2019 e IN n°46/2007 e dentro dos padrões de identidade e qualidade no que tange as bebidas lácteas. Além disso, apresentou-se como um produto semidesnatado e com teor de proteínas e cinzas maior que o valor mínimo exigido pela legislação.

A contagem de BAL realizada durante o período de 36 dias, demonstrou que a bebida láctea apresenta células viáveis na ordem de no mínimo 10^8 UFC/mL, atendendo desta forma o requisito da norma IN n°46/2007, para probiótico vivo e ativo, trazendo benefícios funcionais e ação bioconservadora para o produto alimentar.

A aplicação dos modelos matemáticos Logístico, Baranyi & Roberts e Gompertz, apontou um ajuste mais adequado para o modelo Logístico, ao verificarmos a validação estatística do modelo segundo os fatores R^2 , fator exatidão e o fator Bias que se encontraram mais próximos de 1 e a raiz do erro médio quadrático mais próximo de 0, garantindo o melhor ajuste a este modelo.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Produtos de Origem Animal Leite do Curso de Engenharia de Alimentos /DEQ da UFPE por abrir as portas com toda a sua estrutura para a produção e ensaios analíticos elaborados com êxito.

REFERÊNCIA

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em agosto, 2007.

ALMEIDA JÚNIOR, W. L. G.; FERRARI, I. S.; SOUZA, J. V.; SILVA, C. D. A.; COSTA, M. M.; DIAS, F. S. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. *Food Control*, London, v. 53, p. 96-103, 2015.

ALMEIDA, K. E. Avaliação do Perfil de Acidificação e viabilidade de bactérias probióticas em misturas leite-soro para

a elaboração de bebidas lácteas utilizando soro de queijo Minas frescal. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2007.

ANASTÁCIO, A. Microbiologia Preditiva Alimentar: As sinergias entre a microbiologia, a matemática e as tecnologias da informação. *Segurança e Qualidade alimentar [online]*, n.7, p.56-59, 2009.

BATY, F.; DELIGNETTE-MULLER, M. Estimating the bacterial lag time: which model, which precision? *International Journal of Food Microbiology*, v. 91, n. 3, p. 261-277, 2004.

BINNS, N. Probióticos, Prebióticos e a Microbiota Intestinal. *International Life Sciences Institute Europe*. Bélgica, 2013.

BRANDÃO, S. C. C. Novas gerações de produtos lácteos funcionais. *Indústria de Laticínios*, São Paulo, v. 6, n. 37, p. 64-66, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em julho de 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Instrução Normativa n°46. Diário Oficial da União, 23 de outubro de 2007. Brasília: Ministério da Agricultura, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n°68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produto Lácteos, em Conformidade com o Anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. Diário Oficial da União. Brasília, 14 de dezembro de 2006, seção 1, página 8.

BRASIL, Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2005). Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Láctea. Instrução Normativa n.º 16, de 23 de agosto de 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n°2 de 7 de janeiro de 2002. Cria o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticas Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais ou de Saúde. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília – DF, 2002.

COELHO, F.J.O.; QUEVEDO, P.S.; MENIN, A.; TIMM, C.D. Avaliação do prazo de validade do iogurte. *Goiânia, Ciência Animal Brasileira*. v.10, n.4, p.1155-1160, 2009.

COELHO, C. J. Elaboração de Bebida Probiótica a partir do Suro de Laranja Fermentado com *Lactobacillus casei*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, 2009.

COSTA, A. S. Desenvolvimento e caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de bebida láctea

- fermentada elaborada com diferentes estabilizantes/espessantes. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 34, n. 1, p. 209-226, jan./fev. 2013.
- CUNHA, T.M.; CASTRO, F.P.; BARRETO, P.L.M. et al. Avaliação físico-química, microbiológica e reológica de bebida láctea e leite fermentado adicionados de probióticos. *Semina Cienc. Agrar.*, v.29, p.103-116, 2008.
- DA SILVA, A. B. N.; UENO, M. Avaliação da viabilidade das bactérias lácticas e variação da acidez titulável em iogurtes com sabor de frutas. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 68, n. 390, p. 20-25, 2013.
- DINEV, T.; BEEV, G.; DENEV, S.; DERMENDZHIEVA, D.; TZANOVA, M.; VALKOVA, E. Antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus* against pathogenic and food spoilage microorganisms: a review. *Agricultural Science and Technology*, v. 9, n. 1, p. 3-9. Bulgaria, 2017.
- DOUGLAS, L. C.; SANDERS, M. E. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. *Journal of the American Dietetic Association*, v. 108, p. 510-521, 2008.
- FORSYTHE, Stephen J. *Microbiologia da segurança dos alimentos*. ArtMed Editora, 2013.
- FRANCO, R.M.; LEITE, A.M.O. Enumeração e Identificação de *Enterococcus* spp e Cepas de *E. coli* Patogênicas em Coxas de Frango e Estudo da Atividade Antimicrobiana das Cepas Isoladas. XV Seminário de Iniciação Científica e Prêmio UFF – Vasconcellos Torres de Ciência e Tecnologia, 07-11/11/2005.
- FUJIKAWA, H. Development of a New Logistic Model for Microbial Growth in Foods. *Biocontrol Science*, v. 15, n. 3, p. 75-80, 2010.
- GONZALÉZ, S. C.; POSSAS, A.; CARRASCO, E.; VALERO, A.; BOLÍVAR, A.; POSADA-IZQUIERDO, G. D.; GARCÍA-GIMENO, R. M.; ZURERA, G.; PÉREZ-RODRIGUEZ, F. 'MicroHibro': A software tool for predictive microbiology and microbial risk assessment in foods. *International Journal of Food Microbiology*, n. 290, p.226-236, 2019.
- HERCULIAN, Eduardo. *Valuation Cluster RJ. LBR Lácteos Brasil S/A*. 2014.
- HUANG, L. IPMP 2013: a comprehensive data analysis tool for predictive microbiology. *International journal of food microbiology*, 171, 100-107, 2014.
- LONGHI, A. D. Avaliação da capacidade preditiva de diferentes modelos matemáticos para o crescimento microbiano em condições não-isotérmicas. Dissertação (mestrado em Engenharia de alimentos) – Centro Tecnológico. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2012.
- McMEEKIN, T. A., ROSS, T. Predictive microbiology: providing a know ledge-based framework or change management. *International Journal os Food Microbiology*, v.78, p. 133-153, 2002.
- MERCK. *Microbiological Manual*. Berlin, Germany, 407 p., 2002.
- MILLER, F. A. *A microbiologia preditiva como instrumento da garantia da segurança de produtos alimentares*. 2004.
- OLIVEIRA, V. M. Colágeno: características gerais e produção de peptídeos bioativos – uma revisão com ênfase nos subprodutos do pescado. *ActaFish*, 5 56-68. 2017.
- PLA, M.; OLTRA, S.; ESTEBAN, M.; ANDREU, S.; PALOP, A. Comparison of Primary Models to Predict Microbial Growth by the Plate Count and Absorbance Methods. *BioMed Research International*, v. 2015, 14 p., 2015.
- ROBAZZA, W. S. *Modelagem Matemática do Crescimento de Microrganismos em Alimentos*. Universidade Estadual de Santa Catarina, 2010.
- SARMENTO, C.M.P. *Modelagem do Crescimento Microbiano e Avaliação Sensorial no estudo da Vida de Prateleira de mortadela e linguiça defumada em armazenamento isotérmico e não isotérmico*. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2006.
- SILVA, B. B. *Diagnóstico da Pesca no Litoral Paraense*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Pará e Museu Paraense Emílio Goeldi, 134 p., Belém, 2004.
- SILVA JÚNIOR, E. A. da. *Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos*. Varela, 5 ed., São Paulo, 2002.
- SILVA, M. *Produção de Gelatina a Partir da Pele do Peixe Pescada Amarela (Cynoscion acoupa) e sua Utilização na Formulação de Bebidas Lácteas*. Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Pernambuco. 2019.
- SILVEIRA, M. S. *Utilização do suco e xarope de caju para a produção de ácido lático pelo Lactobacillus casei B-442*. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciencia e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- SIQUERIA, A. A.; CARVALHO, P. G. S.; MENDES, M. L. M.; SHIOSAKI, R. K. MicroFit: um software gratuito para desenvolvimento e ajuste de modelos matemáticos de crescimento bacteriano. *Brazilian journal of food technology*. V. 17, n. 4, p. 329-339, out/dez. 2014.
- SOUSA, C. S. *Caracterização de bebida láctea pasteurizada com adição de ferro*. *Revista Teccen*. 2015 Jan./Jun.; 08 (1): 27-32.
- THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. *Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico*. 2006. *Ciência e tecnologia de alimentos*. Campinas, v.26, n.º 3, pp. 589-595.