



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE TECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS  
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA AGRÍCOLA  
COPEAG - COORD. DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENG. AGRÍCOLA



# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

## Tese de Doutorado

ESTUDO DE TÉCNICAS DE ABSORÇÃO INDUSTRIAL  
DA *Gracilaria birdiae* PLASTINO & OLIVEIRA PARA  
DIVERSIFICAÇÃO PRODUTIVA NO SETOR LÁCTEO

ISANNA MENEZES FLORÊNCIO

Campina Grande  
Paraíba



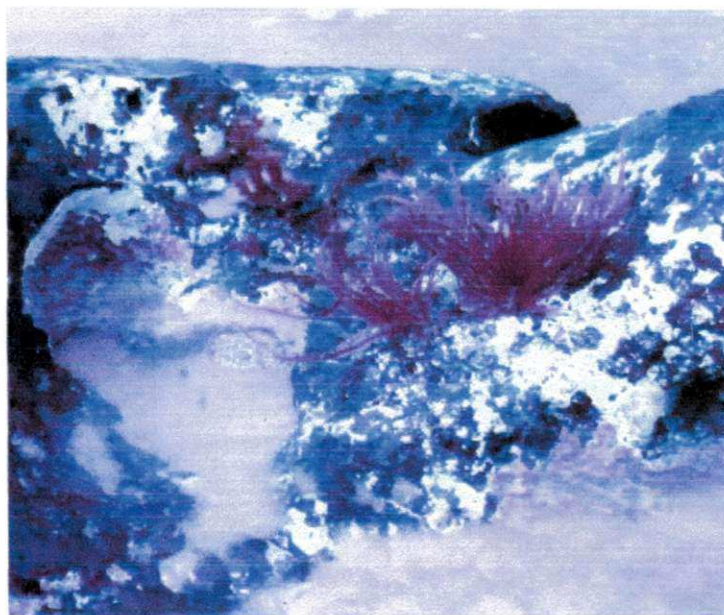


UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE TECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS  
Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola

*Área de Processamento e Armazenamento  
de Produtos Agrícola*



*Tese Apresentada pela Área de Concentração em  
Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícola*



*Estudo de técnicas de absorção industrial da  
Gracilaria birdiae Plastino & Oliveira para  
diversificação produtiva no setor lácteo*

POR:

*Isanna Menezes Florêncio*

ORIENTADORES:

*Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva  
Profa. Dra. Eliane Rolim Florentino*

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE TECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS  
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA AGRÍCOLA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE TECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS  
Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola

*Área de Processamento e Armazenamento  
de Produtos Agrícola*



*Isanna Menezes Florêncio*

***Estudo de técnicas de absorção industrial da  
Gracilaria birdiae Plastino & Oliveira para  
diversificação produtiva no setor lácteo***

**Tese apresentada ao Curso  
de Pós-Graduação em  
Engenharia Agrícola da  
Universidade Federal de  
Campina Grande, como  
parte dos requisitos  
necessários para obtenção  
do título de Doutor em  
Engenharia Agrícola.**

**CAMPINA GRANDE – PB  
(Fevereiro, 2012)**



F632e Florêncio, Isanna Menezes.  
Estudo de técnicas de absorção industrial da *Gracilaria birdiae* (Plastino & Oliveira) para diversificação produtiva no setor lácteo / Isanna Menezes Florêncio. - Campina Grande, 2012.  
123 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Tecnologia e Recursos Naturais, 2012.  
"Orientação: Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Eliane Rolim Florentino".  
Referências.

1. Agar. 2. Toxicidade. 3. Elaborados Lácteos. 4. Análise Sensorial. 5. Tese - Engenharia Agrícola. I. Silva, Flávio Luiz Honorato da. II. Florentino, Eliane Rolim. III. Tese - Engenharia Agrícola. IV. Universidade Federal de Campina Grande - Campina Grande (PB) V. Título  
CDU 543.92:641(043)





UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE TECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS.  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

CTRN


PARECER FINAL DO JULGAMENTO DA TESE

ISANNA MENEZES FLORÊNCIO

ESTUDOS DE TÉCNICAS DE ABSORÇÃO INDUSTRIAL DA *Gracilaria birdiae* (Plastino & Oliveira) PARA DIVERSIFICAÇÃO PRODUTIVA DO SETOR LÁCTEO

BANCA EXAMINADORA


PARECER

  
Dr. Flavio Luiz Honorato da Silva  
Orientador (DEQ/UFPB)

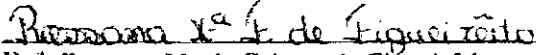
Aprovado

  
Dr. Eliane Rolim Florentino  
Orientadora (UFPB)

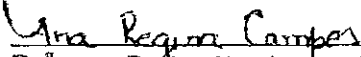
Aprovada

  
Dr. Josivanda Palmeira Gomes  
Examinadora (UAEA/UFCC)

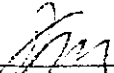
Aprovada

  
Dr. Rossana Maria Feitosa de Figueirêdo  
Examinadora - UAEA/UFCC


Aprovada

  
Dr. Ana Regina Nascimento Campos  
Examinadora (CES/UFCC)

Aprovada

  
Dr. Ricardo Targino Moreira  
Examinador (CT/UFPB)

Aprovada

  
Dr. Maria Elita Martins Duarte  
Examinadora (UAEA/UFCC)

Aprovada

FEVEREIRO - 2012

Av. Aprígio Veloso, 882 - Bairro Universitário  
58429-140 - CAMPINA GRANDE - PB  
Fone: (83) 2101.1055 Fax: (83) 2101.1185  
<http://www.deag.ufcg.edu.br/copeg>

*Eu te agradeço, Deus*  
*Por se lembrar de mim, e pelo teu favor*  
*E o que me faz crescer;*  
*Eu vivo pela fé, e não vacilo;*  
*Eu não paro, eu não desisto,*  
*Eu sou de Deus, eu sou de Cristo*

*(Kleber Lucas)*



*A meus pais, Antônio Fernando e Veronica Ivone,  
cujos exemplos de vida, amor, fé e coragem  
são minha fortaleza*

*e a Deus,*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar o meu caminho, dando-me força, coragem, prudência, paciência e discernimento para alcançar esta nova vitória.

A meus pais, Antônio Fernando e Verônica Ivone, pelo amor, apoio, paciência e amizade, meu pilar de sustentação e aconchego. Agradeço-lhes também pela educação, embora não tenha dado, em muitos momentos, o valor merecido; mas hoje sei, que tudo que sou devo aos valores e limites repassados por vocês.

A meu marido, Igor Veloso, que me entendeu e me ajudou a acreditar que somos capazes de mudar o mundo, se necessário. Por todas as vezes que, também, aguentou os meus abusos e minha falta de paciência.

A minha irmã, Fernanda Andréa, pelo apoio e pela crença que tanto me fortaleceu, sempre me apoiando e acreditando em meu potencial; ao meu lindo sobrinho, Victor Henrique, que sempre me faz sorrir, mesmo nas horas mais estressantes.

A meu irmão, Saulo José, pela compreensão nas horas críticas, principalmente no estresse do dia a dia e pela força, estendendo-me a mão quando mais precisava. E a minha amada cunhada, Raiana Almeida, que sempre acreditou que sou capaz.

A minha amada amiga e comadre, Mônica Tejo Cavalcanti, que participou intensamente na elaboração e execução deste trabalho, ensinando-me que cada dia que passa, podemos acrescentar mais na sabedoria, em nossa vida. Não esquecendo de agradecer a Daniel Cassimiro, pela paciência que teve quando nos via passar horas ao telefone, apenas para matar a saudade. Agradeço também pela confiança e amizade ao me entregar sua filha, Isadora, como afilhada.

Ao meu orientador, Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva, que sempre esteve pronto a sanar todas as minhas dúvidas, como também pela confiança e paciência.



A minha orientadora, Dra. Eliane Rolim Florentino que, além de ser a pessoa responsável pelo meu sucesso, também foi eleita uma segunda mãe, pela ajuda, compreensão e amizade.

A Ricardo Soares Martins, do NUPPA/CT/UFPB, que me proporcionou o alcance deste objetivo.

A todos que fazem parte do NUPEA (Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos), em especial aos tesouros do NUPEA, Tereziana Silva da Costa, Vanessa Silva Fernandes e Valdete Campos Silva que, além de alunas, ajudantes, se tornaram grandes amigas que quero guardar para o resto da vida; não esquecendo de mais três queridas amigas: Silvia Patricia, Kylmara Morais e Cleonora Brasileiro.

Sem me esquecer, é claro, de todos que torceram por minha vitória na Universidade Estadual da Paraíba, em especial a Vanusia Cavalcanti e a Wanda Izabel, que sempre me fizeram sentir capaz.

Aos amigos e colaboradores, como Aline, Marcelo Marques, Sarah, Valker e Rayane; em especial aos técnicos dos laboratórios do Centro de Ciências e Tecnologia Enivaldo, Ricardo, Antônio e, principalmente Gilson, pela ajuda e compreensão.

Aos meus queridos provadores, sobretudo aos que me permitiram treiná-los: Ivana, Gerson, Thiago, Erick, Ana Jéssica, Cristiane, Danilo, Camila Feliz, Camila Cristine, Sávio, Leandro, Tadeu, Candido, Evandro, Marcos, Franciele, Clara, André e Fanny.

Às pessoas que fazem parte da Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, em especial aos professores Dra. Rossana Maria, Dr. Francisco de Assis, Dra. Maria Elita, Dr. Mário Eduardo e Dra. Josivanda Palmeira, obrigada por tudo.

A minha eterna coordenadora, Josivanda Palmeira Gomes, pela ajuda, compreensão, amizade e paciência. Ao coordenador Dr. Demerval Araújo Furtado; enfim, aos que fazem parte da coordenação, Dona Aparecida e Gilson.

À Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), através da COPEAG, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), pela cooperação e concessão em realizar a maior parte do trabalho experimental em suas instalações.

Ao CNPQ, pelo apoio à pesquisa e ao incentivo financeiro.

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

**MUITO OBRIGADA!**



## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 – Objetivos	3
1.1.1 – Objetivo geral	3
1.1.2 – Objetivos específicos	3
2 – REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 – Algas	5
2.2 – Algas vermelhas: Filo Rhodophyta	6
2.2.1 – Algas em estudo	7
2.2.1.1 – <i>Gracilaria birdiae</i> Plastino & Oliveira	8
2.2.1.2 – <i>Gracilaria caudata</i> J. Agardh	9
2.2.2 – Ágar	10
2.3 - Toxicidade	12
2.4 – Planejamento experimental	13
2.5 – Formulados lácteos	13
2.6 – Análise sensorial	14
2.7 – Estado da arte	15
2.7.1 – Algas e ágar	15
2.7.2 – Elaborados lácteos e análises	18
3 - MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 – Matéria-prima	24
3.2 – Identificação das Algas	24

3.3 – Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> Leach	25
3.4 – Composição físico-química das algas	25
3.4.1 – Umidade	25
3.4.2 – Lipídios	26
3.4.3 – Proteínas	26
3.4.4 – Sais minerais (cinzas)	26
3.4.5 – Carboidratos	26
3.5 – Caracterização da água do mar	26
3.4.1 – Análises microbiológicas da água do mar	27
3.5.1.1 – Determinação de coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C	27
3.5.1.2 – Determinação de estreptococos fecais e enterococos	28
3.6 – Extração do ágar	29
3.6.1 – Planejamento fatorial para a extração de ágar	31
3.7 – Desenvolvimento das bebidas lácteas acrescentando o ágar	33
3.7.1 – Micro-organismos	34
3.7.1.1 – Preparo do inóculo	34
3.7.2 – Elaboração dos produtos	34
3.7.2.1 - Caracterização físico-química das bebidas fermentadas	35
3.7.2.1.1 – Determinação do pH	35
3.7.2.1.2 – Determinação de acidez em ácido láctico	36
3.7.2.1.3– Açúcares redutores totais	36
3.7.2.1.4 – Concentração celular	36
3.7.2.1.5 - Viscosidade	36
3.7.2.2 – Cálculo da produtividade e parâmetros cinéticos fermentação láctica	37
3.7.2.3 – Análise microbiológica dos elaborados lácteos	38
3.8 - Análise sensorial dos elaborados lácteos	38
3.8.1 – Treinamento da equipe de provadores	39



3.8.2–	Análise sensorial das bebidas lácteas e dos iogurtes	39
3.8.3 -	Composição físico-química dos elaborados lácteos mais aceitos	40
3.8.4 –	Vida de prateleira	40
3.9 -	Análise estatística	41
<b>4 -</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>42</b>
4.1 –	Identificação das algas	42
4.2 –	Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> Leach	42
4.3 –	Composição centesimal da alga	44
4.4 –	Análise microbiológica da água do mar	45
4.5 –	Extração do ágar	47
4.5.1 –	Extração de ágar da <i>Gracilaria birdiae</i>	47
4.5.2 –	Extração de ágar da <i>Gracilaria caudata</i>	51
4.6 –	Estudo do elaborado lácteo	54
4.6.1 –	Preparação do inóculo	54
4.6.2 –	Elaborado lácteo: estudo cinético	55
4.6.3 –	Análise microbiológica dos elaborados lácteos	69
4.7 –	Análise sensorial	70
4.7.1 –	Análise sensorial das bebidas lácteas	71
4.7.2 –	Análise sensorial dos iogurtes	75
4.8 –	Análise físico-química dos elaborados lácteos	79
4.9 -	Vida útil do elaborado lácteo	81
<b>5 –</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>83</b>
	<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>86</b>
	<b>ANEXO</b>	<b>988</b>

## LISTA DE FIGURAS

2.1	<i>Gracilária birdiae</i> PLASTINO & OLIVEIRA coletada na Praia de Pipa, RN	8
2.2	<i>Gracilaria caudata</i> J. Agardh coletada na Praia de Pipa, RN	9
2.3	Estrutura do ágar (COULTATE, 2004)	11
3.1	Alga <i>Gracilaria caudata</i> J. Agardh (A), Alga <i>Gracilaria birdiae</i> Plastino & Oliveira (B)	24
3.2	Vista parcial do local de coleta das algas - Praia do Amor na Praia de Pipa, RN	27
3.3	Fluxograma de extração do ágar	30
4.1	Extração do ágar (seguindo o planejamento experimental)	47
4.2	<i>Gracilária birdiae</i> Plastino & Oliveira após reidratação	48
4.3	Gráfico de Pareto para o rendimento de ágar para a <i>Gracilária birdiae</i> Plastino & Oliveira	50
4.4	Superfície de resposta para o rendimento de ágar da <i>Gracilária birdiae</i> , fixando-se a quantidade de água no nível +1	50
4.5	<i>Gracilaria caudata</i> reidratada	52
4.6	Gráfico de Pareto para rendimento de ágar da <i>Gracilaria caudata</i>	53
4.7	Superfície de resposta para o rendimento de ágar da <i>Gracilaria caudata</i>	54
4.8	Perfis da acidez (°D) durante o processo fermentativo	56
4.9	Perfis do comportamento do pH durante as 5 horas de fermentação	57
4.10	Perfis do crescimento celular	57
4.11	Perfis do comportamento de ART	58
4.12	Perfis do comportamento de AR	58
4.13	Gráfico de Pareto para a acidez	62
4.14	Superfície de resposta para a acidez fixando o valor de ágar no nível +1	62
4.15	Gráfico de Pareto para a viscosidade	65
4.16	Superfície de resposta para a viscosidade, fixando-se o valor de inóculo no nível -1	66
4.17	Cálculo das máximas velocidades específicas de crescimento celular ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para os 11 experimentos	68

4.18	Distribuição do consumo de iogurtes e bebidas lácteas sabor morango, para os provadores treinados	71
4.19	Resposta dos provadores	74
4.20	Respostas dos provadores	78

## LISTA DE TABELAS

2.1	Panorama da utilização de algas no Brasil	7
3.1	Valores reais e codificados das variáveis de entrada para a <i>Gracilaria birdiae</i> Plantino & Oliveira utilizando-se como padrão, 10 gramas de algas	32
3.2	Matriz do planejamento fatorial completo $2^3$ para a <i>Gracilaria birdiae</i> Plantino & Oliveira	32
3.3	Valores reais e codificados das variáveis de entrada para a <i>Gracilaria caudata</i> J. Agardh, utilizando-se como padrão 10 gramas de alga	33
3.4	Matriz do planejamento fatorial completo $2^2$ para a <i>Gracilaria caudata</i> J. Agardh	33
3.5	Valores reais e codificados das variáveis de entrada	34
3.6	Matriz do planejamento fatorial $2^3 + 3$ ponto central	35
4.1	Quantidade de <i>Artemia salina</i> Leach morta com seus respectivos desvios padrão para cada concentração de extrato de algas utilizada	43
4.2	Valores de $CL_{50}$ calculados para a <i>Gracilaria caudata</i> J. Agardh e para a <i>Gracilaria birdiae</i> Plastino & Oliveira com seus respectivos limites de confiança	43
4.3	Média dos resultados da composição centesimal efetuada nas algas <i>in natura</i> e seus respectivos desvios padrão	44
4.4	Valores de coliformes a 35 °C, coliformes a 45 °C e <i>Streptococos fecais</i> e enterococos	46
4.5	Condição dos ensaios do planejamento experimental tendo, como variável resposta, o rendimento de extração de ágar para a <i>Gracilaria birdiae</i> Plastino & Oliveira	48
4.6	ANOVA (Análise de variância) para a <i>Gracilaria birdiae</i> Plastino & Oliveira	49
4.7	Condição dos ensaios do planejamento experimental tendo como variável resposta o rendimento de extração de ágar, para a <i>Gracilaria caudata</i>	51
4.8	ANOVA (Análise de variância) para a <i>Gracilaria caudata</i>	52
4.9	Resultados do preparo do inóculo e seus respectivos desvios padrão	55



4.10	Resultado das análises de acidez para os 11 experimentos em triplicata, médias e desvios padrão	60
4.11	ANOVA (Análise de variância) para a acidez	61
4.12	Resultado das análises de viscosidade para os 11 experimentos em duplicata, médias e desvios padrão	63
4.13	ANOVA (Análise de variância) para a viscosidade	64
4.14	Valores dos parâmetros cinéticos dos formulados lácteos	67
4.15	As equações das retas, os valores de R e as máximas velocidades específicas de crescimento celular ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para os 11 experimentos	68
4.16	Valores de coliformes a 35 °C, coliformes a 45 °C e bolores e leveduras	69
4.17	ANOVA para provadores treinados	72
4.18	Diferença de soma de ordem entre os experimentos 1 e 2 e o padrão quanto à preferência dos provadores treinados, obtida pelo teste de diferença do controle	72
4.19	Diferença de soma de ordem entre os experimentos 1 e 2 e o padrão quanto à preferência dos provadores treinados obtida pelo teste de ordenação	73
4.20	Respostas do teste de aceitação	74
4.21	Respostas do teste de intenção de compra	75
4.22	ANOVA	76
4.23	Diferença de soma de ordem entre os experimentos 3, 4 e o padrão quanto à preferência dos provadores obtida pelo teste de diferença do controle	76
4.24	Diferença de soma de ordem entre os experimentos 3 e 4 e o padrão, quanto à preferência dos provadores obtida pelo teste de ordenação	77
4.25	Respostas do teste de aceitação	78
4.26	Respostas do teste de intenção de compra	79
4.27	Resultados da composição centesimal e da análise de lactose efetuada na bebida láctea de maior aceitação, com seus respectivos desvios padrão	80
4.28	Resultados da composição centesimal e da análise de lactose efetuada no iogurte de maior aceitação, com seus respectivos desvios padrão	81
4.29	Resultados da vida útil dos produtos elaborados	82

## RESUMO

O ágar é um polissacarídeo hidrossolúvel que, quando incorporado a alimentos possui propriedades de alteração das características reológicas, estabilização de emulsões, promoção de suspensão de partículas, controle da cristalização e inibição da sinérese de alimentos processados, por serem polímeros de cadeia longa que se dissolvem ou dispersam em água. Analisando sua funcionalidade objetivou-se, com esta pesquisa, estudar o desenvolvimento de técnicas de absorção industrial da *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira, utilizada para diversificação produtiva no setor lácteo, começando pelas *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira e a *Gracilaria caudata* J. Agardh, nas quais foram feitas as caracterizações morfológicas, físico-químicas e toxicológicas, concluindo-se que as algas em estudo podem ser consumidas sem risco à saúde. Amostras de água do local de coleta das algas (Praia do Amor em Pipa – RN) foram analisadas microbiologicamente indicando, de acordo com a legislação brasileira em vigor, que se trata de uma água de excelente qualidade para a balneabilidade. Quanto ao rendimento do ágar nativo das duas algas, a que obteve o maior rendimento foi a *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira, com aproximadamente 9% de ágar nativo; com isto foi realizado um estudo para verificar as influências das variáveis de entrada: ágar, leite em pó reconstituído e inóculo; em referência às respostas acidez e viscosidade, utilizou-se da metodologia de planejamento fatorial  $2^3 + 3$  pontos centrais, e se observaram que os experimentos com melhores respostas ao fixar o valor de inóculo no nível -1 (1,5%), foram os experimentos com operação das variáveis em 0,25% de ágar e 6,5% de leite, 0,75% de ágar e 6,5% de leite, (0,25% de ágar e 13% de leite e 0,75% de ágar e 13% de leite). Com base nesses resultados constatou-se a aceitação dos elaborados por parte dos consumidores desse tipo de alimento verificando-se que a quantidade de ágar influenciou na aceitação dos provadores treinados os quais preferiram a bebida láctea e o iogurte, com menores porcentagens de ágar. De acordo com a vida útil dos produtos, notou-se o comportamento constante, tanto da bebida láctea quanto do iogurte, considerados excelentes visto que, quanto mais estável estiverem em temperatura de geladeira (6 °C), melhor para o consumidor. Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que o ágar nativo é uma excelente alternativa para os laticínios brasileiros, tornando-se um produto de fácil acesso e de tecnologia simplificada.

**Palavras-chave:** ágar, toxicidade, elaborados lácteos, análise sensorial

## ABSTRACT

Agar is a modify the rheological characteristics, stabilization of emulsions, suspension promotion particle, the crystallization control, inhibition of syneresis processed foods, because they are long chain polymers which dissolve or disperse in water. Analyzing functionality have aimed with this research study the development of industrial absorption techniques *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira, it's used for diversification of production in the dairy sector. Firstly being studied *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira and *Gracilaria caudata* J. Agardh where morphological characterizations were performed, physico-chemical and toxicological properties, concluding that the algae under study can be consumed without risk to health. The water samples of the collect place of the algae (Praia do Amor in Pipa – RN) were analyzed microbiologically, indicating, according to brazilian legislation, which is na excellent quality water for bathing. For the income of native agar of the two algae, which had the highest yield was *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira approximately 9% of native agar. With this study was conducted to check the influence of input variables: agar, milk powder and inoculum; on responses acidity and viscosity, using factorial design of  $2^3 + 3$  central points. It's observed that the experiments that responded better to fix the value of inoculum level (1.5%) were the experiments with the operation of the variables in 0.25% agar and 6.5% milk, 0.75% agar and 6.5% milk (0.25% agar and 13% milk and 0.75% agar and 13% milk). With these results were observed for acceptance by consumers prepared sort of feed; which was found that the amount of agar influence of the acceptance trained panelists who chose the yogurt and milk beverage with lower percentages of agar. According to the shelf-life there has been a constant behavior, both Drink milk and yogurt, is considered excellent, since the more stable are at refrigerator temperature (6°C) was the best for the consumer. The present results show that the native agar is an excellent alternative for Brazilian dairy, becoming a product of easy access and simplified technology.

**Key-words:** agar, toxicity, dairy product, sensorial analyzes.

## 1 - INTRODUÇÃO

As algas compreendem um grupo diverso de organismos fotossintetizantes e não vasculares, com estruturas reprodutivas desprotegidas (Cryptogâmia), produtoras de esporos e desprovidas de sementes e flores (ASCENCIO, 2006). São predominantemente marinhas, mais comuns em mares quentes de águas transparentes, amplamente distribuídas na região equatorial com os gêneros mais comuns *Gelidium* e *Gracilaria*.

As algas vermelhas são quase que exclusivamente multicelulares, existindo poucos gêneros unicelulares. Entre as multicelulares predominam as formas filamentosas porém existem, também, formas parenquimatosas de aspecto foliáceo (McHUGH, 2003). As algas são usadas em todo o mundo, com grande número de aplicações, cujo uso é principal na alimentação humana. O Japão e a China são os países que mais utilizam algas como alimento. Outro uso das algas reside na extração de ficocoloides, compostos com propriedades gelificantes, bastante úteis com aplicabilidade tanto científica como tecnológica (McHUGH, 2002).

O Brasil possui cerca de 700 espécies de macroalgas marinhas, incluindo as do filo *Rhodophyta* com alguns gêneros de importância econômica, como a *Gracilaria*, *Gelidium* e *Hypnea* (CABRAL *et al.*, 2011). A região costeira, compreendida entre os estados do Ceará e Rio de Janeiro, abriga a flora algal mais diversificada do País. No tocante à exploração de espécies com fins comerciais, a atividade de maior porte corresponde à coleta de algas vermelhas (*Gracilaria* e *Hypnea*) no litoral do nordeste, principalmente na costa entre os estados do Ceará e Paraíba (RODRIGUES, 2006; VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

As principais fontes de ágar são as algas pertencentes ao gênero *Gracilaria*, sobretudo no que diz respeito ao uso desses polissacarídeos na indústria alimentícia (PLASTINO & OLIVEIRA, 2002).

O ágar é uma galactana de estrutura linear, com radicais sulfatos ligados a essa estrutura; apresenta habilidade de formar géis reversíveis apenas pelo resfriamento de sua dispersão aquosa a quente; possui capacidade de permanecer estável em temperaturas mais elevadas que a de gelatinização. Sendo muito utilizado na indústria alimentícia como, por exemplo, em gelados comestíveis, para inibir sinérese e dar textura a bolos e tortas para controlar a atividade de água e retardar a retrogradação (RIBEIRO & SERAVALLI, 2004). O ágar extraído de algas, como a *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira e a *Gracilaria*



*caudata* J. Agardh, pode ser utilizado como espessante e estabilizante em bebidas lácteas e iogurtes.

A adição de estabilizante em bebida láctea e iogurte tem, por função principal, proporcionar uma retenção maior de água no sistema, aumentando a viscosidade e melhorando o corpo e a textura, uma vez que atua também como espessantes (VENTURINI FILHO, 2010).

Para que um novo produto seja aceito pela população, é necessário seu estudo prévio, para o que se faz o uso de uma ferramenta imprescindível na indústria de alimentos: a análise sensorial. É por meio dela que as características ou propriedades de interesse relativas à qualidade sensorial do alimento são identificadas e adequadamente estudadas, com base em metodologias sensoriais de coleta de dados e em estudos estatísticos de avaliação e interpretação dos resultados do estudo sensorial desse alimento (MINIM, 2006).

## **1.1 – Objetivos**

### **1.1.1 – Objetivo geral**

Estudo de técnicas de absorção industrial da *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira para diversificação produtiva no setor lácteo.

### **1.1.2 – Objetivos específicos**

- Identificar, em laboratório, as algas em estudo;
- Estudar a toxicidade da *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira e da *Gracilaria caudata* J. Agardh frente à *Artemia salina* Leach, para verificar seu CL<sub>50</sub> (concentração letal média);
- Quantificar os componentes existentes na *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira e na *Gracilaria caudata* J. Agardh, através da composição centesimal;
- Caracterizar, microbiologicamente, a água do local de coleta da *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira e da *Gracilaria caudata* J. Agardh;
- Realizar o estudo de extração do ágar da *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira e da *Gracilaria caudata* J. Agardh e selecionar a que apresentar maior rendimento;
- Verificar a influência das variáveis concentração ágar, leite em pó reconstituído e do inóculo sobre as respostas acidez e viscosidade, utilizando-se da metodologia de planejamento fatorial;
- Estudar a cinética fermentativa dos elaborados lácteos no meio contendo ágar, da alga que apresentou maior rendimento na extração; escolher os melhores (2 bebidas lácteas e 2 iogurtes) e desenvolver tecnologia produtiva;

- Realizar análise sensorial dos elaborados lácteos (2 bebidas lácteas e 2 iogurtes) com provadores treinados;
- Realizar análise físico-química dos elaborados lácteos mais aceitos na análise sensorial (uma bebida láctea e um iogurte);
- Caracterizar, microbiologicamente, os elaborados lácteos mais aceitos na análise sensorial (uma bebida láctea e um iogurte);
- Estudar a vida útil do elaborado lácteo (uma bebida láctea e um iogurte).

## 2 – REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 – Algas

As algas são organismos fotossintetizantes, com função ecológica semelhante á das plantas, ou seja, produtores primários que utilizam energia luminosa para sintetizar seu próprio alimento (RAVEN *et al.*, 2007).

De maneira geral, as algas marinhas são consideradas excelentes fontes de proteínas e carboidratos, possuindo baixos teores de lipídios (MABEAU *et al.*, 1992). Pelo fato das proteínas serem nutrientes essenciais aos organismos animal e humano, deve-se levar em consideração, além do conteúdo de proteínas, a biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, a ausência de toxicidade e/ou as propriedades antinutricionais. Embora a toxicidade presente em vegetais esteja associada a substâncias de natureza química bastante diversificadas, é conhecida a ocorrência de compostos de caráter proteico que ocasionam efeitos biológicos adversos a outros organismos.

São fonte de uma grande variedade de compostos benéficos para o homem apresentando diversas aplicações em nutrição animal e humana (URBANO & GOÑI, 2002), indústria de alimentos (MAMATHA *et al.*, 2007), fertilização do solo e outras áreas biotecnológicas (FARIAS *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2004). Durante as últimas décadas a comunidade científica demonstrou interesse crescente pelo estudo dos carotenoides e das vitaminas lipossolúveis, que podem estar associados à redução de doenças cardiovasculares e outras doenças degenerativas (WILLIS & WIANS JÚNIOR, 2003; JOHNSON, 2004).

Esses seres abundantes no planeta Terra exercem relevante papel no ciclo do carbono; são capazes de transformar o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) – um dos chamados “gases do efeito estufa”, que contribuem para o aquecimento global – em carboidratos, por meio da fotossíntese, em carbonato de cálcio, pela calcificação (RAVEN *et al.*, 2007).

Em relação à distribuição geográfica as algas se apresentam amplamente distribuídas. São capazes de ocupar todos os meios que lhes ofereçam luz e umidade suficientes, temporárias ou permanentes; assim, são encontradas em águas doces e na água do mar, sobre solos úmidos e até mesmo sobre a neve (WYNNE, 2005).



Segundo McHUGH (2002) as três espécies de algas marinhas mais importantes utilizadas como alimento humano são: *Porphyra*, *Laminaria* e *Undaria*, sendo a China o principal produtor de algas marinhas comestíveis produzindo cerca de 5 milhões de toneladas, seguida da República da Coreia, com 800 mil toneladas e Japão com cerca de 600 mil toneladas.

Em 2001 a FAO elaborou uma pesquisa para descobrir a viabilidade do cultivo de algas como fonte de renda alternativa em alguns estados do nordeste brasileiro, Rio Grande do Norte, Ceará e Paraíba, chegando à conclusão de que o mercado de derivados de algas no Brasil é promissor e tem crescido muito nos últimos anos, acompanhando sobremaneira o desenvolvimento dos setores lácteo e de carnes industrializadas, que têm apresentado um desempenho acima da média do crescimento industrial do País e que, com a implantação dos cultivos, algumas famílias acresceriam de R\$ 45 a R\$ 120 sua renda familiar o que, para alguns casos seria o equivalente a dobrar a receita. Com base nos resultados obtidos decidiu-se por empreender projetos pilotos de cultivo de algas em algumas localidades litorâneas desses estados (OLIVEIRA, 2005).

De acordo com LOBBAN & HARRISON (1994) dentre os grupos de macroalgas marinhas pode-se destacar três grandes grupos: Chlorophyta (algas verdes), Phaeophyta (algas castanhas ou pardas) e Rhodophyta (algas vermelhas) tendo, como fatores ambientais mais significativos para seu desenvolvimento, temperatura, luz, movimento da água, salinidade e disponibilidade de nutrientes.

## **2.2 – Algas vermelhas: Filo Rhodophyta**

As algas vermelhas são mais abundantes em águas tropicais e quentes, como é o caso do Brasil, apesar de também serem encontradas em regiões mais frias do mundo. Existem de 4.000 a 6.000 espécies conhecidas, com cerca de 680 gêneros, dentre os quais poucos são unicelulares ou filamentosos microscópicos (RAVEN *et al.*, 2007). Entre as algas vermelhas multicelulares predominam as formas filamentosas porém existem formas parenquimatosas de aspecto foliáceo (McHUGH, 2003).

São predominantemente marinhas, mais comuns em mares quentes de águas transparentes, amplamente distribuídas na região equatorial com os gêneros mais comuns *Gelidium* e *Gracilaria*. São bentônicas vivendo fixadas em um substrato, pois necessitam do movimento das marés para realizar as trocas gasosas eficientemente; a principal

característica é a presença do pigmento ficoeritrina, responsável pela sua coloração vermelha; possuem clorofila “a” e “d”, carotenoides e armazenam amido como material de reserva (LELIS, 2006)

As algas são usadas em todo o mundo, com um grande leque de aplicações, uma das quais na alimentação humana. O Japão e a China são os países que mais utilizam algas como alimento. Outro uso das algas é na extração de ficocoloides, compostos com propriedades gelificantes, bastante úteis com aplicabilidade tanto científica como tecnológica (McHUGH, 2003).

As algas pertencentes ao gênero *Gracilaria* representam a principal fonte de agaranas, principalmente no que diz respeito ao uso desses polissacarídeos na indústria alimentícia. Parte deste interesse se deve ao sucesso de produção, em virtude do uso do tratamento alcalino, uma técnica que proporciona melhoria na qualidade do gel obtido dos polissacarídeos produzidos por espécies de algas pertencentes a este gênero (ARMISEN, 1995).

Os principais produtos de reserva das algas vermelhas são os grânulos de amido das florídeas, que se armazenam no citoplasma. Este amido das florídeas é uma molécula única que se assemelha a uma porção de amilopectina do amido; é, na verdade, mais semelhante ao glicogênio (material de reserva dos animais) do que ao amido (material de reserva dos vegetais) (RAVEN *et al.*, 2007).

### 2.2.1 – Algas em estudo

No Brasil a região costeira, compreendida entre o estado do Ceará e o norte do estado do Rio de Janeiro, abriga a flora algal mais diversificada do país. No que diz respeito à exploração de espécies para fins comerciais, a atividade de maior porte se refere à coleta de algas vermelhas dos gêneros *Gracilaria* e *Hypnea* na costa nordeste, particularmente no trecho que se estende do estado do Ceará até o estado da Paraíba, com grande aproveitamento econômico dos dois gêneros (Tabela 2.1).

**Tabela 2.1** - Panorama da utilização de algas no Brasil

Espécie	Exploração efetiva	Ocorrência
<i>Gracilaria birdiae</i>	Ágar	Nordeste

---

<i>Gracilaria caudata</i>	Ágar	Nordeste
<i>Gracilaria córnea</i>	Ágar	Nordeste
<i>Gracilaria domingensis</i>	Alimentícia	Nordeste
<i>Hypnea musciformis</i>	Carragenana	Sudeste e Nordeste

---

Fonte: LELIS (2006)

### 2.2.1.1 – *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira

A espécie *Gracilaria birdiae* foi descrita por PLASTINO & OLIVEIRA (2002) como sendo uma nova espécie de algas tropicais brasileiras com base em várias comparações críticas de diversos aspectos morfológicos, relacionados a outras espécies economicamente importantes e comuns, que também ocorrem na costa do nordeste do Brasil e que são exploradas para produção de ágar. Apresenta uma estrutura bastante ramificada com talos compridos e cilíndricos de coloração vermelho-vinácea, alcançando 40 cm de comprimento e 2 mm de diâmetro, apresentando um apressório de onde partem um ou mais ramos cilíndricos com ramificações pseudodicotômicas irregulares, frequentemente unilaterais e de segunda ordem, como mostrado na Figura 2.1.



**Figura 2.1** – *Gracilária birdiae* PLASTINO & OLIVEIRA coletada na Praia de Pipa, RN



O talo tem organização microcistideada com células pequenas na medula. Os espermatângios estão reunidos em conceptáculos na forma de criptas fundidas do tipo henriquesiana. Os cistocarpos possuem uma constrição basal nítida, ostíolo proeminente e carposporófito com ampla região de contato com o gametófito.

A espécie *Gracilaria birdae* ocorre nas águas tropicais brasileiras, da costa do Ceará até o Espírito Santo. Atualmente, a *Gracilaria birdae* é amplamente coletada nos bancos naturais da costa do Nordeste, visando à extração do ágar-ágar (PLASTINO & OLIVEIRA, 2002) e nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte, esta alga vem sendo cultivada em escala piloto nos módulos flutuantes de estruturas do tipo *long-line* (CARVALHO FILHO, 2004).

#### 2.2.1.2 – *Gracilaria caudata* J. Agardh

A *Gracilaria caudata* J. Agardh pode ser encontrada em quase toda a costa brasileira, em especial distribuída entre os estados do Maranhão até Santa Catarina. Ela é muito coletada para fins industriais, tanto para a extração do ágar como para utilização direta na culinária (BELLORIN, 2002; OLIVEIRA FILHO, 1977; OLIVEIRA & MIRANDA, 1998).

Apresenta estrutura semelhante à da *Gracilaria birdiae*, bastante ramificada com talos compridos e cilíndricos de coloração vermelho-vináceo, como mostra a Figura 2.2.

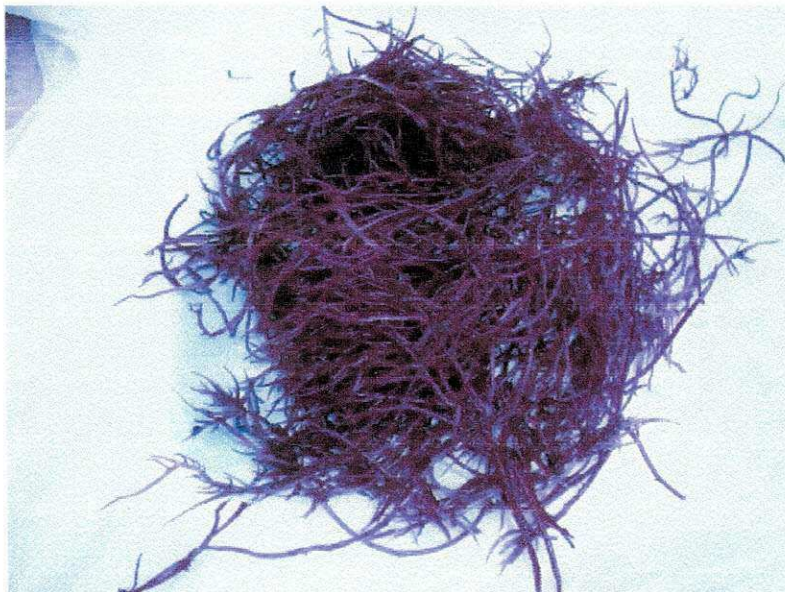


Figura 2.2 – *Gracilaria caudata* J. Agardh coletada na Praia de Pipa, RN

### 2.2.2 – Ágar

Os avanços recentes na tecnologia de gomas e amidos têm levado ao desenvolvimento de uma grande quantidade de novos produtos e processos. Estão sendo descobertas gomas com melhor viscosidade e gelificação, baixas calorias e estabilidade. A indústria de alimentos funcionais e de bebidas também foi responsável pelo impulso na produção de novos ingredientes. Essas gomas são fontes importantes de fibras dietéticas. Além disso, são cada vez mais utilizadas sozinhas ou combinadas, para melhorar as propriedades físicas dos alimentos (ALISTE, 2006).

Quando incorporados aos alimentos, os polissacarídeos hidrossolúveis, ou gomas, possuem propriedades como: alteração das características reológicas, estabilização de emulsões, promoção de suspensão de partículas, controle da cristalização, inibição da sinérese (exsudação espontânea da água de um gel que está em repouso) de alimentos processados, por serem polímeros de cadeia longa que se dissolvem ou dispersam em água (ALISTE, 2006).

A produção dos ficocoloides produzidos a partir de algas, gira em torno de 50 mil toneladas de peso seco produzidas anualmente. A carregena é empregada em alimentos e também na indústria de cosméticos. O ágar é empregado em géis para eletroforese e como componente de meios de cultura sólidos (RADMER, 1996), tal como, também, em alimentos industriais (GLICKMAN, 1987). A maioria dos atuais avanços biotecnológicos não teria sido possível sem a utilização deste ficocoloide (CARTÉ, 1996).

Segundo WERLINGER et al. (2004) o ágar é uma espécie de gelatina bastante usada como meio de cultura microbiana, e nas indústrias alimentares de chocolate, pudins, gelados, entre outras utilizações. É retirado de algas vermelhas, em que sua parede celular é dividida basicamente em duas partes, uma interna rígida, formada por microfibrilas de celulose (a grande maioria) e outra mais externa, mucilagínosa.

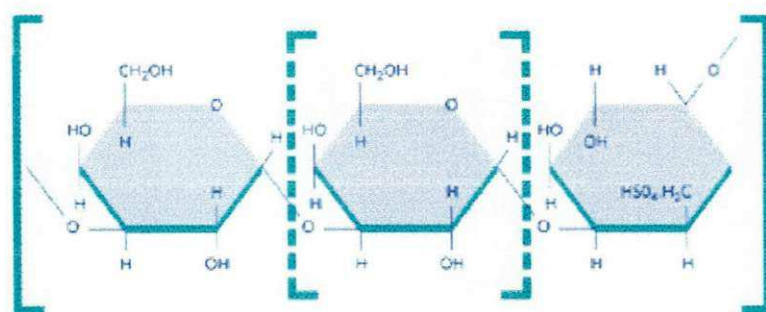
O ágar, proveniente de algas, é muito utilizado na confecção de gelatinas, por se tratar de um tipo de fibra que não é digerido e tem propriedade laxativa. A preparação de gelatina com ágar se solidifica mais rápido que a gelatina de origem proteica (origem animal) e mantém a consistência sólida em temperatura ambiente. Por isto, está sendo muito utilizada em recheios de tortas, coberturas, glacês, merengues, confeitos e produtos enlatados de carne, em função de suas propriedades coloidais e geleificantes (ORNELLAS, 2006).



O ágar se compõe de duas frações: da agarose e da agarpectina, uma mistura complexa de polissacarídeos. A agarpectina possui baixo poder de gelificação; já a agarose é um componente geleificante (FERRARIO & SAR, 1996). A concentração máxima de ágar utilizado em uma formulação é de 1% ou menos devido ao seu alto poder geleificante. Com o passar do tempo entendeu-se que, na realidade, o ágar compreende uma família de polissacarídeos, as agaranas, sendo que diferentes tipos podem estar presentes no ágar da mesma espécie, dependendo diretamente do aspecto fisiológico, da espécie da alga, dos fatores ambientais e, ainda, do modo em que ocorre sua extração (BIRD & HINSON, 1992; McHUCH, 1987; 2003).

As agaranas absorvem uma quantidade de água de aproximadamente 20 vezes o seu peso; são insolúveis em água fria. A dissolução em água quente (>90 °C) é rápida, podendo-se observar a formação de um gel firme a concentrações tão baixas quanto 0,5%. A viscosidade é constante em pH 4,5 a 9 e não é muito afetada dentro da faixa de pH entre 6 a 8; entretanto, iniciada a gelificação a viscosidade em uma temperatura constante, aumenta com o tempo. A viscosidade do ágar é inversamente proporcional à temperatura e também aumenta exponencialmente com a concentração (McHUGH, 1987).

De estrutura linear o ágar, que é uma galactana, possui radicais sulfatos ligados à sua estrutura (Figura 2.3). O teor de sulfato é baixo (> 4,5 %), quando comparado com carragenas puras (24,9 % - 52,1 %) (RIBEIRO & SERAVALLI, 2004).



**Figura 2.3** – Estrutura do ágar (COULTATE, 2004)

O processo de gelificação do ágar está relacionado exclusivamente às ligações com pontes de hidrogênio. A gelificação é totalmente reversível, ciclo que pode ser repetido várias vezes, visto que o gel conserva muito bem suas propriedades mecânicas (RIBEIRO & SERAVALLI, 2004).

Ao contrário das carraginas, o ágar não carece de sais para gelificar, já que o faz por si mesmo, o que supõe um conteúdo em cinzas muito menor do que outros agentes gelificantes. A digestão do ágar no trato intestinal é, assim, mais fácil e apresenta menor acumulação de cinzas (IBERAGAR, 2010).

Ainda segundo IBERAGAR (2010), a utilização do ágar na indústria alimentícia se deve às suas propriedades específicas, como:

- Grande poder gelificante
- Aplicação num amplo campo de pH
- Resistência ao tratamento térmico
- Grande histerese entre os pontos de fusão e gelificação
- Não alteração de sabores
- Géis reversíveis
- Estabilidade de gel

### 2.3 - Toxicidade

Cem razão da procura de substâncias bioativas em produtos ainda em estudo tem-se estudado um bioensaio visando determinar a toxicidade com a estimação da concentração letal média (CL<sub>50</sub>) sobre *Artemia salina* Leach., que é um microcrustáceo de água salgada comumente usada como alimento vivo para peixes, sendo seus ovos facilmente encontrados em lojas de aquaristas.

A simplicidade com que pode ser manuseado, a rapidez dos ensaios e o baixo custo, favorecem sua utilização rotineira em diversos estudos, além do que tais ensaios de letalidade são muito utilizados em análises preliminares de toxicidade geral (LUNA *et al.*, 2005).

Diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades como antifúngica, viruscida e antimicrobiana, parasiticida e tripanossomicida, entre outras, cujas frações ou substâncias ativas são posteriormente testadas em diferentes culturas de células tumorais, obtendo-se boa correlação (SIQUEIRA *et al.*, 1998).

#### 2.4 – Planejamento experimental

O planejamento consciente dos experimentos que devem ser realizados para determinar, e mesmo quantificar, a influência das variáveis sobre as respostas desejadas, é indispensável para que resultados confiáveis sejam obtidos e para as análises estatísticas consistentes possam ser realizadas. Neste contexto, considera-se que desenvolver produtos e processos através de procedimentos de tentativa e erro, conforme registros do início do século passado foi, de fato, relevante, naquele momento; no entanto, a forte competitividade, a difusão da tecnologia e a competência e responsabilidade dos pesquisadores atuais, inviabilizam tais procedimentos (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

A falta de planejamento é, muitas vezes, a causa do insucesso de uma investigação porém raros são os pesquisadores que pensam em estatística antes de realizar seus experimentos. Em geral, eles costumam achar que, em uma análise dos seus dados, não importa como tenham sido obtidos e, eventualmente, levarão sua pesquisa a bom termo (BARROS NETO *et al.*, 1996).

Na utilização do planejamento experimental ocorre redução de experimentos ou repetições e uma melhoria na qualidade das informações obtidas através dos resultados, significando uma sensível diminuição do trabalho e, conseqüentemente, do tempo e do custo final (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

A essência de um bom planejamento consiste em projetar um experimento, de forma que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que se procura (BARROS NETO *et al.*, 1996).

#### 2.5 – Formulados lácteos

O leite é um produto que sofre alterações com muita facilidade, num curto espaço de tempo; necessita de tratamentos que objetivem aumentar seu período de utilização (AQUARONE *et al.*, 1983). Objetivando a prolongação da sua utilização, vários processos podem ser empregados desde a aplicação de tratamentos que aumentem sua vida útil (pasteurização, esterilização), como a transformação do mesmo em produtos derivados (bebida láctea, iogurte e queijos, entre outros).

De acordo com a Instrução Normativa nº 16, de 23 de Agosto de 2005 (BRASIL, 2005), entende-se por bebida láctea o produto lácteo resultante da mistura do leite (in natura, pasteurizado, esterilizado, UHT, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado e em pó) adicionado ou não de produto(s) ou substância(s) alimentícia(s), gordura vegetal, leite(s) fermentado(s), fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos. A base láctea representa pelo menos 51% massa/massa (m/m) do total de ingredientes do produto.

Segundo a Resolução nº 5, de 13 de Novembro de 2000 (MAPA, 2000), entende-se por iogurte o produto resultante da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, cuja fermentação se realiza com cultivos protossimbióticos de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* aos quais se pode acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido lácticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final.

## 2.6 – Análise sensorial

Segundo MINIM (2006) a análise sensorial é utilizada para evocar, medir, analisar e interpretar reações às características de alimentos e outros materiais, da forma como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição.

A análise sensorial é utilizada quando se quer desenvolver novos produtos, controlar a qualidade de produtos já desenvolvidos e quando se deseja selecionar métodos instrumentais que tenham correlação com atributos sensoriais de alimentos (MINIM, 2006).

Além do seu valor nutritivo um alimento deve produzir satisfação e ser agradável ao consumidor; isto é resultante do equilíbrio de diferentes parâmetros de qualidade sensorial. No desenvolvimento de um novo produto é imprescindível otimizar parâmetros como forma, aparência, odor, cor, sabor, textura, consistência e a interação dos diferentes componentes, com a finalidade de alcançar um equilíbrio geral que se traduza em boa qualidade e que seja de excelente aceitabilidade.

## 2.7 – Estado da arte

### 2.7.1 – Algas e ágar

TEIXEIRA *et al.* (1991) concluíram, ao estudar produtos naturais de algas marinhas, que as algas sintetizam produtos com amplo espectro de atividades biológicas, principalmente os representantes de mares tropicais e subtropicais, como seria o caso do Brasil. Os produtos naturais de algas apresentam grande diversidade estrutural porém relativa homogeneidade entre os componentes de determinado táxon (espécie).

MURANO (1995) observou, ao estudar a estrutura química e a qualidade de ágar de *Gracilaria*, que o ágar (polímero sintetizado por espécies de *Gracilaria*) constitui uma mistura complexa de moléculas. A capacidade de gelificação do ágar da *Gracilaria* é superior à da *Gelidium* e da *Pterocladia*, podendo ser potencializado se adicionado um pré-tratamento alcalino.

CUNHA *et al.* (1999) testaram a metodologia de crescimento e avaliaram o potencial de cultivo das algas vermelhas produtoras de ágar, *Gracilaria cervicornis* (cf.) e *Gracilaria caudata*, e da produtora de carragenana, *Hypnea musciformis*. O crescimento *in vitro* foi testado para as três espécies e o crescimento *in situ* foi testado para *Gracilaria cervicornis* (cf.). Os resultados preliminares indicaram taxas de crescimento elevadas quando comparadas com a literatura, tanto para os experimentos de laboratório quanto de campo. As taxas de crescimento de *Gracilaria cervicornis* (cf.) variaram entre 1,8 a 5,7% dia<sup>-1</sup> para os experimentos de laboratório e entre 2,3 e 8,7% dia<sup>-1</sup> para os experimentos de campo. *Gracilaria caudata* foi a alga que apresentou as menores taxas, entre 0,8 e 4,9% dia<sup>-1</sup>, enquanto *Hypnea musciformis* apresentou taxas de crescimento bastante elevadas, variando entre 5,6 e 15,2% dia<sup>-1</sup>. Esses resultados são preliminares, e para uma avaliação confiável do potencial produtivo dessas algas, são necessários experimentos complementares.

VIDOTTI & ROLLEMBERG (2004), concluíram, estudando as algas, da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica, que grande variedade de algas encontrou uso bastante diversificado em vários países no mundo, da indústria alimentícia à de medicamentos, da cosmética à agricultura mas que é preciso potencializar os recursos científicos, tecnológicos e financeiros, coordenados os esforços nas áreas ligadas à utilização dessas algas e a pesquisa básica, para que as propriedades desses



organismos possam ser plenamente aproveitadas, priorizando a qualidade da vida humana e respeitando os ecossistemas.

ALISTE (2006) objetivando a utilização de soluções dos hidrocolóides agarana, carragenana e alginato de sódio, irradiadas com diferentes doses (0-10 kGy) de radiação gama de Co-60 na presença de antioxidantes também utilizados na indústria alimentícia: ácido ascórbico, extrato vegetal de rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.) e isoflavona de soja. As soluções dos polissacarídeos comestíveis agarana, carragenana e alginato de sódio mostraram ser bons sistemas para avaliar o efeito da radiação ionizante, por apresentar radiosensibilidade característica medida pelas mudanças na viscosidade; os resultados indicaram que, no geral, esses antioxidantes apresentam ação radioprotetora, o que pode ser de grande valia nas aplicações futuras da irradiação de alimentos em escala comercial.

BRAVIN *et al.* (2006) avaliaram o efeito na formação de calos e na regeneração de plantas de culturas axênicas de *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux, estabelecidas em meio de Provasoli (PES) sólido com diferentes concentrações de ágar (0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 %). O cultivo em meio sólido induziu a formação de quatro tipos de calo (apical - CApi, lateral 1 - CLat1, lateral 2 - CLat2 e basal - CBas), constituídos internamente por proliferações unisseriadas pigmentadas. O tipo CApi foi o mais frequente (taxa de 5,3 calos por explante em 1,0% de ágar). A maior biomassa das plântulas regeneradas (7,4 g) foi alcançada a partir de calo cultivados a 1,0% de ágar. A formação dos quatro tipos de calos é um dado inédito e indica que as diferentes concentrações de ágar no meio apresentam efeitos morfogenéticos no crescimento dos calos e na regeneração de segmentos apicais em *H. musciformis*.

YOSHIMURA (2006) observou, ao avaliar o potencial de cultivo e a produção de ágar de *Gracilaria domingensis* e de *Gracilaria caudata* (Rhodophyta, Gracilariales) na Enseada de Armação do Itapocoroy (Penha, Santa Catarina) objetivando comparar a extração do ágar da *Gracilaria domingensis* e de *Gracilaria caudata*, que o melhor protocolo de extração do ágar da *Gracilaria domingensis* foi o tratamento com CaCl<sub>2</sub> (0,5 e 1,0%), extraindo 8,6% e 7,9%, respectivamente e para a *Gracilaria birdiae* foi com NaOH-frio, o qual extraiu 22,9%.

CHOW *et al.* (2007) descreveram o ensaio *in vitro* para caracterizar a atividade enzimática da NR (enzima nitrato redutase) em termos de constantes cinéticas e estabilidade e avaliaram sua oscilação ao longo do dia e a influência da glicose na modulação dessa enzima. Picos máximos de atividade da NR foram observados a 20 °C e



pH 8,0. A estabilidade enzimática do extrato bruto armazenado a  $3 \pm 1$  °C foi significativamente reduzida após 48 horas. As constantes aparentes de Michaelis-Menten (KM) para NADH e nitrato, foram 22  $\mu\text{M}$  e 3,95 mM, respectivamente. A atividade da NR apresentou oscilação sob fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro, com três vezes mais atividade durante a fase de luz, apresentando seu máximo após 10 horas de luz. Sob condições ótimas de ensaio a atividade máxima foi de  $92,9 \times 10^{-3}$  U  $\text{g}^{-1}$ . A adição de glicose induziu a atividade da NR durante as fases de luz e de escuro, evidenciando uma via de modulação dessa enzima pela fotossíntese. Esta relação pode ser explicada pela necessidade de esqueletos de carbono, fornecidos pela fotossíntese, para incorporar os metabólitos intermediários da via de assimilação do nitrato evitando, assim, a toxicidade intracelular, pela acumulação de nitrito e amônio.

COSTA *et al.* (2007) objetivaram avaliar a ação do ágar e sua substituição parcial e total pelo amido de mandioca na composição de meios de cultura de bananeira e abacaxizeiro. Gemas axilares de abacaxizeiro cvs. Rio Branco e Quinari, foram estabelecidas e avaliadas por quatro subcultivos quanto à multiplicação em meio de MS, suplementado com 2 mg  $\text{L}^{-1}$  de BAP e 0,25 mg  $\text{L}^{-1}$  de ANA, tal como os seguintes tratamentos: M1: ágar (5 g  $\text{L}^{-1}$ ), M2: ágar (2,5 g  $\text{L}^{-1}$ ) + fécula de mandioca (60 g  $\text{L}^{-1}$ ), M3: fécula de mandioca (60 g  $\text{L}^{-1}$ ), e M4: ágar (2,5 g  $\text{L}^{-1}$ ) + fécula de mandioca (30 g  $\text{L}^{-1}$ ). Num segundo experimento, por três subcultivos sucessivos, brotações de bananeira da cv. Grand Naine foram avaliadas quanto à multiplicação em meio de cultura composto por: MM1: ágar (6 g  $\text{L}^{-1}$ ); MM2: ágar (3 g  $\text{L}^{-1}$ ) + fécula de mandioca (30 g  $\text{L}^{-1}$ ); MM3: fécula de mandioca (60 g  $\text{L}^{-1}$ ) e MM4: meio de consistência líquida estacionário. Esses meios foram suplementados com 0, 2, 4 e 6 mg  $\text{L}^{-1}$  de BAP; para o abacaxizeiro verificou-se que a substituição total do ágar pela fécula proporcionou resultados similares aos obtidos com o do tratamento com Agar; na combinação ágar + fécula os resultados foram inferiores aos obtidos com os solidificantes usados isoladamente para a bananeira, o uso isolado ou combinado da fécula com ágar não proporcionou melhoria nas taxas de multiplicação, mas os melhores resultados foram obtidos em meio com ágar e 2 mg  $\text{L}^{-1}$  de BAP, enquanto o cultivo em meio líquido apresentou o menor índice de multiplicação.

LUCENA *et al.* (2007) indicaram, objetivando realizar um levantamento das macroalgas presentes no infralitoral do município de Pitimbu, litoral sul do estado da Paraíba, Brasil e identificaram 78 táxons, dos quais 13 pertencentes à Divisão Chlorophyta, 14 à Divisão Ochrophyta (Phaeophyceae) e 51 à Divisão Rhodophyta. As algas vermelhas

contribuíram com nove ordens, a mais representativa da Ordem Ceramiales, com 22 espécies, em que as pardas estiveram representadas principalmente pela Ordem Dictyotales, com 10 espécies, enquanto as verdes pela Ordem Bryopsidales, contendo 10 espécies. Os autores destacaram 9 adições para o Estado da Paraíba, sendo duas algas pardas e sete de Rhodophyta, dentre as quais *Dictyota caribaea*, constituindo uma primeira referência para o litoral nordestino.

MACIEL *et al.* (2008) indicaram, caracterizando estruturalmente o polissacarídeo extraído a frio do polissacarídeo sulfatado solúvel de algas marinhas vermelhas, *Gracilaria birdiae* cultivadas ao longo do nordeste brasileiro, por infravermelho (FT-IR) e espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN), que a composição de polissacarídeo das algas é  $\beta$ -d-Galp (50,3%), 3,6-anidro- $\alpha$ -1-Galp (40,5%) e  $\alpha$ -1Galp-6 sulfato (9,2%).

ÁGAR-ÁGAR (2008) afirma que o ágar é um hidrocoloide extraído de algas marinhas largamente utilizados na indústria alimentícia, verificando que entre suas principais propriedades se destacam o alto poder geleificante, elevada força de gel a baixas concentrações, baixa viscosidade em solução, alta transparência, gel termorreversível e temperaturas de fusão/gelificação bem definidas. O ágar-ágar também é utilizado em diversas aplicações em outros setores industriais, cujo interesse econômico pelos ficoloides é explicado pelo fato de apresentarem propriedades gelatinizantes e espessantes, o que lhes agrega valor comercial considerável.

### 2.7.2 – Elaborados lácteos e análises

TORRES *et al.* (2000), objetivando determinar o valor calórico dos alimentos de origem animal comumente usados na dieta: carne, leite e ovos, a fim de compará-los com os dados das tabelas de composição centesimal mais utilizadas por profissionais da área de alimentos, quantificaram os componentes presentes no iogurte, ficando com 85,87% de umidade, 0,71% de cinzas, 2,16% de lipídios, 4,29% de proteínas, 5,16% de carboidratos e 58 kcal.

ALMEIDA *et al.* (2001) procuraram verificar as características físicas e químicas de bebidas lácteas preparadas com três concentrações de soro de queijo Minas Frescal (30, 40 e 50%), empregando dois tipos de cultura láctica: uma tradicional para iogurte (YC-180), contendo cepas mistas de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus*

*delbrueckii* subsp. *lactis* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e outra (ABY-1) contendo cepas mistas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobacteria e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Constatou-se que as bebidas lácteas apresentaram diferença estatística no tempo zero para os teores de gordura e de extrato seco. À medida em que se elevou a proporção de soro em relação ao leite, os teores de gordura e de extrato seco diminuíram. O teor de proteína também diminuiu sempre que se aumentou o teor de soro nas bebidas lácteas, embora a diferença não tenha sido tão acentuada quanto as observadas para os teores de gordura e de extrato seco. Em relação à lactose, não se constatou diferença entre os tratamentos. Os teores de soro não influenciaram o índice de proteólise das bebidas lácteas. Verificou-se, todavia, que as bebidas elaboradas com a cultura probiótica ABY-1 apresentaram valores superiores para proteólise quando comparadas com as bebidas elaboradas com as culturas YC-180. As bebidas lácteas elaboradas com 30% de soro sinalizaram maiores valores para viscosidade, enquanto as bebidas elaboradas com a cultura YC-180 indicaram valores superiores para viscosidade, durante o período de armazenamento.

KONKEL *et al.* (2004) com o objetivo de avaliar a preferência de amostras de doce de leite obtidas em laboratório com quantidades conhecidas de amido e a atitude de consumidores frente às duas amostras comerciais contendo 1,0 e 7,6% de amido, utilizaram o método de ordenação e verificaram o nível de aceitação das amostras, através de escala hedônica de 9 pontos, na qual 50 julgadores avaliaram as amostras pelos atributos cor, consistência, sabor e doçura. As amostras comerciais foram avaliadas através de uma escala de ação. Nas amostras produzidas em laboratório verificou-se que não houve diferença significativa quanto à preferência ( $p > 0,05$ ) no teste de ordenação e, na avaliação da aceitação por atributos, constatou-se que amostras menos doce e com valores intermediários de cor e consistência, foram as preferidas. Para as amostras comerciais a média de aceitação foi de 6,7 para o produto com teor de amido permitido, de 4,9 para aquela com excesso de amido.

SANTOS *et al.* (2006) avaliaram, estudando o desenvolvimento de uma bebida láctea fermentada à base de soro de queijo mussarela e polpa de umbu, as características físico-químicas e físicas da aceitação sensorial, além do efeito da temperatura e da concentração de soro sobre a massa específica das bebidas formuladas, variando, somente a concentração de soro (20, 40, 60 e 80 %). A partir dos resultados obtidos e das análises estatísticas, ficou patente que os valores para as características físico-químicas e a

aceitação sensorial não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos 20, 40 e 60% ( $p > 0,05$ ). A partir dos resultados obtidos das análises físico-químicas e sensorial, concluiu-se que a melhor bebida foi aquela que apresentou concentração de soro de 60% devido à utilização de maior quantidade de soro. Para a análise da influência da concentração de soro e temperatura sobre a massa específica, foi ajustado um modelo linear múltiplo sem interação dos parâmetros, com coeficiente de determinação satisfatório.

OLIVEIRA *et al.* (2006) objetivaram avaliar sensorialmente três diferentes formulações de bebida láctea fermentada com adição de polpa de frutas, com diferentes concentrações de soro de queijo (10, 30 e 50%) e enriquecidas com ferro quelato aminoácido, através do teste de ordenação de preferência com provadores adultos, para determinar a ordem de preferência entre os tratamentos a partir da diferença mínima significativa pela soma de ordens de Friedman. Também em adultos foi empregado o teste de diferença triangular para detectar a adição do ferro. As diferenças entre as amostras foram determinadas utilizando-se o número mínimo de seleções corretas. Como a bebida láctea aromatizada é um alimento muito consumido por crianças, também se realizou o teste de aceitação por meio de escala hedônica facial, com crianças com idade entre 4 e 6 anos. Todas as avaliações estatísticas foram consideradas no nível de 5% de probabilidade. As amostras do tratamento com 10% de soro na formulação foram as menos preferidas pelos provadores enquanto a preferência entre as amostras com 30 e 50% de soro não diferiam entre si; já em relação à presença de ferro, os resultados da análise sensorial indicaram que a adição de ferro foi percebida pelos provadores adultos; já para as crianças, a adição de ferro não foi notada e o produto teve sua aceitação classificada entre os termos “gostei” e “gostei extremamente”.

BRANCO *et al.* (2007) elaboraram um blend de suco de laranja e cenoura com diferentes teores de cenoura (5 e 25%) e concentrado a diferentes teores de sólidos solúveis (15 e 30 °Brix); foram realizadas análises físicas e químicas das matérias-primas e do blend com maior preferência sensorial, com a finalidade de caracterizar o produto e, principalmente, verificar as alterações do ácido ascórbico e dos carotenoides totais após o processo de concentração dos blends; investigou-se a estabilidade física e química do blend durante sessenta dias. O teste de ordenação-preferência mostrou que a formulação do blend com 5 % de cenoura e 15 °Brix de concentração, foi a preferida pelos julgadores. O

processo de concentração e o armazenamento pelo período de 60 dias, acarretaram na redução significativa dos conteúdos de ácido ascórbico e carotenoides totais.

CUNHA *et al.* (2008) verificaram, avaliando físico-quimicamente, microbiologicamente e reologicamente, bebida láctea e leite fermentado, adicionados de probióticos, verificaram ao produzirem uma Bebida láctea (amostra 1), com 70% de leite e 30% de soro de queijo e um leite fermentado (amostra 2), com 100% de leite adicionados de *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium* Bb-12 e *Streptococcus thermophilus*, em que a adição de soro resultou em uma bebida láctea com menores teores ( $p < 0,05$ ) de sólidos totais ( $18,08 \pm 0,08\% \text{ m m}^{-1}$ ), proteínas ( $2,23 \pm 0,10\% \text{ m m}^{-1}$ ), lipídios ( $1,91 \pm 0,02\% \text{ m m}^{-1}$ ) e valor calórico ( $79,27 \pm 0,37 \text{ Kcal/100 g}$ ), quando comparados com os teores apresentados no leite fermentado, respectivamente iguais a  $19,44 \pm 0,02\% \text{ m m}^{-1}$ ;  $2,80 \pm 0,23\% \text{ m m}^{-1}$ ;  $3,03 \pm 0,08\% \text{ m m}^{-1}$  e  $90,47 \pm 0,53 \text{ Kcal/100 g}$ ; já, os teores de cinzas, carboidratos, acidez e pH da bebida láctea e do leite fermentado, não diferiram ( $p > 0,05$ ). De acordo com a legislação brasileira a bebida láctea e o leite fermentado foram considerados probióticos ( $> 106 \text{ UFC/mL}$ ). As duas amostras (1 e 2) se comportaram como fluidos pseudoplásticos, confirmando o comportamento não-Newtoniano e apresentaram tixotropia. Os valores para a energia de ativação foram iguais a  $1,89 \text{ Kcal mol}^{-1}$ , para a bebida láctea e  $1,84 \text{ Kcal mol}^{-1}$ , para o leite fermentado indicando que a energia de ativação não foi influenciada pelo teor de soro empregado, tal como a temperatura também não exerceu influência sobre a viscosidade aparente das amostras 1 e 2.

KEMPKA *et al.* (2008) tendo como objetivo o desenvolvimento de uma bebida láctea fermentada com características probióticas. Além disso, propõem-se a utilização de soro de leite e extrato hidrossolúvel de soja como substratos, agregando valor às matérias-primas de baixo custo, com características funcionais. Para tal, foi utilizada técnica do planejamento de experimentos para obter a formulação de bebida láctea, utilizando como substratos leite de vaca, soro de leite e extrato hidrossolúvel de soja. A formulação contendo 30% de extrato hidrossolúvel de soja, 36,6% de leite de vaca e 33,3% de soro de leite foi definida como ideal em termos de análise sensorial e avaliação do crescimento celular. Análises organolépticas, microbiológicas e físico-químicas definiram a vida útil do produto. Durante o período de armazenamento, a bebida láctea sabor pêssego apresentou células viáveis da cultura mista adicionada dentro dos padrões estabelecidos ( $1 \times 10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$ ) até o 22º dia. A qualidade físico-química apresentou pequenas alterações, sendo que a acidez ficou bastante evidenciada ( $90 \text{ }^\circ\text{D}$ ) a partir do 22º dia de



armazenamento. A qualidade sensorial definiu o término do armazenamento no 14º dia, pelo fato da bebida já apresentar acidez elevada, sendo rejeitada nas análises sensoriais. A bebida láctea sabor pêssego desenvolvida teve uma vida útil de aproximadamente 14 dias, sem adição de conservante.

BORGES *et al.* (2009) analisaram as características físico-química e sensorial de iogurte batido elaborado com leite bubalino acrescido de calda de cajá e o compararam com o tradicional iogurte bovino. Foram elaborados dois grupos experimentais: IB (iogurte elaborado com leite de búfala) e IV (iogurte elaborado com leite de vaca), os quais receberam calda de cajá na proporção 15%. Os dois grupos de iogurte foram analisados quanto ao pH, acidez, sólidos totais, cinzas, proteína, gordura, açúcares redutores e redutores totais (%). O painel sensorial composto por 90 alunos com idades entre 11 e 16 anos de uma escola pública, avaliou os atributos aparência, aroma, consistência e sabor utilizando escala hedônica de nove pontos. Os resultados mostraram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos IB e IV, sobretudo para o teor de sólidos totais (23,86 e 15,68% IB e IV, respectivamente) e proteína (5,50 e 4,77% IB e IV, respectivamente). O iogurte bubalino apresentou escore sensorial superior ( $p < 0,05$ ) em todos os atributos sensoriais analisados. Conclui-se, desta forma, que o iogurte bubalino apresenta diferenças marcantes do ponto de vista físico-químico e sensorial, em relação ao iogurte bovino.

CALDEIRA *et al.* (2010) objetivando avaliar as características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de bebidas lácteas elaboradas com leite de búfala e diferentes níveis de iogurte e soro lácteo, desenvolveram cinco formulações à base de leite de búfala, soro de queijo tipo frescal e iogurte. Os tratamentos foram: T1 = 10% leite, 10% soro e 80% iogurte; T2 = 10% leite, 20% soro e 70% iogurte; T3 = 10% leite, 30% soro e 60% iogurte; T4 = 10% leite, 40% soro e 50% iogurte e T5 = 10% leite, 50% soro e 40% iogurte. Para o leite e o soro, foram determinadas acidez titulável (°D), densidade a 15 °C, gordura, EST e ESD, além de revelado que os níveis de soro influenciaram os valores de pH, acidez, gordura, proteína, viscosidade e L\* das bebidas lácteas enquanto as coordenadas de cromaticidade a\* e b\* não sofreram influência. As formulações com 10 % e 20 % de soro foram as mais aceitas no teste de aceitação sensorial, bem como na preferência pelos julgadores.

SILVA *et al.* (2011) objetivando extrair o amido de resíduos industriais provenientes do caroço de manga espada e utilizá-lo como espessante e estabilizante em formulações lácteas, afirmaram que o mesmo possui alto poder espessante visto que, no



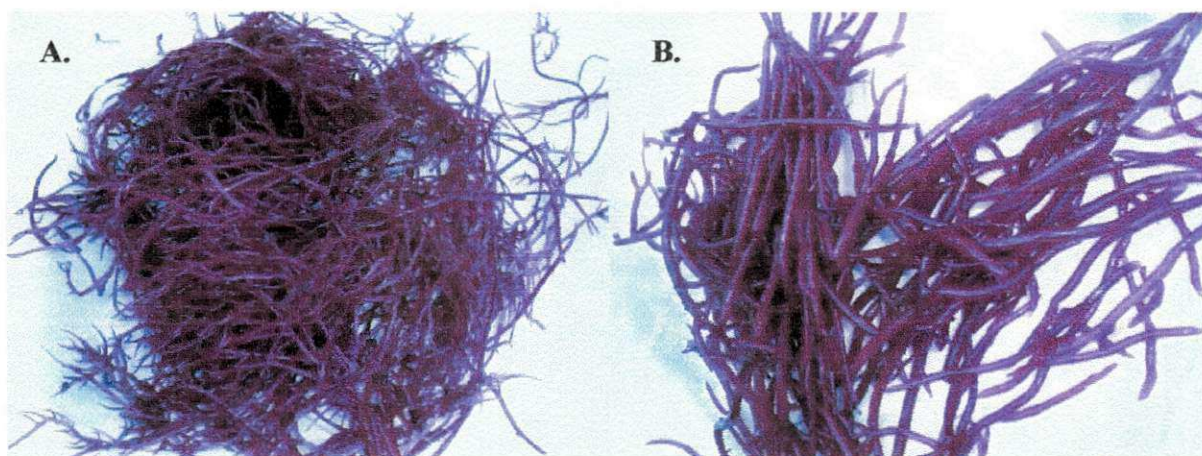
resultado da análise sensorial da bebida láctea, houve boa aceitação por parte dos provadores em relação à sua textura onde tanto na visualização como no paladar foi bastante notável.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 – Matéria-prima

As matérias-primas utilizadas neste estudo foram as algas *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira e a *Gracilaria caudata* J. Agardh. As algas foram coletadas na Praia do Amor, na Praia de Pipa/Tibau do Sul – RN (6° 13' 40" S; 35° 03' 05" W), selecionadas e encaminhadas ao NUPEA (Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos) e ao LAPPA (Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas) do Departamento de Química do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual da Paraíba, Paraíba.

A Figura 3.1 ilustra imagens da algas: *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira e *Gracilaria caudata* J. Agardh.



**Figura 3.1** - Alga *Gracilaria caudata* J. Agardh (A), Alga *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira (B)

#### 3.2 – Identificação das Algas

As amostras para identificação foram coletadas e preservadas em formol, a 4%, em água do mar. As algas foram identificadas previamente (para confirmação de suas identidades) no LAM/UFPB - Laboratório de Algas Marinhas do Departamento de Sistemática e Ecologia - Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba.

Seguiram-se, para identificação, os métodos e trabalhos comumente utilizados na ficologia marinha, sendo utilizada a base nomenclatural proposta por WYNNE (2005).

### **3.3 – Toxicidade frente à *Artemia salina* Leach**

Os ensaios de toxicidade são métodos utilizados na detecção e avaliação da capacidade própria de um agente, em produzir efeitos nocivos nos organismos vivos. Consistem na exposição de organismos padronizados, neste caso a *Artemia salina* Leach, a diferentes concentrações de substâncias químicas, compostos químicos, efluentes ou água, para este estudo, extrato de algas marinhas, por determinado período de tempo (GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990).

Com o objetivo de verificar a toxicidade das algas (*Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira e a *Gracilaria caudata* J. Agardh), realizou-se o bioensaio com *Artemia salina*, baseado na técnica descrita por MEYER *et al.* (1982). Os ovos da *Artemia salina* foram incubados e após eclosão 10 larvas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de água salina (38 g L<sup>-1</sup>) e o extrato das algas em diferentes concentrações (10 a 1000 µg mL<sup>-1</sup>). Após 24 horas de contato foi observada a CL<sub>50</sub> (concentração letal média). A CL<sub>50</sub> foi obtida através do gráfico de % de animais mortos em função do logaritmo da dose testada. O teste foi realizado em triplicata e os resultados foram submetidos a tratamento estatístico utilizando-se o Biostat, o qual forneceu os valores de CL<sub>50</sub>, considerando-se tóxica a amostra que apresentou CL<sub>50</sub> < 1000 ppm.

### **3.4 – Composição físico-química das algas**

A composição centesimal das algas foi realizada através das seguintes determinações:

#### **3.4.1 – Umidade**

Determinada através de leitura direta em balança de infravermelho (marca MARTE, modelo ID200) (BRASIL, 2008).

### **3.4.2 – Lipídios**

Determinados utilizando-se extração semicontínua com éter de petróleo em extrator Soxhlet (BRASIL, 2008).

### **3.4.3 – Proteínas**

Realizada segundo o método de Kjeldahl utilizando-se um digestor (marca TECNAL, modelo TE 007A), um destilador (TECNAL, modelo TE036/1) e se aplicando um fator de 6,25 (BRASIL, 2008).

### **3.4.4 – Sais minerais (cinzas)**

Quantificados por gravimetria após incineração em forno de mufla, a 550°C. O método se fundamenta na perda de peso que ocorre quando o produto é incinerado a 550°C, com destruição da matéria orgânica, sem decomposição apreciável dos constituintes do resíduo mineral ou por perda de volatilização (BRASIL, 2008).

### **3.4.5 – Carboidratos**

O conteúdo de carboidratos totais, incluindo fibras, foi calculado por diferença de 100 com a soma dos percentuais dos demais componentes da composição centesimal.

## **3.5 – Caracterização da água do mar**

A análise da água do mar teve por finalidade o conhecimento microbiológico de onde foram coletadas as algas (*Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira e a *Gracilaria caudata* J. Agardh) e a posterior verificação de contaminação ou não desses locais. As amostras da água foram coletadas na Praia do Amor, localizada na Praia de Pipa/Tibau do Sul, RN (6° 13' 40" S; 35° 03' 05" W) (Figura 3.2), em recipientes plásticos (sacos próprios para coleta), alíquotas de 100 mL e acondicionadas em caixas de isopor contendo cubos de gelo e encaminhadas para o NUPEA – Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos, do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual da Paraíba.





**Figura 3.2** – Vista parcial do local de coleta das algas - Praia do Amor na Praia de Pipa, RN

#### **3.4.1 – Análises microbiológicas da água do mar**

##### **3.5.1.1 – Determinação de coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C**

O procedimento para contagem de coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C pela técnica dos tubos múltiplos, foi realizado segundo SILVA *et al.* (2005), como descrito a seguir:

As amostras foram preparadas com agitação, invertendo os sacos de coletas 25 vezes em ângulo de 45°.

- a) **Teste presuntivo:** Foram preparadas 3 séries de 5 tubos contendo Caldo Lactosado, inoculados 10 mL da amostra em cada tubo utilizando-se Caldo Lactosado em dupla concentração e, nas séries seguintes em concentração normal, todos os tubos com tubo de Durhan. Na primeira e na segunda série foi inoculado 1 mL da amostra em cada tubo e na terceira série foram inoculados  $10^{-1}$  da amostra em cada tubo. Os tubos foram incubados a  $35 \pm 0,5$  °C por  $24 \pm 2$  horas. A positividade dos tubos foi evidenciada pela presença de bolhas nos tubos de Durhan e/ou turbidez no meio. Para os tubos positivos a análise passou para o passo seguinte.

- b) **Confirmação de coliformes a 35 °C:** A partir de cada tubo positivo de Caldo Lactosado foi transferida uma alçada bem carregada para tubos contendo Caldo Verde Brilhante Bile e incubados os tubos a  $35 \pm 0,5$  °C durante 24 – 48 horas, observando-se se houve crescimento com produção de gás confirmativo para coliformes a 35°C. O Número Mais Provável (NMP) foi determinado pela tabela de NMP apropriada às diluições inoculadas (SILVA *et al.*, 2005), sendo encaminhados os tubos positivos para a etapa seguinte.
- c) **Confirmação de coliformes a 45 °C:** A partir de cada tubo positivo de Caldo Verde Brilhante Bile, foi transferida uma alçada bem carregada para tubos contendo Caldo EC e incubados os tubos em banho-maria a  $44,5 \pm 0,2$  °C por  $24 \pm 2$  horas. A positividade dos tubos foi evidenciada pela presença de bolhas nos tubos de Durhan. O número de tubos positivos foi anotado e o Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 45 °C foi determinado pela tabela de NMP apropriada às diluições inoculadas.

### 3.5.1.2 – Determinação de estreptococos fecais e enterococos

O procedimento para contagem de estreptococos fecais e enterococos pela técnica dos tubos múltiplos, foi realizado de acordo com SILVA *et al.* (2005), como descrito a seguir:

A amostra foi preparada com agitação, como descrita no item 3.5.1.1.

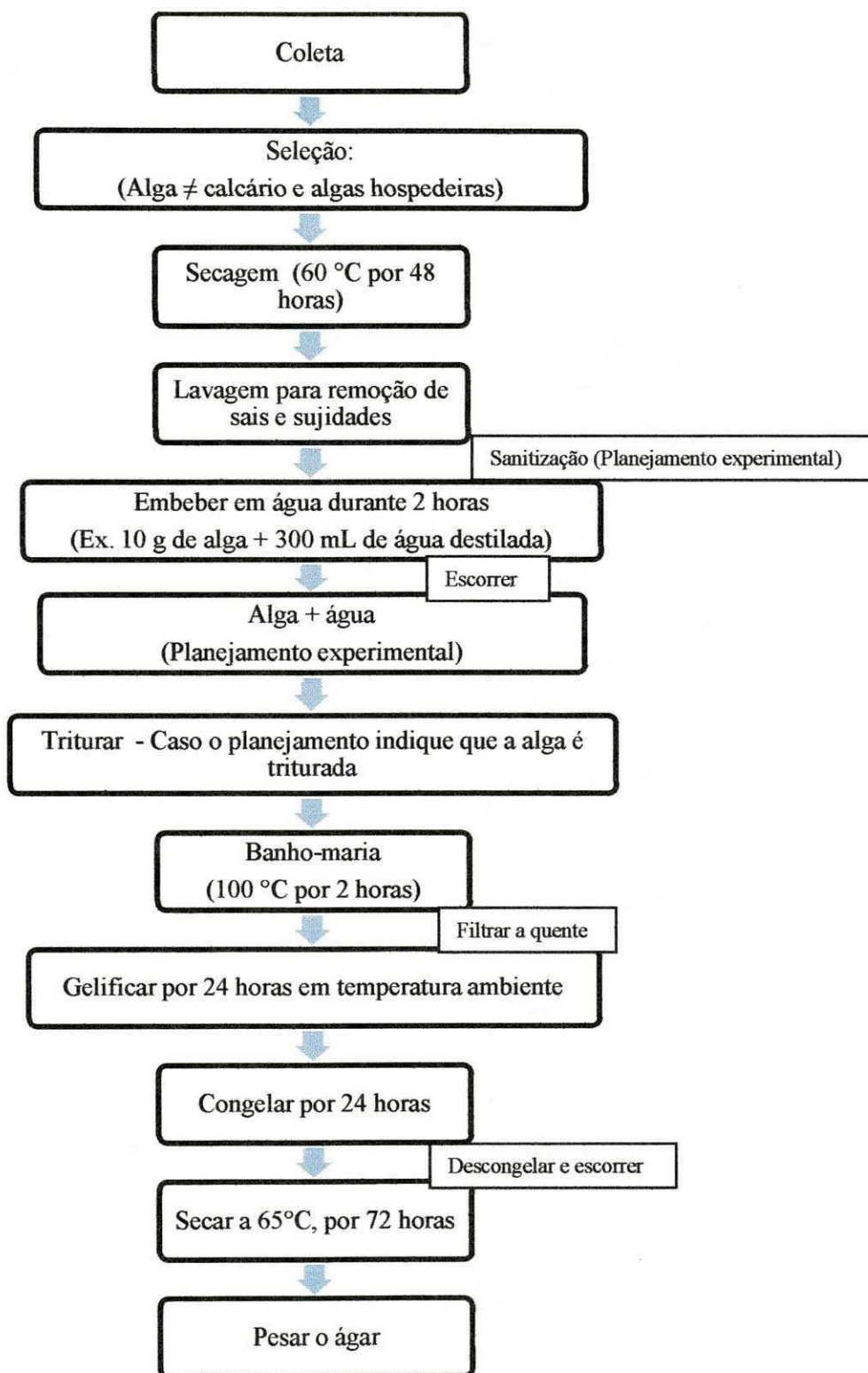
- a) **Teste presuntivo:** Foram adicionados 10 mL da amostra em 10 tubos contendo 10 mL de Caldo Azida Dextrose, em concentração dupla e inoculados a  $35 \pm 0,5$  °C por  $24 \pm 2$  horas observando se houve ocorrência de crescimento. Para confirmação de estreptococos fecais e enterococos, foi realizado o teste confirmativo.
- b) **Teste confirmativo:** A partir de cada tubo positivo de Caldo Azida Dextrose foi estriada uma alçada da cultura em placas contendo Ágar Pfizer Seletivo *Enterococcus* (PSE) incubadas as placas a 35 °C, por 48 horas constatando, então, se ocorreu o desenvolvimento de colônias típicas, castanho enegrecidas com halo marrom, confirmativas para estreptococos fecais. Anotou-se o número de placas



positivas e se determinou o Número Mais Provável (NMP) pela tabela de NMP apropriada às diluições inoculadas (SILVA *et al.*, 2005)

### **3.6 – Extração do ágar**

A extração do ágar das algas *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira e *Gracilaria caudata* J. Agardh seguiu o fluxograma da Figura 3.3, com base no trabalho de YOSHIMURA (2006) com modificações.

**Figura 3.3** – Fluxograma de extração do ágar

As algas (*Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira e *Gracilaria caudata* J. Agardh) foram encaminhadas para seleção, de onde foram retirados os calcários remanescentes e as algas hospedeiras.

A etapa seguinte foi a secagem a 60 °C, por 48 horas, que visa à retirada da água das algas para facilitar a lavagem e o armazenamento para posterior utilização; em seguida, a lavagem foi realizada com água corrente para remoção de sais e sujidades, após foi feita a sanitização, que seguiu o planejamento fatorial evidenciado nas Tabelas 3.2 (*Gracilaria birdiae* Plantino & Oliveira) e 3.4 (*Gracilaria caudata* J. Agardh). Logo após a sanitização foi feita sua embebição com água destilada na proporção 1 porção de alga e 30 de água, durante 2 horas; a alga foi escorrida para retirar o excesso de água; enfim, parte das algas foi triturada em liquidificador industrial, segundo planejamento fatorial.

As algas foram colocadas em banho-maria a 100 °C, por 2 horas, após o término deste tempo as algas foram filtradas a quente, em tecido de algodão, para facilitar a filtração; o filtrado foi deixado em repouso para gelificar, por 24 horas; decorrido este tempo, o filtrado foi colocado em congelador doméstico para congelar, por mais 24 horas; ao terminar este tempo, o filtrado foi retirado do congelador e se esperou o seu descongelamento e a água livre foi eliminada.

O filtrado foi colocado em estufa de circulação de ar, por 72 horas a 65 °C, para que a água fosse retirada.

### **3.6.1 – Planejamento fatorial para a extração de ágar**

Os profissionais de diferentes formações têm buscado, a cada dia, otimizar os produtos, minimizar custos e tempo, maximizar rendimento, produtividade e qualidade de produtos, dentre outros objetivos; com todas essas finalidades vem crescendo a busca de técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

O planejamento consciente dos experimentos que devem ser realizados para determinar e quantificar a influência das variáveis sobre as respostas desejadas é indispensável para que se obtenham resultados confiáveis e para que análises estatísticas consistentes possam ser realizadas (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

Com o objetivo de avaliar, quantitativamente, a influência das variáveis de entrada (concentração de hipoclorito, condição da alga e quantidade de água), escolhidas a partir de observações feitas na literatura com algumas modificações sobre a resposta (rendimento

de ágar) para a *Gracilaria birdiae* Plantino & Oliveira, foi realizado um planejamento fatorial em que na Tabela 3.1 estão expostos os níveis reais e codificados das variáveis independentes para o planejamento fatorial  $2^3$ , observado na Tabela 3.2, que totaliza 8 experimentos. Os níveis das variáveis independentes foram propostos através de observações na literatura (YOSHIMURA, 2006).

**Tabela 3.1** – Valores reais e codificados das variáveis de entrada para a *Gracilaria birdiae* Plantino & Oliveira utilizando-se como padrão, 10 gramas de algas

Variáveis	Nível -1	Nível +1
Hipoclorito (%)	0,5	1
Condição da alga	Inteira	Triturada
Quantidade de água (%)	15	30

**Tabela 3.2** – Matriz do planejamento fatorial completo  $2^3$  para a *Gracilaria birdiae* Plantino & Oliveira

Experimentos	Hipoclorito	Condição da alga	Quantidade de água
1	- (0,5 %)	- (Inteira)	- (15%)
2	+ (1 %)	- (Inteira)	- (15%)
3	- (0,5 %)	+ (Triturada)	- (15%)
4	+ (1 %)	+ (Triturada)	- (15%)
5	- (0,5 %)	- (Inteira)	+ (30%)
6	+ (1 %)	- (Inteira)	+ (30%)
7	- (0,5 %)	+ (Triturada)	+ (30%)
8	+ (1 %)	+ (Triturada)	+ (30%)

Visando ao conhecimento do rendimento de ágar da *Gracilaria caudata* J. Agardh realizou-se um planejamento fatorial  $2^2$ , fixando o valor de hipoclorito em 1%, justificando o fato de a utilização do ágar ser para fins alimentícios pois, quanto menor o odor e a cor característicos da alga, melhor, sensorialmente, será o produto final.

Para avaliar quantitativamente a influência das variáveis de entrada, agora, neste caso, a condição da alga e a quantidade de água, sobre a resposta (rendimento de ágar) para a *Gracilaria caudata* J. Agardh, foi realizado um planejamento fatorial, na Tabela 3.3

estão expostos os níveis reais e codificados das variáveis independentes de entrada para o planejamento fatorial  $2^2$ , observado na Tabela 3.4, que totaliza 4 experimentos distintos.

**Tabela 3.3** – Valores reais e codificados das variáveis de entrada para a *Gracilaria caudata* J. Agardh, utilizando-se como padrão 10 gramas de alga

Variáveis	Nível -1	Nível +1
Condição da alga	Inteira	Triturada
Quantidade de água (%)	15	30

**Tabela 3.4** – Matriz do planejamento fatorial completo  $2^2$  para a *Gracilaria caudata* J. Agardh

Experimentos	Condição da alga	Quantidade de água
1	- (Inteira)	- (15%)
2	+ (Triturada)	- (15%)
3	- (Inteira)	+ (30%)
4	+ (Triturada)	+ (30%)

O ágar que obteve maior rendimento foi utilizado para elaboração dos elaborados lácteos.

### 3.7 – Desenvolvimento das bebidas lácteas acrescentando o ágar

Foram realizadas três fermentações lácticas; a primeira, para a produção de uma bebida láctea fermentada; a segunda para produção de um iogurte tradicional e a terceira para a produção de um iogurte batido partindo, a princípio, do mesmo planejamento fatorial.

### 3.7.1 – Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados na elaboração das bebidas lácteas e dos iogurtes, foi uma cultura à base de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*.

#### 3.7.1.1 – Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado adicionando-se, à cultura liofilizada um frasco Erlenmeyer, contendo leite em pó desnatado reconstituído a 13%, esterilizado a 90 °C durante 15 minutos, resfriado a 46 °C e incubado a 43 °C, permanecendo por 5 horas; após o período de incubação o inóculo foi armazenado sob refrigeração a 5 °C.

### 3.7.2 – Elaboração dos produtos

As bebidas fermentadas e os iogurtes foram elaborados com o leite em pó desnatado reconstituído, sendo sua quantidade variável de acordo com o planejamento fatorial (Tabela 3.5), pasteurizado a 90 °C durante 5 minutos, resfriado a 43 °C e acrescido de % inóculo e adicionado de % ágar da *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira, de acordo com o planejamento experimental fatorial  $2^3$ , com três pontos centrais; incubado a 45°C durante 5 horas para avaliar quantitativamente a influência das variáveis de entrada sobre as variáveis respostas que são pH, acidez, contagem do número de células viáveis, açúcares redutores totais, açúcares não redutores e açúcares redutores do produto, a cada hora de experimento como mostram as Tabelas 3.5 e 3.6; para o produto final de cada experimento foi realizado o teste de viscosidade.

**Tabela 3.5** - Valores reais e codificados das variáveis de entrada

Variáveis	Nível -1	0	Nível +1
Ágar da <i>Gracilaria birdiae</i> Plastino & Oliveira(%)	0,25	0,5	0,75
Reconstituição do leite (%)	6,5	9,75	13
Inóculo (%)	1,5	2,25	3,0



**Tabela 3.6** - Matriz do planejamento fatorial  $2^3 + 3$  ponto central

Experimentos	Ágar (%)	Leite (%)	Inóculo (%)
1	(-1) 0,25	(-1) 6,5	(-1) 1,5
2	(+1) 0,75	(-1) 6,5	(-1) 1,5
3	(-1) 0,25	(+1) 13	(-1) 1,5
4	(+1) 0,75	(+1) 13	(-1) 1,5
5	(-1) 0,25	(-1) 6,5	(+1) 3,0
6	(+1) 0,75	(-1) 6,5	(+1) 3,0
7	(-1) 0,25	(+1) 13	(+1) 3,0
8	(+1) 0,75	(+1) 13	(+1) 3,0
9	(0) 0,5	(0) 9,75	(0) 2,25
10	(0) 0,5	(0) 9,75	(0) 2,25
11	(0) 0,5	(0) 9,75	(0) 2,25

De acordo com o planejamento da Tabela 3.6, os experimentos 1, 2, 5 e 6 são bebidas lácteas, os experimentos 3, 4, 7 e 8 são iogurtes e os pontos centrais 9, 10 e 11 são iogurtes batidos, definidos diante dos seus extratos secos (reconstituição do leite).

Os experimentos que obtiveram as melhores respostas foram elaborados com a adição de 10% de sacarose e adição de sabor e aroma; foram realizadas a análise sensorial e a análise microbiológica, conforme descrito no item 3.8.3.

### 3.7.2.1 - Caracterização físico-química das bebidas fermentadas

As bebidas fermentadas foram analisadas da seguinte forma:

#### 3.7.2.1.1 – Determinação do pH

Determinado por leitura direta, em pH-metro digital (BRASIL, 2008).

#### **3.7.2.1.2 – Determinação de acidez em ácido láctico**

A acidez foi determinada utilizando-se o método Dornic, que se baseia na titulação das bebidas com a solução Dornic (N/9), empregando-se a fenolftaleína como indicador do ponto final da titulação. O resultado é expresso em Dornic (°D) que corresponde a 1 mL de solução de NaOH 0,1N consumido na titulação, equivalendo a 0,0090g de ácido láctico (BRASIL, 2008).

#### **3.7.2.1.3– Açúcares redutores totais**

O método para obtenção de açúcar redutor total se baseia na redução do DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, ao mesmo tempo com a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico. Com o aquecimento, a solução se torna alaranjada, quando então é lida através do equipamento espectrofotômetro a 540nm (MILLER, 1959).

#### **3.7.2.1.4 – Concentração celular**

Na determinação da concentração celular foi adotado o método de massa seca (TRÍBOLI, 1989), determinada pela diferença entre o peso final e o peso inicial e expresso em g/L. As determinações foram realizadas em triplicata.

#### **3.7.2.1.5 - Viscosidade**

A viscosidade foi determinada com um viscosímetro de Brookfield, modelo Visco Basic Plus (Fungilab), utilizando-se haste número 4 e velocidade de 6 rpm. As amostras foram mantidas a 6 °C e homogeneizadas antes das análises; os resultados foram lidos em centipoise.

### 3.7.2.2 – Cálculo da produtividade e parâmetros cinéticos fermentação láctica

A produtividade (g/L.h) para produção dos elaborados lácteos foi calculado através da Equação 3.1.

$$Produtividade = \frac{P}{t} \quad (3.1)$$

em que:

P - concentração de produto (g/L)

t - tempo de fermentação (h)

Calculou-se, através da Equação 3.2, o parâmetro cinético  $Y_{P/S}$  (rendimento de produto) e, por meio da Equação 3.3, o  $Y_{X/S}$  (rendimento de biomassa):

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad (3.4)$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad (3.5)$$

sendo:

$S_f$  - concentração final de substrato (g/L)

$S_i$  - concentração inicial de substrato (g/L)

$P_f$  - concentração final de produto (g/L)

$P_i$  - concentração inicial de produto (g/L)

$X_f$  - concentração final de biomassa (g/g)

$X_i$  - concentração inicial de biomassa (g/g)

$Y_{p/s}$  (rendimento do produto) - quantidade de produto formado em relação à quantidade de substrato limitante consumido;

$Y_{p/s}$  (rendimento de biomassa) - quantidade de biomassa formada em relação à quantidade de substrato limitante consumido.

### 3.7.2.3 – Análise microbiológica dos elaborados lácteos

O procedimento para contagem de coliformes a 35 °C, coliformes a 45 °C pela técnica dos tubos múltiplos, foi realizado segundo SILVA *et al.* (2010), como descrito a seguir:

Os formulados lácteos foram preparados com agitação, homogeneizando-se os recipientes 25 vezes, em ângulo de 45°.

- a) **Coliformes a 35 °C:** Foram preparadas 3 séries de 3 tubos contendo Caldo Verde Brilhante Bile, todos os tubos com tubo de Durham. Na primeira série foi inoculado 1 mL dos formulados lácteos em cada tubo; na segunda série foram inoculados  $10^{-1}$  mL dos formulados lácteos em cada tubo e, na terceira série, inoculados  $10^{-2}$  dos formulados lácteos em cada tubo. Os tubos foram incubados  $35 \pm 0,5$  °C por  $24 \pm 2$  horas. A positividade dos tubos foi observada pela presença de bolhas nos tubos de Durham e/ou turbidez no meio. Para os tubos positivos a análise vai para o passo seguinte. O Número Mais Provável (NMP) foi determinado pela tabela de NMP apropriada às diluições inoculadas (SILVA *et al.*, 2010), sendo encaminhados os tubos positivos para a etapa seguinte.
  
- b) **Confirmação de coliformes a 45 °C:** A partir de cada tubo positivo de Caldo Verde Brilhante Bile, foi transferida uma alçada bem carregada para tubos contendo Caldo EC e incubados os tubos em banho-maria, a  $44,5 \pm 0,2$  °C por  $24 \pm 2$  horas, observando-se haverá crescimento com produção de gás, confirmativo para coliformes a 45 °C; o número de tubos positivos foi anotado e o Número Mais Provável (NMP) foi determinado pela tabela de NMP apropriada às diluições inoculadas.

### 3.8 - Análise sensorial dos elaborados lácteos

A análise sensorial foi realizada de acordo com a metodologia descrita por MEILGAARD *et al.*, 1991; STONE & SIDEL, 1985. Os provadores foram selecionados segundo sua aceitação por iogurtes e bebidas lácteas; aqueles que não os consumiram,

eram automaticamente desconsiderados (ANEXO I). A análise sensorial foi realizada no Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual da Paraíba.

Os testes foram realizados com aprovação prévia do Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual da Paraíba, pelo Projeto CAAE nº: 0725.0.133.000-11 (ANEXO II); a análise sensorial foi dividida em duas etapas: na análise dos dois melhores experimentos para bebidas lácteas na análise dos dois melhores experimentos para iogurtes tradicionais, em dias distintos, para que não houvesse fadiga do palato.

### **3.8.1 – Treinamento da equipe de provadores**

De início, realizou-se uma pré-seleção de 26 candidatos, através de testes: triangular (ANEXO III), duo-trio (ANEXO IV), teste de ordenação (ANEXO V) e de escala de intensidade (ANEXO VI), de acordo com a metodologia descrita por MEILGAARD *et al*, 1991; STONE & SIDEL, 1985.

Para recrutar os provadores foram analisadas as médias das respostas dadas aos testes por cada provador e aqueles com os que estivessem muito distantes da média, era realizada nova repetição do teste; permanecendo na mesma resposta, o provador era eliminado do quadro de provadores treinados.

Ao final do treinamento apenas 18 provadores foram selecionados para participar das análises dos produtos lácteos.

### **3.8.2– Análise sensorial das bebidas lácteas e dos iogurtes**

Os teste foram realizados em uma só ficha de avaliação, a começar pelo teste de diferença do controle, em que os provadores avaliaram a diferença das amostras recebidas com a padrão, com uma escala hedônica verbal de 5 pontos, com escores variando de 5 (extremamente diferente) até 1 (nenhuma diferença); analisando os resultados através da ANOVA (análise de variância) com seu respectivo fator de correção, foi também calculada a dms (diferença mínima significativa), para analisar o quanto as amostras diferiram das do padrão.

Os atributos sensoriais de consistência, sabor e odor, também foram avaliados com a a mesma escala, conforme a Ficha do ANEXO VII e analisado segundo o teste de soma

de ordens de Friedman, de acordo com o número de amostras diferentes e o número de provadores nesses experimentos, foi observado o valor da diferença mínima significativa (dms) para se obter diferença significativa entre experimentos ao nível de 5 %. A intensidade do sabor ácido também foi avaliada, identificando a amostra mais ácida, a amostra menos ácida e que ficará intermediária, sendo analisada da mesma forma do teste de ordenação.

Para o teste de aceitação foi utilizada uma escala hedônica verbal de 5 pontos, com escores variando de 5 (gostei muitíssimo) até 1 (desgostei muitíssimo).

A percepção de sabores diferentes daqueles normalmente encontrados em bebidas lácteas e iogurtes, também foi avaliada, por último, avaliou-se a intenção de compra, cujos provadores assinalarão na escala de cinco pontos (5- Certamente compraria a 1- Certamente não compraria).

As amostras refrigeradas e devidamente codificadas, foram apresentadas aleatoriamente aos provadores em cabines individuais, servidas em copos de plástico e de um copo de água mineral, em temperatura ambiente (25 °C). O procedimento foi efetuado em sala com luz branca, equivalente à luz do dia.

### **3.8.3 - Composição físico-química dos elaborados lácteos mais aceitos**

As determinações foram realizadas seguindo o descrito no item 3.4, com exceção do fator correções das proteínas que, neste caso, foi de 6,38.

### **3.8.4 – Vida de prateleira**

Para a análise de vida de prateleira foram acompanhados os experimentos mais aceitos da análise sensorial (uma bebida láctea e um iogurte) que foram estocados em embalagens próprias e individuais, sob refrigeração, para se avaliar a vida de prateleira dos produtos nos tempos 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 dias, segundo as análises de pH, acidez, número total de células viáveis e açúcares (ART e AR) visando determinar prováveis alterações no produto, durante o armazenamento.



### **3.9 - Análise estatística**

Os resultados obtidos a partir do planejamento fatorial experimental foram analisados estatisticamente através da ANOVA (análise de variância) e do método de superfície de resposta, através do programa estatístico STATISTICA<sup>®</sup> versão 5.0 (2004).

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo se encontram os resultados obtidos e sua discussão. O trabalho foi dividido em 6 etapas em que a primeira envolveu a identificação das algas, a segunda o ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* Leach, visando avaliar se as algas em questão poderiam ou não ser utilizadas para fins alimentícios e na terceira etapa se quantificaram os componentes existentes nas algas, através da composição centesimal; na quarta etapa avaliou-se a melhor forma de extração do ágar, para aplicação das algas nas formulações lácteas; na quinta etapa, processos biotecnológicos para formulação dos elaborados, cinética fermentativa dos lácteos contendo *Gracilaria birdiae*, e a sexta etapa, análise sensorial do elaborado produzido.

### 4.1 – Identificação das algas

Sua identificação foi realizada de acordo com a morfologia das algas, com base no trabalhos de PLASTINO & OLIVEIRA (2002) e WYNNE (2005), caracterizada como sendo a *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira e a *Gracilaria caudata* J. Agardh.

ARAÚJO (2005) observou, tratando de estudos que permitiram um conhecimento melhor da estrutura e da dinâmica da população de *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira, que as mesmas são fonte de alimentação de vários animais da região e de alguns nutrientes essenciais na vida desses animais, podendo, obviamente, ser revertidos para a vida do homem com estudos específicos, fato interessante visto que o objetivo deste trabalho foi a extração do ágar para utilização em indústrias de alimento.

LUCENA *et al.* (2007) encontraram, realizando um levantamento das macroalgas presentes no litoral sul da Paraíba, no município de Pitimbu, acessível por mergulho autônomo, 6 espécies de algas Gracilarias, entre elas a *Gracilaria caudata* J. Agardh, o que tornou interessante esta observação, haja vista que a mesma também pode ser encontrada no litoral paraibano, facilitando sua coleta.

### 4.2 – Toxicidade frente à *Artemia salina* Leach

A Tabela 4.1 relata a concentração de crustáceos mortos com seus respectivos desvios padrão.

**Tabela 4.1** – Quantidade de *Artemia salina* Leach morta com seus respectivos desvios padrão para cada concentração de extrato de algas utilizada

Concentração do extrato (mg mL <sup>-1</sup> )	<i>Gracilária caudata</i>	<i>Gracilaria birdiae</i>
1000	3,33 ± 1,15	3,33 ± 0,58
500	1,33 ± 1,15	1,33 ± 1,15
250	0,67 ± 1,15	0,67 ± 0,58
125	0,67 ± 0,58	0,67 ± 0,58
62,5	0,67 ± 0,58	0,67 ± 0,58
0	0	0

Na Tabela 4.1 se evidenciam os crustáceos mortos, observado-se que para as duas algas (*Gracilaria caudata* J. Agardh e *Gracilária birdiae* Plastino & Oliveira) a mortalidade foi baixa.

A Tabela 4.2 mostra, para os extratos de algas, os valores de CL<sub>50</sub> observados após estatística de regressão analisado por PROBIT – mínimos quadrados.

**Tabela 4.2** – Valores de CL<sub>50</sub> calculados para a *Gracilaria caudata* J. Agardh e para a *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira com seus respectivos limites de confiança

Algas	CL <sub>50</sub> (mg mL <sup>-1</sup> )
<i>Gracilaria caudata</i> J. Agardh	1.315,56 (912,54 – 1.718,57)
<i>Gracilaria birdiae</i> Plastino & Oliveira	1.315,56 (912,54 – 1.718,57)

Observando a Tabela 4.2, é evidente sua baixa concentração letal média (CL<sub>50</sub>), tanto para a *Gracilaria caudata* J. Agardh como para a *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira sendo também baixos os limites mínimos (912,54 mg/mL), significando que seria necessária uma grande concentração do extrato das algas para torná-la tóxica ao ser humano. Já os valores encontrados por LHULLIER *et al.* (2006) quando avaliaram extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense através do teste de letalidade para *Artemia salina* para as *Rhodophyta* os resultados foram bem abaixo (<50 – 97,5 mg/mL) dos valores encontrados neste trabalho evidenciando a necessidade do estudo da toxicidade para segurança da população que, possivelmente, consumirá os produtos providos dessas espécies.

### 4.3 – Composição centesimal da alga

A constituição de matérias-primas depende do material de origem, da manipulação e do tratamento, entre outros fatores. Para as algas, em especial, vai depender do clima, da estação do ano e da maturação, entre outros. Para conhecer os componentes presentes nas algas e poder utilizá-los como ingrediente alimentício sua composição centesimal foi determinada.

As médias dos resultados da composição centesimal das algas *in natura* estão apresentadas na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3** – Média dos resultados da composição centesimal efetuada nas algas *in natura* e seus respectivos desvios padrão

Componente centesimal (%)	<i>Gracilaria caudata</i>	<i>Gracilaria birdiae</i>
Umidade	85,1 ± 0,10	84,1 ± 0,06
Cinzas	4,39 ± 0,03	5,14 ± 0,04
Lipídios	0,36 ± 0,05	0,28 ± 0,12
Proteínas (N x 6,25)*	1,42 ± 0,28	1,62 ± 0,01
Carboidratos	8,73	8,86

\*Fator utilizado na determinação de proteínas, referente a alimentos, no geral

\*\*Resultados com base em matéria úmida (%)

Analisando a Tabela 4.3 observa-se que as duas algas apresentam composições semelhantes, a *Gracilaria caudata* apresenta maior umidade e maior quantidade de lipídios; já a *Gracilaria birdiae* apresenta maior teor de cinzas, proteínas e carboidratos.

Ao analisar a Tabela 4.3, evidencia-se que de 85,1%, *Gracilaria caudata*, a 84,1%, *Gracilaria birdiae*, são de teor de água nas algas em estudo; valores próximos foram obtidos por SIMÕES (2009) (88,37% período seco e 89,06% período chuvoso) quando estudou o crescimento e a qualidade da macroalga *Gracilaria birdiae* cultivada na praia de Pau Amarelo, em Pernambuco.

Para a quantificação de cinzas observam-se semelhanças nos valores (4,39% e 5,14%) com os resultados vistos por SIMÕES (2009) que foi de 4,86% para período seco e 4,47% para período chuvoso e inferiores aos encontrados por MARINHO-SORIANO *et al.* (2006) que avaliaram a variação sazonal na composição química de duas algas tropicais, e

relataram, para a *Gracilaria cervicornis*, 5,65% e, para *Sargassum vulgare*, 7,73%, ressaltando que, de modo geral, as algas são constituintes ricos em sais minerais.

Os lipídios apresentaram valores de 0,36 a 0,28%, menores que os valores vistos por SIMÕES (2009) que foram de 0,62 e 0,46%, nos períodos seco e chuvoso, respectivamente. Os valores encontrados para *Gracilaria cervicornis* (0,43%) e para *Sargassum vulgare* (0,45%) observados por MARINHO-SORIANO *et al.* (2006) seguem a mesma linha dos valores anteriores.

PATARRA *et al.* (2010), que utilizaram o mesmo fator de correção para proteínas neste trabalho, visando avaliar nutricionalmente macroalgas selecionadas, observaram que a *Gelidium microdon* apresentou 4,34%, *Sphaerococcus coronopifolius* apresentou 2,76% e a *Osmundea pinnatifida* 2,01% de proteínas, valores próximos aos observados neste trabalho (1,42% para *Gracilaria caudata* e 1,62% para a *Gracilaria bridiae*), observando que todas as algas citadas são Rhodophyta, gênero *Gracilárias*. A diferença encontrada em literatura foi de aproximadamente 1% para o trabalho de SIMÕES (2009), que encontrou valores entre 1,71% e 2,35%, para os períodos seco e chuvoso.

O percentual de carboidratos encontrado neste trabalho (8,73 – 8,86%), pode ser atribuído à presença de ágar e outros carboidratos. MARINHO-SORIANO *et al.* (2006) encontraram valores elevados de carboidratos para a *Gracilaria cervicornis*, 63,12%, e para *Sargassum vulgare*, 67,80%.

#### 4.4 – Análise microbiológica da água do mar

A qualidade da água onde são colhidas algas para utilização em indústrias alimentícias, é de fundamental importância considerando-se que a matéria-prima é o ponto fundamental para que o processo ocorra de forma adequada.

Visando ao conhecimento da qualidade microbiológica, analisaram-se amostras de água do mar da Praia do Amor, em Pipa, RN, onde foram coletadas as algas para esta pesquisa.

A Tabela 4.4 demonstra os valores de coliformes a 35 °C, coliformes a 45 °C e *Streptococcus fecalis* e enterococos, nas duas estações do ano mais distintas, inverno e verão.

Tabela 4.4 – Valores de coliformes a 35 °C, coliformes a 45 °C e *Streptococcus fecalis* e enterococos

Estações	Coliformes a 35 °C (NMP/100mL)	Coliformes a 45 °C (NMP/100mL)	<i>Streptococcus fecalis</i> e enterococos (NMP/100mL)
Inverno	30	2	<1,1
Inverno	≥1.600	4	1,1
Inverno	≥1.600	12	<1,1
Inverno	2	2	<1,1
Verão	23	23	<1,1
Verão	6	1,8	<1,1
Verão	2	2	<1,1
Verão	6	2	1,1
<b>Padrões*</b>			
Excelente	-	250	25
Muito boa	-	500	50
Satisfatória	-	1.000	100

\*Resolução CONAMA nº 274, de 29 de novembro de 2000

De acordo com a RESOLUÇÃO CONAMA (2000) as amostras analisadas indicam uma água de excelente qualidade para a balneabilidade visto que, para a água ser considerada excelente deve conter, no máximo, 250 NMP/100mL de coliformes a 45 °C e 25 NMP/100mL de Enterococos; os valores encontrados estão bem abaixo do valor permitindo.

Segundo RAMOS (2007), estudando águas do mar da baía sul da ilha de Santa Catarina, o máximo das médias encontradas para coliformes a 35 °C foi de 12,49 NMP/100mL, observando-se os valores relatados nas águas analisadas da Praia do Amor, em Pipa, RN (2 - ≥1.600 NMP/100mL) devido, possivelmente às fortes chuvas, carregando pelo mar o excesso dessas águas. Observando ainda os valores relatados por RAMOS (2007), para coliformes a 45°C, que é o especificado pela legislação, a maior média encontrada foi de 9,42 NMP/100mL, sendo confrontado com os valores observados que, neste estudo (2 – 23 NMP/100mL), evidenciam excelência da água nesta área.



Em estudos realizados por PEREIRA (2008), foi observada, para coliformes a 35°C, uma média de no máximo 48,1 NMP/100mL, constituindo um valor acima do encontrado por RAMOS (2007), mas abaixo do máximo relatado neste estudo ( $\geq 1.600$  NMP/100mL). Quanto às médias dos valores de coliformes a 45°C, (25,1 NMP/100mL), foram relativamente mais altas do que a maior média deste trabalho (23 NMP/100mL).

#### 4.5 – Extração do ágar

##### 4.5.1 – Extração de ágar da *Gracilaria birdiae*

Para a extração de ágar, Figura 4.1, foram avaliadas as variáveis de entrada hipoclorito, condição da alga e quantidade de água, como mostram os dados da Tabela 4.5, seguindo o planejamento fatorial  $2^3$  e se estabelecendo, como variável resposta o rendimento de ágar; primeiro, o experimento foi realizado em pequena escala estabelecendo-se como base, 10 gramas da alga hidratada; todo o planejamento foi repetido três vezes e cada experimento repetido em triplicada, totalizando 9 repetições para cada experimento.



Figura 4.1 – Extração do ágar (segundo o planejamento experimental)

**Tabela 4.5** – Condição dos ensaios do planejamento experimental tendo, como variável resposta, o rendimento de extração de ágar para a *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira

Exp.	Hipoclorito (H)	Condição a alga (A)	Quantidade de água (Q)	R* (%)	R* (%)	R* (%)
1	- (0,5 %)	- (Inteira)	- (150 mL)	2,8741	3,8273	2,9528
2	+ (1 %)	- (Inteira)	- (150 mL)	1,4691	1,1823	2,2493
3	- (0,5 %)	+ (Triturada)	- (150 mL)	1,3848	1,9782	1,9268
4	+ (1 %)	+ (Triturada)	- (150 mL)	2,0231	1,8265	1,4955
5	- (0,5 %)	- (Inteira)	+ (300 mL)	1,6667	2,6224	4,6794
6	+ (1 %)	- (Inteira)	+ (300 mL)	4,8450	5,3640	1,7182
7	- (0,5 %)	+ (Triturada)	+ (300 mL)	3,0354	5,0485	2,7273
8	+ (1 %)	+ (Triturada)	+ (300 mL)	5,9642	7,6333	9,3023

\*Rendimento de ágar em porcentagem

Observando a Tabela 4.5, é evidente a diferença entre alguns resultados no mesmo experimento podendo ser justificada pela heterogeneidade da alga em estudo, como evidencia a Figura 4.2.



**Figura 4.2** – *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira após reidratação



**Tabela 4.6** – ANOVA (Análise de variância) para a *Gracilária birdiae* Plastino & Oliveira

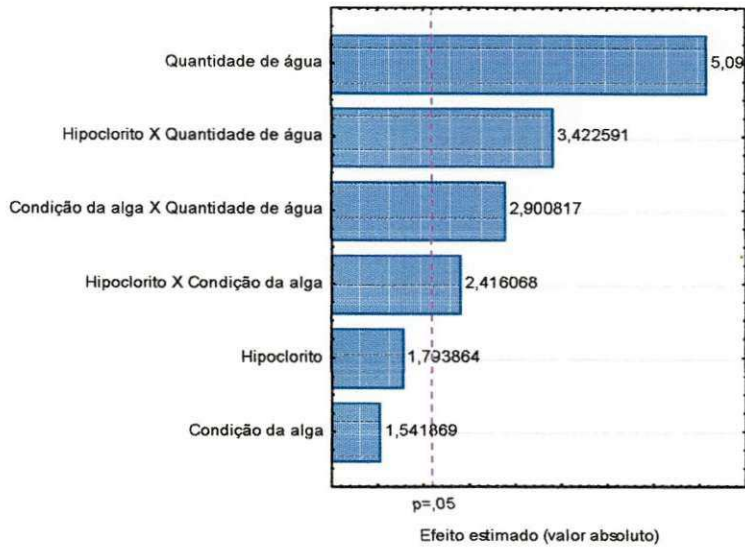
	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	Teste F
Regressão	79,8261	6	13,3044	9,6
Resíduo	23,5757	17	1,3868	
Falta de ajuste	0,778	1		
Erro puro	22,7977	16		
Total	103,4018	23		
R <sup>2</sup> (%)	77,2%	-		
F tabelado <sub>0,95.6.17</sub>				2,7

Os resultados foram analisados utilizando-se o programa Statistica 5,0; o F calculado foi 9,6 e o F tabelado<sub>0,95.6.17</sub> (RODRIGUES & IEMMA, 2005) foi 2,7, observando-se que o modelo é estatisticamente significativo para 95% de confiança pois a razão entre F calculado e o F tabelado foi 3,55; segundo BARROS NETO *et al.* (1996) para que o modelo tenha validade estatística de acordo com o Teste F, o valor da razão F calculado em relação a F tabelado, deve ser acima de 1,0. O modelo codificado está apresentado na Equação 4.1, com os coeficientes estatisticamente significativos em negrito. O modelo apresenta os coeficientes com seus erros padrão.

$$\text{Rendimento (\%)} = \mathbf{3,3248 \pm 0,2436} + 0,4312 \pm 0,2436 H + 0,3706 \pm 0,2436 A + \mathbf{1,2257 \pm 0,2436 Q} + \mathbf{0,5808 \pm 0,2436 HA} + \mathbf{0,8227 \pm 0,2436 HQ} + \mathbf{0,6973 \pm 0,2436 AQ} \quad (4.1)$$

sendo: H – hipoclorito, A – condição da alga e Q – quantidade de água

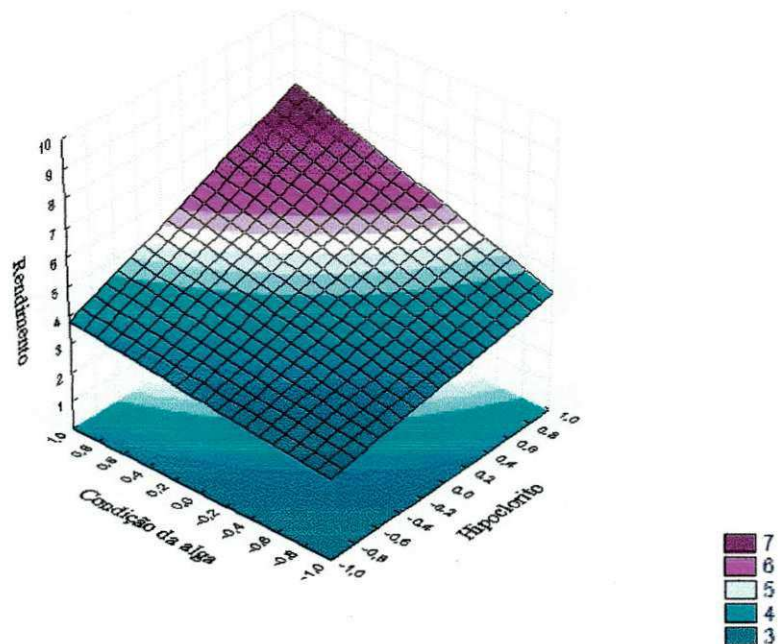
Na Figura 4.3 encontra-se o gráfico de Pareto com nível de 95% de confiança para a estimativa dos efeitos.



**Figura 4.3** – Gráfico de Pareto para o rendimento de ágar para a *Gracilária birdiae*  
Plastino & Oliveira

Com base na Figura 4.3, os efeitos de hipoclorito e condição da alga não foram estatisticamente significativos.

A Figura 4.4 apresenta a superfície de resposta gerada pelo programa Statistica 5,0 com base na variável dependente rendimento de ágar, fixando o valor da quantidade de água no nível máximo.



**Figura 4.4** – Superfície de resposta para o rendimento de ágar da *Gracilária birdiae*,  
fixando-se a quantidade de água no nível +1

Analisando a superfície de resposta (Figura 4.4) observa-se que quanto maior for a porcentagem de hipoclorito e mais triturada a alga estiver, maior também será o rendimento de ágar para o processo em estudo, chegando a aproximadamente 9% (valor do melhor experimento) de extração.

O valor otimizado do processo (aproximadamente 9%) é superior aos estudados por YOSHIMURA (2006) que avaliou o potencial de cultivo e produção de ágar de *Gracilaria domingensis* e de *Gracilaria caudata* (Rhodophyta, Gracilariales) na Enseada de Armação do Itapocoroy (Penha, Santa Catarina) observando, para o ágar nativo, um rendimento de 8,80%. MASHISH NETO (2009) avaliou, estudando o cultivo da carragenófito *Hypnea musciformis* (WULFEN) J.V. Lamour (Gigartinales - Rhodophyta) em estruturas long-line, o rendimento de ágar e obteve valores médios de 43,84%, maiores que os vistos neste estudo.

#### 4.5.2 – Extração de ágar da *Gracilaria caudata*

Para avaliar as variáveis de entrada, condição da alga e quantidade de água, como mostram os dados da Tabela 4.7, seguiu-se o planejamento fatorial  $2^2$  e se estabelecendo, como variável resposta, o rendimento de ágar para a *Gracilaria caudata*.

**Tabela 4.7** – Condição dos ensaios do planejamento experimental tendo como variável resposta o rendimento de extração de ágar, para a *Gracilaria caudata*

Exp.	Condição da Alga (A)	Quantidade de água (Q)	R* (%)	R* (%)	R* (%)
1	- (Inteira)	- (150 mL)	3,66	3,99	3,01
2	+ (Triturada)	- (150 mL)	4,55	5,22	4,16
3	- (Inteira)	+ (300 mL)	4,41	6,43	6,44
4	+ (Triturada)	+ (300 mL)	6,14	5,84	5,45

\*Rendimento de ágar em porcentagem

A *Gracilaria caudata* apresentou homogeneidade maior que a *Gracilaria birdiae*, conforme a Figura 4.5; no entanto, ainda ocorreu diferença entre seus resultados para cada experimento evidenciando, com isto, que por se tratar de material biológico heterogêneo,



não é possível um controle preciso em sua extração mas representaria a extração realizada artesanalmente, por pequenas comunidades.



**Figura 4.5** – *Gracilaria caudata* reidratada

A Tabela 4.8 evidencia a análise de variância realizada a partir do planejamento fatorial para a extração de ágar da *Gracilaria caudata*.

**Tabela 4.8** – ANOVA (Análise de variância) para a *Gracilaria caudata*

	<b>Soma Quadrática</b>	<b>Grau de liberdade</b>	<b>Média quadrática</b>	<b>Teste F</b>
Regressão	10,32044	3	3,44015	6,6
Resíduo	4,04533	8	0,50567	
Falta de ajuste	0	0		
Erro puro	4,04533	8		
Total	14,36577	11		
R <sup>2</sup> (%)	71,84%	-		
F tabelado <sub>0,95.3.8</sub>				4,1

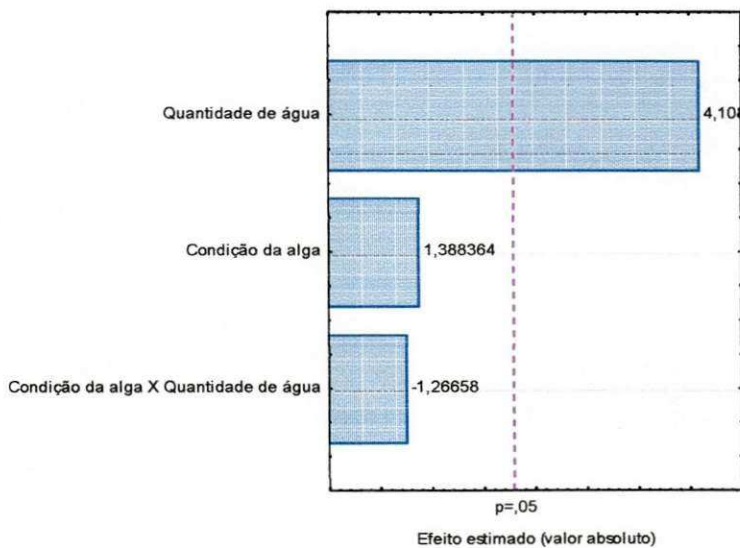
Visto que esses resultados também são analisados utilizando-se o programa Statistica 5,0, para o F calculado o valor foi de 6,6 e o F tabelado<sub>0,95.6.17</sub> (RODRIGUES & IEMMA, 2005) foi 4,07 observando-se que o modelo é estatisticamente significativo para 95% de confiança pois a razão entre F calculado e F tabelado foi 1,62. O modelo

codificado está apresentado na Equação 4.2, com os coeficientes estatisticamente significativos em negrito; observa-se que o modelo apresenta os coeficientes com seus erros padrão.

$$\text{Rendimento (\%)} = \mathbf{4,941667} \pm \mathbf{0,205278} + 0,285000 \pm 0,205278 A + \mathbf{0,843333} \pm \mathbf{0,205278} Q - 0,260000 \pm 0,205278 AQ \quad (4.2)$$

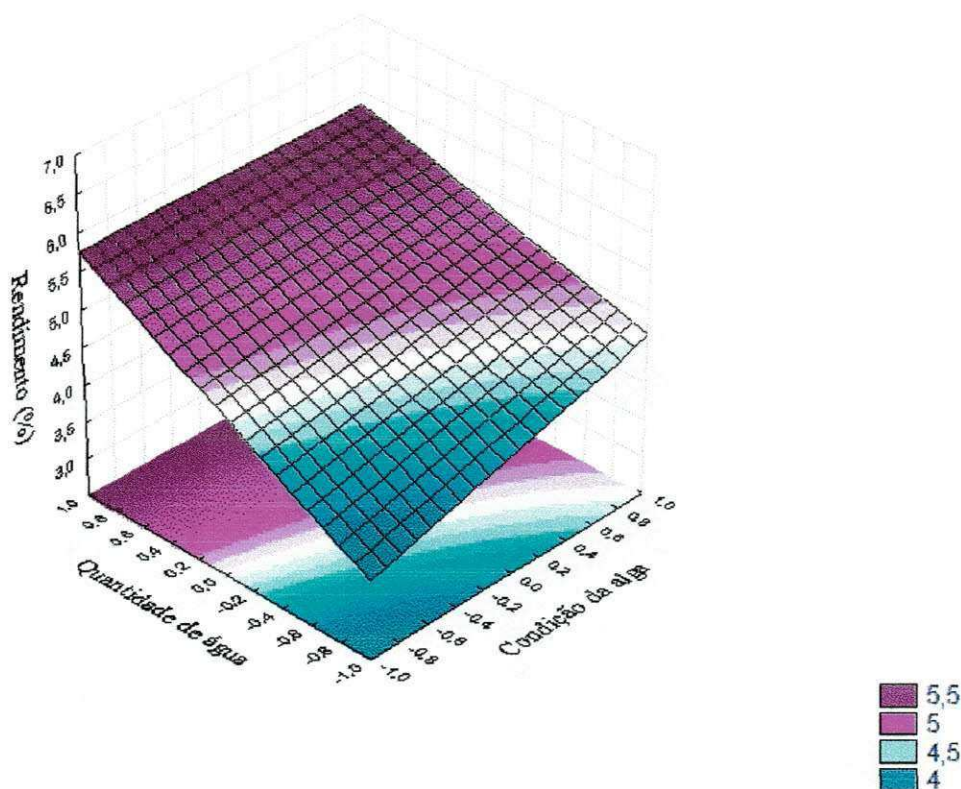
sendo: A – condição da alga e Q – Quantidade de água

A Figura 4.6 apresenta o gráfico de Pareto com nível de 95% de confiança para a estimativa dos efeitos.



**Figura 4.6** – Gráfico de Pareto para rendimento de ágar da *Gracilaria caudata*

Analisando a Figura 4.6, evidencia-se que o efeito da quantidade de água foi o único que se mostrou estatisticamente significativo; já a Figura 4.7 apresenta a superfície de resposta gerada pelo programa Statistica com base na variável dependente rendimento de ágar para a *Gracilaria caudata*.



**Figura 4.7** – Superfície de resposta para o rendimento de ágar da *Gracilaria caudata*

Segundo a Figura 4.7 tem-se que, fixando-se a quantidade de água acima do nível 0 para qualquer valor da amostra triturada, ter-se-á maior rendimento de ágar para a *Gracilaria caudata* no processo em estudo, chegando a 6% de extração.

O valor observado no processo (aproximadamente 6,5%) é inferior aos estudados por YOSHIMURA (2006) que avaliou o potencial de cultivo e a produção de ágar de *Gracilaria domingensis* e de *Gracilaria caudata* (Rhodophyta, Gracilariales) na Enseada de Armação do Itapocoroy (Penha, Santa Catarina) observando, para o ágar nativo da mesma alga em estudo, um rendimento de 8,8%.

#### 4.6 – Estudo do elaborado lácteo

##### 4.6.1 – Preparação do inóculo

O inóculo foi preparado para todos os elaborados lácteos, incubados no tempo de 8 horas às análises foram realizadas visando ao controle da fermentação láctea. Na Tabela 4.9 estão expostas as respostas do controle da fermentação láctea no tempo 0 hora (início



da fermentação) e no tempo de 8 horas (fim da fermentação), iniciando-se com o leite desnatado em pó reconstituído a 13%, que apresentou acidez média de  $20 \pm 0$  °D e pH de 6,48.

**Tabela 4.9** – Resultados do preparo do inóculo e seus respectivos desvios padrão

Análises	Tempo 0 horas	Tempo 8 horas
Acidez (°D)	$30 \pm 0$	$112 \pm 0$
pH	6,06	3,75
Biomassa (g)	$0,0237 \pm 0,0025$	$0,1202 \pm 0,0107$
ART* (%)	14,069	7,351
AR** (%)	13,714	7,250
ANR*** (%)	0,355	0,101

\*ART – Açúcar redutor total; \*\*AR – Açúcar redutor; \*\*\*ANR – Açúcar não-redutor

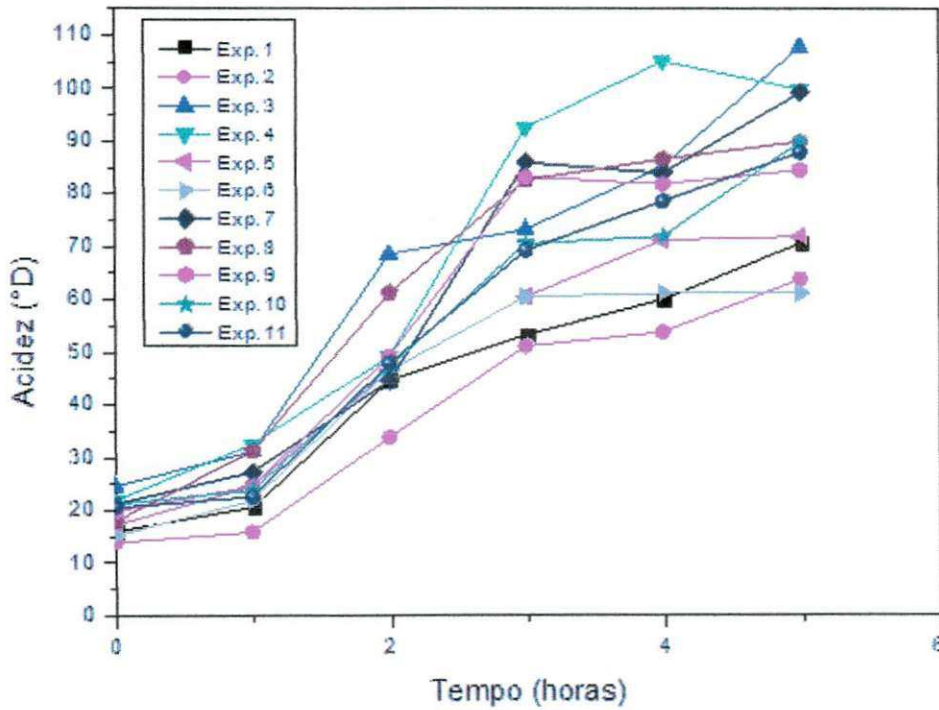
Analisando a Tabela 4.9 observa-se o aumento da acidez, que começou com 30 °D e terminou com 112 °D, evidenciando o desenvolvimento dos micro-organismos; o pH começou com 6,06 e terminou com 3,75; do tempo 0 hora (início da fermentação) ao tempo 8 horas, houve um crescimento de 0,0865 g de Biomassa. O ART praticamente decaiu 50% saindo de 14,069% para 7,351% (metabolização da fonte de carbono pelo micro-organismo).

BORGES *et al.* (2009) observaram, caracterizando, físico-quimicamente e analisando a aceitação sensorial de indivíduos de 11 a 16 anos, que a bebida látea produzida a partir do leite bovino, obteve ART de 9,43% e um AR de 7,27%, visto que trabalharam com leite Tipo A comercializado no mercado e o presente trabalho foi realizado com leite em pó desnatado reconstituído a 13%, o que se justifica o teor de ART (14,07%) encontrado no nosso elaborado.

#### 4.6.2 – Elaborado lácteo: estudo cinético

Cada experimento foi acompanhado durante 6 horas; todos os experimentos foram realizados em triplicata, buscando-se observar a reprodutibilidade dos dados experimentais; o ágar utilizado nesta etapa foi o da *Gracilaria birdiae* Platino & Oliveira, haja vista ser o que obteve maior rendimento.

A Figura 4.8 apresenta o aumento da acidez ( $^{\circ}\text{D}$ ) durante o processo fermentativo; já a Figura 4.9 ressalta as variáveis do pH durante as 5 horas de fermentação e a Figura 4.10 mostra o crescimento celular; as Figuras 4.11 e 4.12 demonstram decréscimo do substrato (ART e AR, respectivamente) consumido durante o processo fermentativo.



**Figura 4.8** – Perfis da acidez ( $^{\circ}\text{D}$ ) durante o processo fermentativo

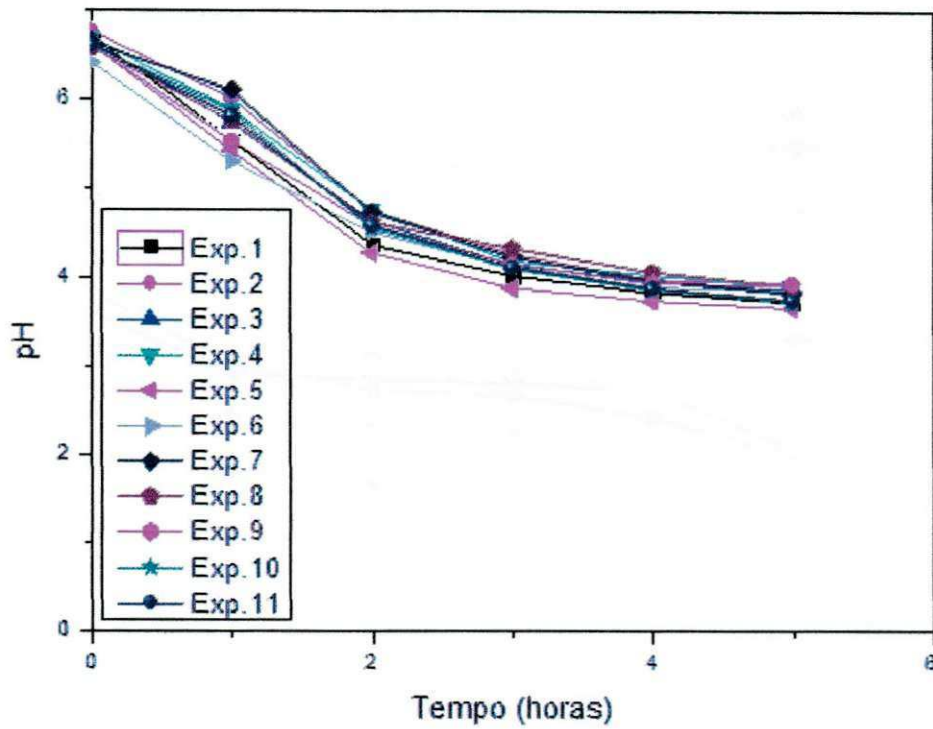


Figura 4.9 – Perfis do comportamento do pH durante as 5 horas de fermentação

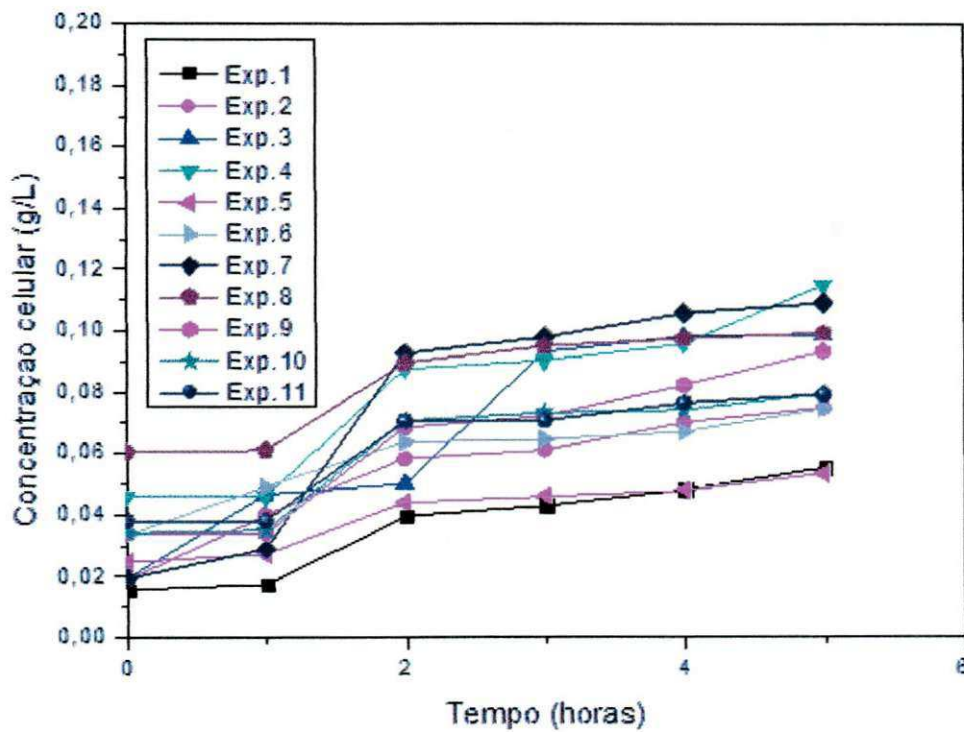


Figura 4.10 – Perfis do crescimento celular



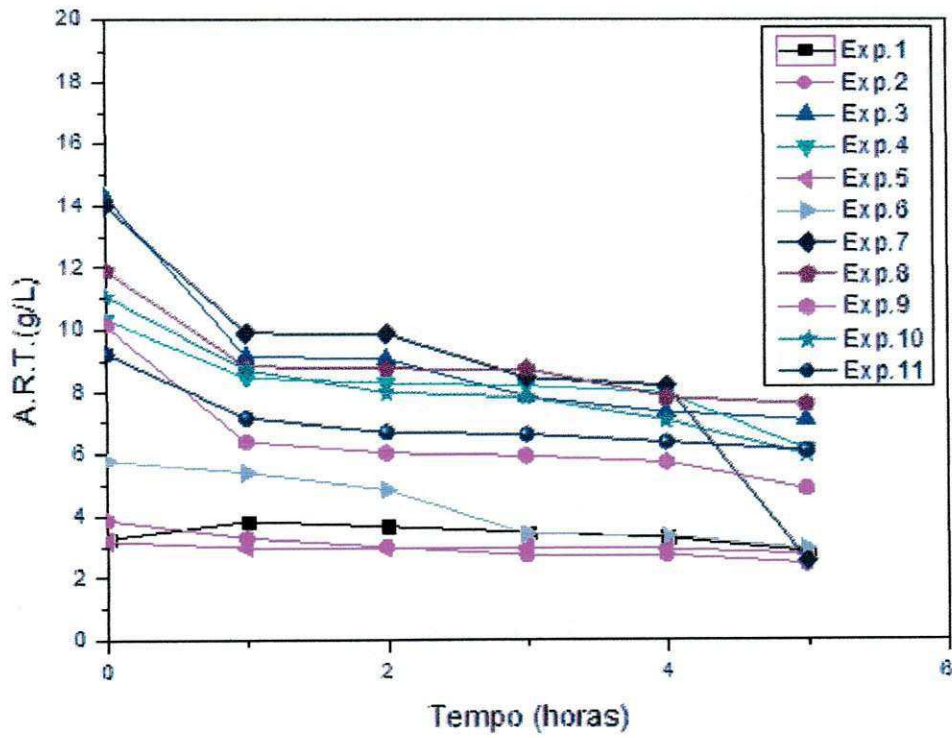


Figura 4.11 – Perfis do comportamento de ART

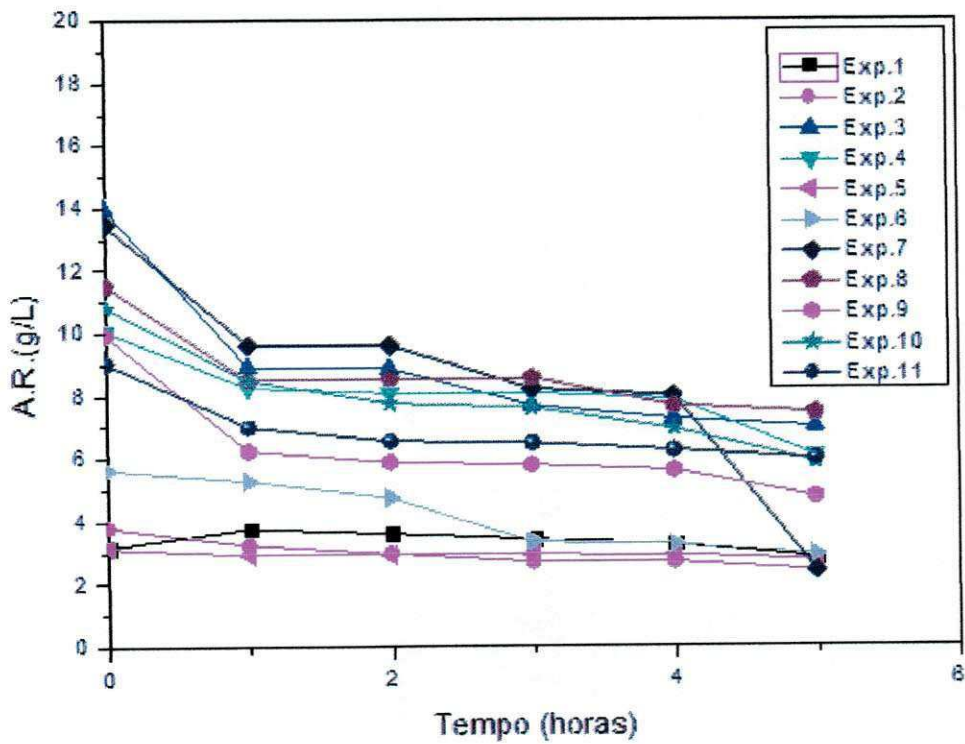


Figura 4.12 – Perfis do comportamento de AR

Analisando as Figuras 4.8, 4.9, 4.10, 4.11 e 4.12, observam-se os perfis do crescimento microbiano e as condições transformativas da cultura láctea em meio contendo *G. birdae*, o controle do processo fermentativo com consumo do substrato (ART e AR) pelos micro-organismos inoculados, aumento da acidez, abaixamento do pH e aumento populacional celular.

O experimento 3 foi o que atingiu a maior acidez ( $108 \pm 2$  °D), quando se adicionou 1,5% de inóculo, 0,25% de ágar e também 13% de leite em pó desnatado reconstituído, ficando logo atrás o experimento, 4 com  $100 \pm 0$  °D; caracterizando, com isto, excelentes iogurtes; já o experimento que obteve menor acidez foi o 6, com  $61,3 \pm 1,15$  °D. BORGES *et al.* (2009) obtiveram uma acidez média de 94,7 °D para iogurtes bovino e 98,4 °D para iogurtes bubalino, valores próximos aos encontrados neste trabalho e, como indicam os Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados (BRASIL, 2000), de 60 °D a 150 °D e, para bebidas lácteas, os padrões são de 60 °D a 200 °D, estando todas as formulações lácteas produzidas dentro das especificações.

De acordo com o pH dos experimentos, o experimento que apresentou menor pH foi o experimento 5 (3,66) e o que apresentou maior pH foi o experimento 2 (3,94), ao final do controle fermentativo. SANTOS *et al.* (2006), elaborando e caracterizando uma bebida láctea fermentada com polpa de umbu (*Spondias tuberosa* sp.) obtiveram um pH médio de 3,67, valor muito próximo ao encontrado neste trabalho; já BORGES *et al.* (2009) encontraram, para o iogurte produzido, um pH médio de 4,66, valor distante do encontrado neste trabalho mas próximo aos valores observado por MATHIAS (2011) desenvolvendo iogurte sabor café, cujo pH foi de 4,6.

Para os dados de concentração celular constatou-se que os experimentos em que se adicionava mais inóculo (3,0%) inicialmente (experimentos 3, 4, 7 e 8), foram justamente os que obtiveram maior crescimento celular e o inverso foi observado com os experimentos (1, 2, 5 e 6) aos quais se adicionava, inicialmente, menos inóculo (1,5%). O maior crescimento celular foi no experimento 4 ( $0,115 \text{ g L}^{-1}$ ) e o menor no experimento 5 ( $0,0536 \text{ g L}^{-1}$ ) devido, possivelmente, ao fato da concentração inicial de sólidos ser maior no experimento 4 que no 5.

Analisando o comportamento dos açúcares redutores e dos açúcares redutores totais, evidencia-se seu consumo durante todo o processo fermentativo. O experimento que obteve maiores quantidades residuais desses açúcares foi o 8 (7,605 e 7,458  $\text{g L}^{-1}$ , respectivamente) visto utilizou 13% de leite em pó reconstituído e, comparando com os

resultados obtidos por BORGES *et al.* (2009), observam-se valores aproximados para os açúcares redutores ( $7,27 \text{ g L}^{-1}$ ) e diferentes para os açúcares totais ( $9,43 \text{ g L}^{-1}$ ), ao se trabalhar com leite integral Tipo A. Esta diferença pode ser atribuída à maior atividade fermentativa da cultura utilizada no presente estudo.

Objetivando analisar estatisticamente os valores de acidez evidenciados neste trabalho, realizou-se uma análise de variância (ANOVA) utilizando-se os valores finais das fermentações lácteas, Tabela 4.10.

**Tabela 4.10** – Resultado das análises de acidez para os 11 experimentos em triplicata, médias e desvios padrão

Experimentos	Acidez (°D)	Acidez (°D)	Acidez (°D)	Média	Desvio padrão
1	72	70	70	70,7	1,20
2	62	64	66	64,0	2,00
3	110	106	108	108,0	2,00
4	100	100	100	100,0	0,00
5	74	72	70	72,0	2,00
6	60	62	62	61,3	1,16
7	98	100	100	99,3	1,16
8	90	92	88	90,0	2,00
9	84	84	86	84,7	1,16
10	90	90	90	90,0	0,00
11	90	88	86	88,0	2,00

De acordo com a Tabela 4.10, o experimento que apresentou maior acidez foi o 3 ( $108 \text{ °D}$ ) e o que apresentou menor acidez, foi o 6 ( $61,3 \text{ °D}$ ).

Analisando as bebidas lácteas (experimentos 1, 2, 5 e 6) observam-se os valores ( $70,7$ ,  $64,0$ ,  $72$  e  $61,3 \text{ °D}$  respectivamente), os quais estão dentro dos Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados, que são para bebidas lácteas de  $60$  a  $200 \text{ °D}$ . CUNHA *et al.* (2008) observaram, ao trabalhar com a avaliação físico-química, microbiológica e reológica de bebida láctea e leite fermentado adicionados de probióticos, uma acidez média de  $72,33 \text{ °D}$ , valor próximo aos obtidos neste trabalho.

Nos valores encontrados para os iogurtes (experimentos 3, 4, 7 e 8) observam-se as condições de adaptabilidade dos micro-organismos da cultura ao meio, o meio de cultivo como fonte ideal nutricional, crescimento microbiano exponencial característico das cepas lácticas, consequente produção de ácido láctico, resultante enzimático da lactose (lactases/  $\beta$ -galactosidases) com valores de acidez bem próximos entre si (108, 100, 99,3 e 90 °D respectivamente), como também estão próximos do valor encontrado por BORGES *et al.* (2009) (94,7 °D).

Na Tabela 4.11 está a ANOVA (análise de variância) para os resultados de acidez.

**Tabela 4.11** – ANOVA (Análise de variância) para a acidez

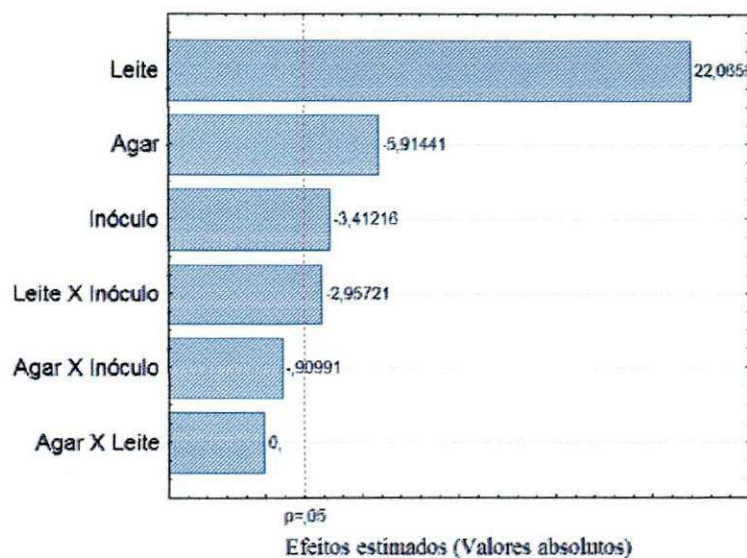
	<b>Soma</b> <b>Quadrática</b>	<b>Grau de</b> <b>liberdade</b>	<b>Média</b> <b>quadrática</b>	<b>Teste F</b>
Regressão	6996,66	6	1166,11	6,96
Resíduo	334,97	26	167,49	
Falta de ajuste	128,75	2		
Erro puro	206,22	24		
Total	7331,636	32		
R <sup>2</sup> (%)	94,38	-		
F tabelado <sub>0,95.6.26</sub>				2,47

Esses resultados analisados são utilizando-se o programa Statistica 5,0; para o F calculado o valor foi de 6,96 e o F tabelado<sub>0,95.6.26</sub> (RODRIGUES & IEMMA, 2005) foi 2,47 observando-se que o modelo é estatisticamente significativo para 95% de confiança pois a razão entre F calculado e F tabelado foi 2,82, acima de 1,0; o modelo codificado está apresentado na Equação 4.3, com os coeficientes estatisticamente significativos em negrito; observa-se que o modelo apresenta os coeficientes com seus erros padrão.

$$\text{Acidez (°D)} = \mathbf{84,36364} \pm \mathbf{0,624826} - \mathbf{4,33333} \pm \mathbf{0,732673} \text{ A} + \mathbf{16,16667} \pm \mathbf{0,732673} \text{ L} - \mathbf{2,5} \pm \mathbf{0,732673} \text{ I} + 0 \pm 0,732673 \text{ AL} - 0,66667 \pm 0,732673 \text{ AI} - \mathbf{2,16667} \pm \mathbf{0,732673} \text{ LI} \quad (4.3)$$

sendo: A – ágar, L – leite em pó reconstituído, I – inóculo.

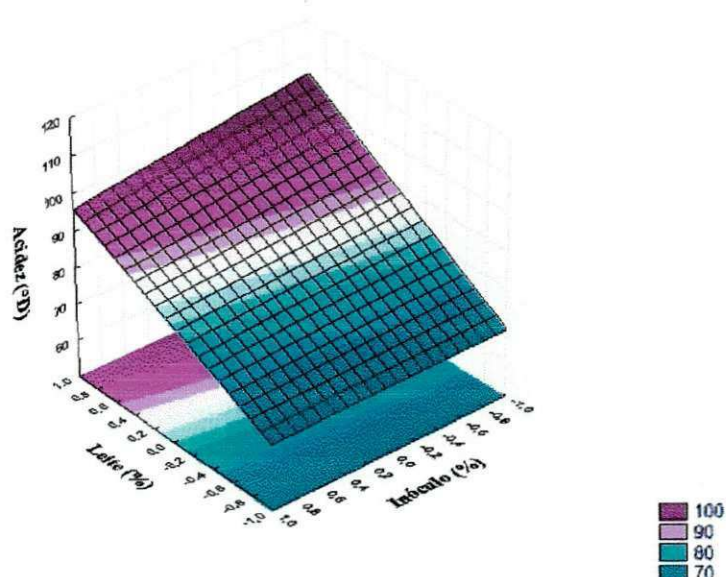
A Figura 4.13 apresenta o gráfico de Pareto com nível de 95% de confiança para a estimativa dos efeitos.



**Figura 4.13** – Gráfico de Pareto para a acidez

Analisando a Figura 4.13, fica patente que a quantidade de leite, a quantidade de ágar, a quantidade de inóculo e a interação entre leite e inóculo, se mostraram estatisticamente significativas.

A Figura 4.14 apresenta a superfície de resposta com base na variável dependente acidez, fixando o valor de ágar no nível +1.



**Figura 4.14** – Superfície de resposta para a acidez fixando o valor de ágar no nível +1



Segundo a Figura 4.14 tem-se, que fixando-se os valores no nível +1 de ágar e da quantidade de leite reconstituído, para qualquer valor da quantidade de inóculo maior será a acidez, chegando a um valor pouco acima de 100 °D.

Visando avaliar a diferenciação da viscosidade ao acrescentar o ágar, realizou-se o teste de viscosidade no tempo final dos 11 experimentos apresentados na Tabela 4.12.

**Tabela 4.12** – Resultado das análises de viscosidade para os 11 experimentos em duplicata, médias e desvios padrão

Experimentos	Viscosidade (cp)*	Viscosidade (cp)*	Média	Desvio padrão
1	1018,95	959,55	989,25	42,00
2	1844,10	1813,67	1828,88	21,52
3	3749,33	3689,18	3719,25	42,53
4	5111,28	5169,64	5140,46	41,27
5	1428,55	1375,05	1401,80	37,83
6	2270,55	2141,40	2205,98	91,32
7	4397,56	4391,82	4394,69	4,04
8	5769,00	5850,48	5809,74	57,62
9	4626,60	4717,45	4672,03	64,24
10	4984,90	4866,20	4925,55	83,93
11	4795,10	4700,50	4747,80	66,89

\*(cP) – centipoise

Com base na Tabela 4.12, foi possível verificar que, quanto maior a quantidade de reconstituição do leite e maior a adição do ágar, ocorreu aumento na viscosidade, tendo como maior viscosidade para os iogurtes o experimento 8, com a viscosidade média de 5809,74 cP, já para as bebidas lácteas o experimento que apresentou maior viscosidade foi o 6, com o valor médio de 2205,98 cP, observando-se que a viscosidade depende da quantidade de ágar adicionado.

A parte geleificante do ágar possui uma estrutura de dupla hélice que se agrega para formar uma estrutura tridimensional a qual retém as moléculas de água nos seus pequenos espaços vazios formando, desta forma, geis termorreversíveis. A propriedade de geleificação do ágar é devida aos três átomos de hidrogênio equatorial nos resíduos de 3,6-



anidro-L-galactose, que limitam a molécula para formar uma hélice. Para a estruturação de geis ocorre interação dessas hélices formadas (AGAR-AGAR, 2008).

CUNHA *et al.* (2008) observaram, trabalhando com a avaliação físico-química, microbiológica e reológica de bebida láctea e leite fermentado adicionados de probióticos para leite fermentados, uma viscosidade média de 1307,87 cP e, para bebida láctea de 556,29 cP, valores esses bastante distantes dos observados neste estudo; no entanto, ALMEIDA *et al.* (2001) encontraram, caracterizando física e quimicamente bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal, viscosidades (média de 3000 cP) semelhantes às apresentadas nesta pesquisa; os autores ainda ressaltaram em seu estudo, que a quantidade de sólidos influenciou no aumento da viscosidade em seus experimentos, fator que também foi reproduzido neste estudo, pela quantidade de leite para reconstituição e pela introdução de ágar, que influenciou positivamente no aumento da viscosidade.

Na Tabela 4.13 se acha a ANOVA (análise de variância) para os resultados de viscosidade.

**Tabela 4.13** – ANOVA (Análise de variância) para a viscosidade

	<b>Soma</b> <b>Quadrática</b>	<b>Grau de</b> <b>liberdade</b>	<b>Média</b> <b>quadrática</b>	<b>Teste F</b>
Regressão	46520800	6	7753466,7	10,37
Resíduo	11211115	15	747407,7	
Falta de ajuste	11108882	2		
Erro puro	102233	13		
Total	57731915	21		
R <sup>2</sup> (%)	72,81			
F tabelado <sub>0,95.6.15</sub>				2,79

De vez que esses resultados também foram analisados utilizando-se o programa Statistica 5,0, para o F calculado o valor foi de 10,37 e o F tabelado<sub>0,95.6.15</sub> (RODRIGUES & IEMMA, 2005) foi de 2,79 observando-se que o modelo é estatisticamente significativo para 95% de confiança pois a razão entre F calculado e o F tabelado, foi 3,72. O modelo codificado está apresentado na Equação 4.4, com os coeficientes estatisticamente

significativos em negrito; observa-se que o modelo apresenta os coeficientes com seus erros padrão.

$$\text{Viscosidade (cp)} = \mathbf{3621,402 \pm 184,3179} + \mathbf{560,008 \pm 216,1319 A} + \mathbf{1579,779 \pm 216,1319 L} + 266,795 \pm 216,1319 I + 149,056 \pm 216,1319 AL - 5,202 \pm 216,1319 AI + 69,385 \pm 216,1319 LI \quad (4.4)$$

sendo: A – ágar, L – leite em pó reconstituído, I – inóculo.

A Figura 4.15 apresenta o gráfico de Pareto com nível de 95% de confiança para a estimativa dos efeitos.

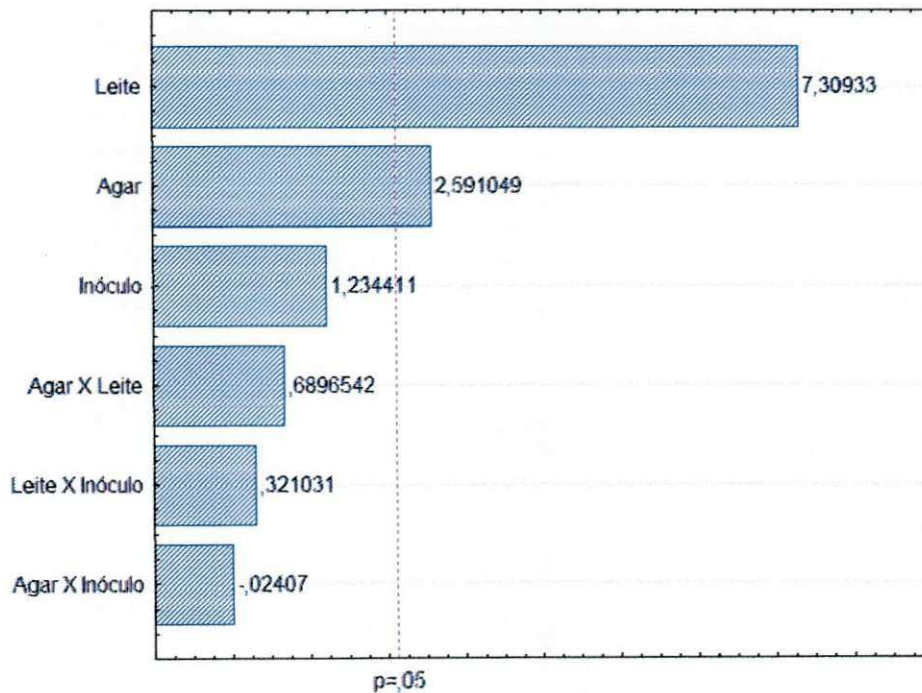
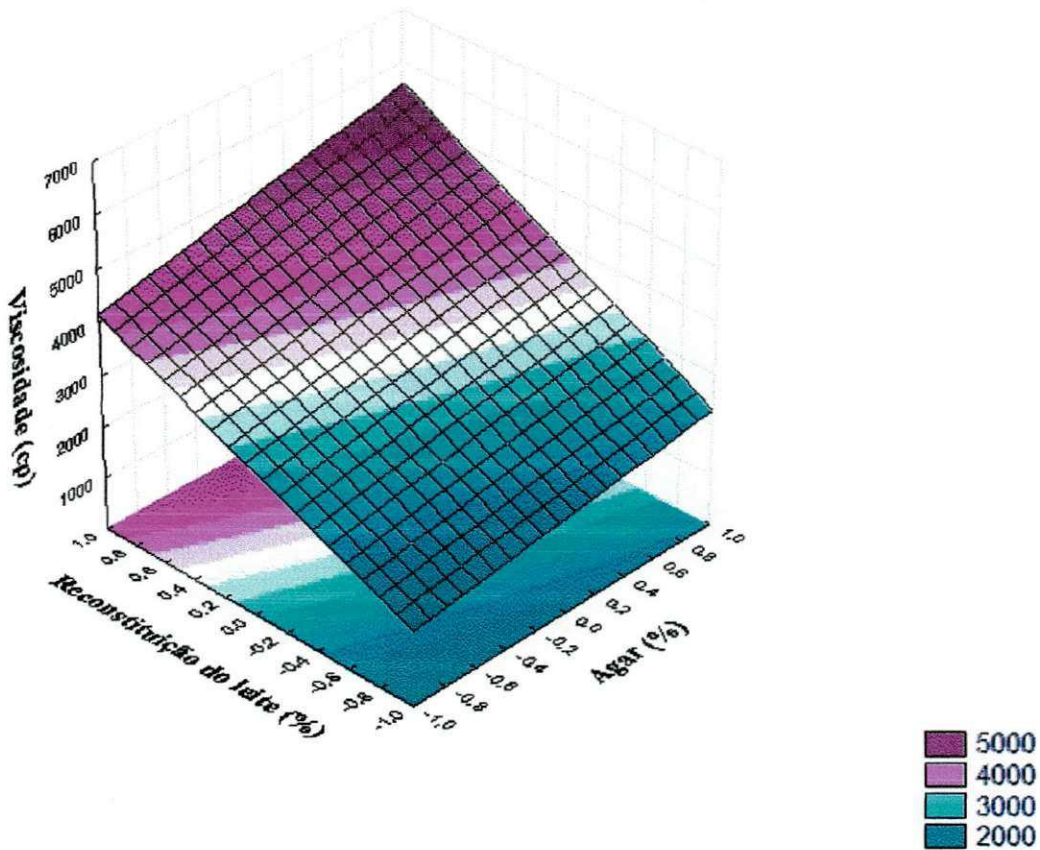


Figura 4.15 – Gráfico de Pareto para a viscosidade

Analisando a Figura 4.15, evidencia-se que a quantidade de leite e a quantidade de ágar se mostraram estatisticamente significativas.

A Figura 4.16 apresenta a superfície de resposta, com base na variável dependente viscosidade, fixando o valor de inóculo no nível -1.



**Figura 4.16** – Superfície de resposta para a viscosidade, fixando-se o valor de inóculo no nível -1

Segundo a Figura 4.16 tem-se que, fixando-se o valor de inóculo no nível -1 e quanto maior a quantidade de leite reconstituído e de ágar adicionado no elaborado lácteo, maior será a viscosidade, chegando a um valor acima de 5140,46 cP.

Analisou-se a cinética dos formulados lácteos em relação aos parâmetros cinéticos (produtividade, rendimentos de biomassa e produto), obtendo-se os seguintes valores, Tabela 4.14 e se considerando o tempo de 5 horas para todos os experimentos.

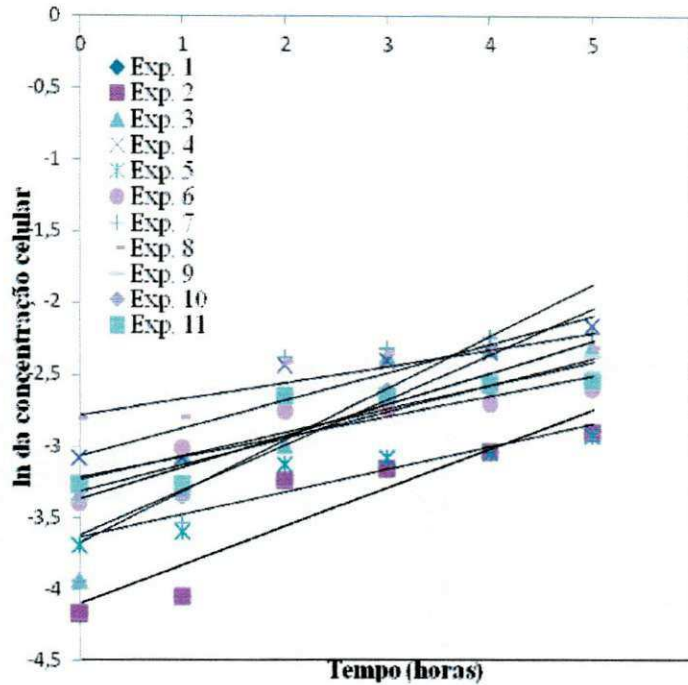
**Tabela 4.14** – Valores dos parâmetros cinéticos dos formulados lácteos

Experimentos	Produtividade (g/L h)	$Y_{P/S}$ (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)
1	0,110	1,25	0,04
2	0,100	0,35	0,04
3	0,166	0,11	0,01
4	0,156	0,18	0,02
5	0,110	1,38	0,07
6	0,092	0,16	0,01
7	0,144	0,06	0,01
8	0,144	0,17	0,01
9	0,130	0,12	0,01
10	0,138	0,14	0,01
11	0,134	0,21	0,01

Analisando a Tabela 4.14 observa-se que a maior produtividade no processo fermentativo foi no experimento 3 (com 0,25% de ágar, 13% de leite e 1,5% de inóculo); já para o rendimento de produto ( $Y_{P/S}$ ) e rendimento de biomassa ( $Y_{X/S}$ ), o melhor experimento foi o 5 (0,25% de ágar, 6,5% de leite e 3,0% de inóculo).

A Figura 4.17 apresenta o comportamento do logaritmo do crescimento celular através do tempo em cada experimento e a Tabela 4.15 contém todas as equações das retas para os 11 experimentos, juntamente com os valores de R (coeficiente de correlação) e as velocidades de crescimento celular máximas ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ).





**Figura 4.17** – Cálculo das máximas velocidades específicas de crescimento celular ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para os 11 experimentos

**Tabela 4.15** – As equações das retas, os valores de R e as máximas velocidades específicas de crescimento celular ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para os 11 experimentos

Experimentos	Equação da reta	R (%)	$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )
1	$y = 0,2697 \cdot x - 4,0959$	86,34	0,2697
2	$y = 0,2697 \cdot x - 4,0959$	86,34	0,2697
3	$y = 0,3136 \cdot x - 3,6169$	83,99	0,3136
4	$y = 0,1945 \cdot x - 3,0682$	84,99	0,1945
5	$y = 0,1580 \cdot x - 3,6359$	86,14	0,1580
6	$y = 0,1420 \cdot x - 3,2189$	81,19	0,1420
7	$y = 0,3584 \cdot x - 3,668$	77,76	0,3584
8	$y = 0,1127 \cdot x - 2,7813$	80,45	0,1127
9	$y = 0,2197 \cdot x - 3,3673$	86,62	0,2197
10	$y = 0,1857 \cdot x - 3,3144$	77,00	0,1857
11	$y = 0,1642 \cdot x - 3,2309$	78,45	0,1642
Média			0,2171
Desvio padrão			0,0769



De acordo com a Tabela 4.15, o experimento que apresentou maior velocidade específica de crescimento celular foi o 7, e o que apresentou a menor, foi o 8.

Como se utilizou o mesmo micro-organismo, a velocidade máxima de crescimento celular deve ser observada como média, ou seja, a média dos 11 experimentos de  $\mu_{\text{máx}}$  é igual a  $0,2171 \pm 0,0769 \text{ h}^{-1}$ .

A escolha dos melhores experimentos foi feita com base na quantificação de ágar, visto que, quanto menor a quantidade utilizada, que resulte no mesmo efeito final, melhor para a indústria, implicando em menor custo; com isto, foram escolhidos os experimentos 1 e 2 como bebidas lácteas, visto a quantificação de sólido neles introduzida (reconstituição de 6,5% de leite em pó desnatado) e os experimentos 3 e 4 como iogurtes, com quantidade maior de sólidos (reconstituição de 13% de leite em pó desnatado).

#### 4.6.3 – Análise microbiológica dos elaborados láteos

Os parâmetros microbiológicos de um alimento é de fundamental importância para garantir segurança aos indivíduos que os consomem. Visando assegurar os provedores de que os elaborados lácteos (bebidas lácteas – experimentos 1 e 2; iogurtes – experimentos 3 e 4) estão seguros para o consumo, foram realizadas análises de coliformes a 35 °C, coliformes a 45 °C e bolores e leveduras.

A Tabela 4.16 evidencia os valores de coliformes a 35 °C, coliformes a 45 °C e bolores e leveduras, nas duas bebidas lácteas e dois iogurtes, escolhidos como melhores experimentos.

**Tabela 4.16** – Valores de coliformes a 35 °C, coliformes a 45 °C e bolores e leveduras

Experimentos	Coliformes a 35 °C (NMP 100mL <sup>-1</sup> )	Coliformes a 45 °C (NMP 100mL <sup>-1</sup> )	Bolores e leveduras (UFC 100mL <sup>-1</sup> )
1	0	0	$3,0 \times 10^1$
2	0	0	$3,5 \times 10^1$
3	0	0	$1,3 \times 10^4$
4	0	0	$1,2 \times 10^4$
<b>Padrões*</b>			
Brasil (2000)	5	5	-

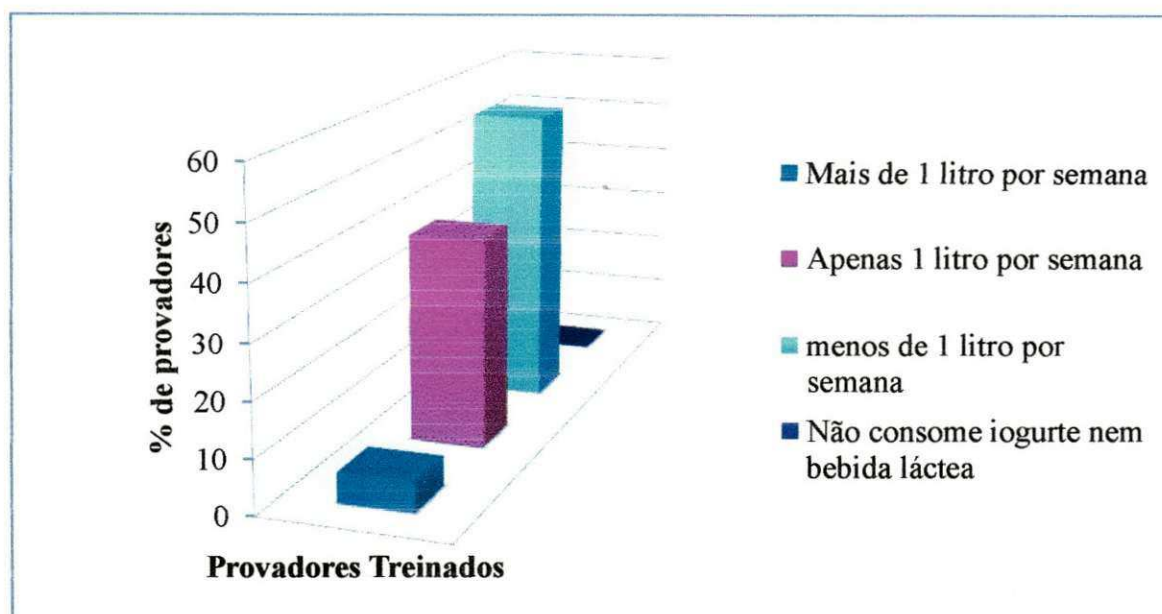
De acordo com a Tabela 4.16, os valores encontrados para coliformes a 35 °C, coliformes a 45 °C, obedecem aos Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados (BRASIL, 2000), evidenciando que o produto analisado estava próprio para o consumo humano. Segundo a Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2000), a bebida láctea apresentou padrões microbiológicos situados dentro dos limites estabelecidos para leites fermentados e iogurtes, mostrando excelente qualidade microbiológica.

KEMPKA *et al.* (2008), também encontraram, desenvolvendo formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego, utilizando substratos alternativos e cultura probiótica, ausência de coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C; já para a contagem de bolores e leveduras, seus valores encontrados foram de  $3,6 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup> e  $4,9 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>, estando bem próximos dos observados neste trabalho ( $3,0 \times 10^1$  UFC mL<sup>-1</sup>,  $3,5 \times 10^1$  UFC mL<sup>-1</sup>,  $1,3 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> e  $1,2 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>).

TEBALDI *et al.* (2007) relataram, avaliando microbiologicamente bebidas lácteas fermentadas adquiridas no comércio varejista do sul de Minas Gerais, a ausência de coliformes, como visto neste trabalho; no entanto a contagem de bolores e leveduras também foi ausente divergindo com os observados neste estudo ( $3,0 \times 10^1$  –  $1,3 \times 10^4$  UFC/100mL). CALDEIRA *et al.* (2010) encontraram, desenvolvendo bebida láctea sabor morango e utilizando diferentes níveis de iogurte e soro lácteo obtidos com leite de búfala, resultados para coliformes a 35 °C de 3,2 a 4,5 NMP mL<sup>-1</sup> e coliformes a 45 °C de 3,0 a 3,2 NMP mL<sup>-1</sup>, valores esses superiores aos observados neste estudo.

#### 4.7 – Análise sensorial

As formulações lácteas (bebidas lácteas e iogurtes) foram submetidas à análise sensorial pelos testes de diferença do controle, teste de ordenação para percepção dos atributos sensoriais de consistência, sabor e odor, teste de aceitação, intensidade do sabor ácido, avaliação da percepção de sabores diferentes daqueles normalmente encontrados em bebidas lácteas e iogurtes e a intenção de compra. Para a análise sensorial das bebidas lácteas participaram 18 provadores treinados, dos quais 44,4 % do gênero feminino e 55,6 % do gênero masculino, todos com idade entre 19 e 30 anos. Os provadores treinados estavam cursando o 3º grau. Com relação à frequência de consumo de bebida láctea ou iogurte de morango, os resultados se encontram na Figura 4.18.



**Figura 4.18** – Distribuição do consumo de iogurtes e bebidas lácteas sabor morango, para os provadores treinados

De acordo com a Figura 4.18, para provadores treinados 5,55 % consomem mais de 1 litro de bebida láctea/iogurte por semana; 38,95 %, apenas 1 litro; 55,5 % consomem menos de 1 litro, e nenhum dos provadores deixa de consumir bebida láctea/iogurte por semana.

#### 4.7.1 – Análise sensorial das bebidas lácteas

Analisando os resultados da análise sensorial das bebidas lácteas (experimento 1, experimento 2 e o padrão), obtiveram-se as seguintes respostas para a análise de variância (ANOVA) para provadores treinados (Tabela 4.17), sabendo que o fator de correção (C) foi de 492,02.

**Tabela 4.17** – ANOVA para provadores treinados

Varição	Grau de liberdade	Soma quadrática	Soma quadrática média	Teste F
Amostra	2	80,70	40,32	59,34
Julgadores	17	11,65	0,68	
Resíduo	34	20,63	0,607	
Total	53	112,98		
F tabelado <sub>0,95.2.34</sub>				3,28

Observando os resultados apresentados na Tabela 4.17, analisados manualmente segundo MINIM (2006), FERREIRA *et al.* (2000), FARIA & YOTSUYANAGI (2002) o F calculado foi de 59,34 e o F tabelado<sub>0,95.2.42</sub> (RODRIGUES & IEMMA, 2005) por interpolação foi de 3,28, observando-se que houve diferença estatisticamente significativa para 95% de confiança uma vez que a razão entre F calculado e F tabelado, foi 18,09.

Calculou-se a diferença mínima significativa (dms) entre as médias das amostras, com a qual se obteve o resultado de 0,5563; a partir deste resultado foi possível avaliar o quanto uma amostra difere das outras, como evidenciado na Tabela 4.18.

**Tabela 4.18** – Diferença de soma de ordem entre os experimentos 1 e 2 e o padrão quanto à preferência dos provadores treinados, obtida pelo teste de diferença do controle

Diferença da soma de ordens	Módulos de diferença
Padrão – Experimento 1	1,94 (s)
Padrão – Experimento 2	2,94 (s)
Experimento 1 – Experimento 2	1,00 (s)

(s) – significativo. Diferença mínima significativa (dms) = 0,5563

Segundo a Tabela 4.18, os experimentos 1 e 2 e o padrão, diferem entre si a nível de 5 % de significância, sendo que, de acordo com a ordem de diferenciação, o experimento 2 difere mais que o experimento 1.

Na análise sensorial das bebidas lácteas a diferença de soma de ordens entre os experimentos 1 e 2 e o padrão quanto ao teste de ordenação para consistência, sabor, odor e para a intensidade do sabor ácido, pode ser observada na Tabela 4.19. Segundo o teste de

soma de ordens de Friedman, e conforme o número de amostras diferentes e o número de provadores nesses experimentos, o valor da diferença mínima significativa (dms) para se obter diferença significativa entre experimentos a nível de 5 %, está apresentado na Tabela 4.19.

**Tabela 4.19** – Diferença de soma de ordem entre os experimentos 1 e 2 e o padrão quanto à preferência dos provadores treinados obtida pelo teste de ordenação

<b>Diferença da soma de ordens</b>	<b>Módulos de diferença</b>
<b>Consistência</b>	
Padrão – Experimento 1	0 (ns)
Padrão – Experimento 2	9 (ns)
Experimento 1 – Experimento 2	9 (ns)
dms (MINIM, 2006)	15
<b>Sabor</b>	
Padrão – Experimento 1	19 (s)
Padrão – Experimento 2	29 (s)
Experimento 1 – Experimento 2	10 (ns)
dms (MINIM, 2006)	15
<b>Odor</b>	
Padrão – Experimento 1	6 (ns)
Padrão – Experimento 2	18 (s)
Experimento 1 – Experimento 2	12 (ns)
dms (MINIM, 2006)	15
<b>Acidez</b>	
Padrão – Experimento 1	2 (ns)
Padrão – Experimento 2	11 (ns)
Experimento 1 – Experimento 2	13 (ns)
dms (MINIM, 2006)	15

(ns) – não significativo, (s) – significativo

De acordo com a Tabela 4.19, as amostras que apresentaram maior consistência para os provadores treinados foram o experimento 1 e o padrão, não diferindo entre si.



O experimento considerado mais saboroso foi o padrão, diferindo significativamente com os experimento 1 e 2; por outro lado, o experimento que apresentou melhor odor, foi o padrão, diferindo com o experimento 2 devido provavelmente à alta concentração de Agar; já o experimento que apresentou menor acidez, foi o experimento 2 e o que apresentou maior acidez, foi o experimento 1.

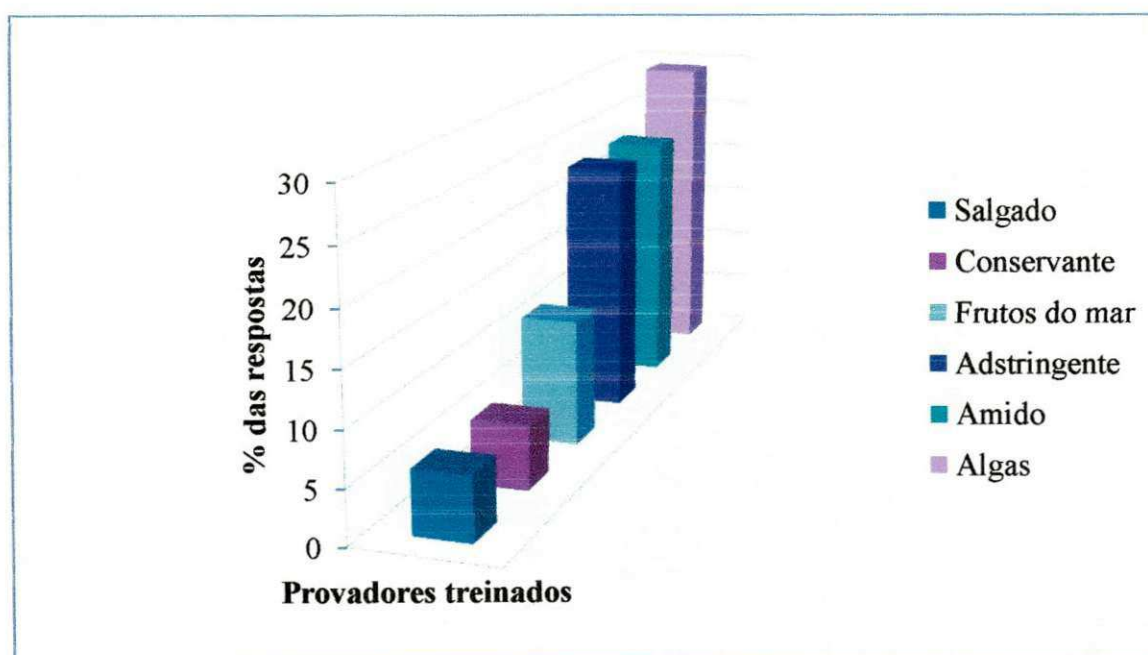
Na Tabela 4.20 tem-se as respostas do teste de aceitação, com escala hedônica, que tiveram escores variando de 1 – desgostei muitíssimo até 5 – gostei muitíssimo.

**Tabela 4.20** – Respostas do teste de aceitação

Experimentos	Provadores
Experimento 1	2,56
Experimento 2	1,78
Padrão	3,94

Analisando a Tabela 4.20 vê-se que o experimento mais aceito foi o padrão, acompanhado do experimento 1.

Quanto à pergunta, percebeu-se algum sabor diferente do que habitual em bebidas lácteas, 100 % dos provadores treinados responderam que sim. As respostas estão apresentadas na Figura 4.19.



**Figura 4.19** – Resposta dos provadores

Analisando a Figura 4.19, observa-se que 5,9% dos provadores perceberam sabor salgado e a mesma quantidade (5,9%) percebem sabor de conservante na bebida láctea analisada; analisando o sabor de frutos do mar, 11,76% o sentiram, enquanto 23,53 % dos provadores perceberam sabor adstringente.

Quanto à avaliação do sabor de amido, 23,53 % dos provadores o perceberam; já para o principal atributo, que foi o sabor de algas, 29,42 % dos provadores identificaram este sabor.

Na Tabela 4.21 se acham as respostas do teste de intenção de compra com escala hedônica, com escores variando de 1 – certamente não compraria e até 5 – certamente compraria.

**Tabela 4.21** – Respostas do teste de intenção de compra

<b>Experimentos</b>	<b>Provadores</b>
Experimento 1	2,39
Experimento 2	1,44
Padrão	3,94

A Tabela 4.21 demonstra a intenção de compra dos provadores, observando-se que o experimento padrão foi o que obteve melhores notas seguindo do experimento 1.

#### **4.7.2 – Análise sensorial dos iogurtes**

Analisando os resultados da análise sensorial dos iogurtes (experimento 3, experimento 4 e o padrão), obtiveram-se as seguintes respostas para a análise de variância (ANOVA) para provadores treinados (Tabela 4.22), sabendo que o fator de correção (C) foi de 468,17.

Tabela 4.22 – ANOVA

Varição	Grau de liberdade	Soma quadrática	Soma quadrática média	Teste F
Amostra	2	48,99	24,49	18,79
Julgadores	17	22,16	1,30	
Resíduo	34	23,67	0,69	
Total	53	94,83		
F tabelado <sub>0,95.2.34</sub>				3,28

Observando os resultados apresentados na Tabela 4.22, analisados manualmente segundo MINIM (2006), FERREIRA *et al.* (2000), FARIA & YOTSUYANAGI (2002), o F calculado foi de 18,79 e o F tabelado<sub>0,95.2.42</sub> (RODRIGUES & IEMMA, 2005) por interpolação foi de 3,28, notando-se que houve diferença estatisticamente significativa para 95% de confiança, pois a razão entre F calculado e F tabelado foi 5,73.

Continuando a análise estatística calculou-se a diferença mínima significativa (dms) entre as médias dos experimentos, obtendo-se um resultado de 0,140, a partir do qual foi possível avaliar o quanto uma amostra difere das outras, como evidenciado na Tabela 4.23.

**Tabela 4.23** – Diferença de soma de ordem entre os experimentos 3, 4 e o padrão quanto à preferência dos provadores obtida pelo teste de diferença do controle

Diferença da soma de ordens	Módulos de diferença
Padrão – Experimento 3	1,94 (s)
Padrão – Experimento 4	2,94 (s)
Experimento 3 – Experimento 4	1,00 (s)

(s) – significativo. Diferença mínima significativa (dms) = 0,140.

De acordo com a Tabela 4.23, os experimentos 3 e 4 e o padrão diferem entre si a nível de 5 % de significância, de conformidade, portanto, com a ordem de diferenciação, o experimento 4 difere mais que o experimento 3.

Na análise sensorial dos iogurtes a diferença de soma de ordens entre os experimentos 3 e 4 e o padrão quanto ao teste de ordenação para consistência, sabor, odor e a intensidade do sabor ácido, pode ser observada na Tabela 4.23. Segundo o teste de soma

de ordens de Friedman e de acordo com o número de amostras diferentes e o número de provadores nesses experimentos, o valor da diferença mínima significativa (dms) para se obter diferença significativa entre experimentos a nível de 5 %, está apresentado na Tabela 4.24.

**Tabela 4.24** – Diferença de soma de ordem entre os experimentos 3 e 4 e o padrão, quanto à preferência dos provadores obtida pelo teste de ordenação

<b>Diferença da soma de ordens</b>	<b>Módulos de diferença</b>
<b>Consistência</b>	
Padrão – Experimento 3	2 (ns)
Padrão – Experimento 4	4 (ns)
Experimento 3 – Experimento 4	2 (ns)
dms (MINIM, 2006)	15
<b>Sabor</b>	
Padrão – Experimento 3	11 (ns)
Padrão – Experimento 4	19 (s)
Experimento 3 – Experimento 4	8 (ns)
dms (MINIM, 2006)	15
<b>Odor</b>	
Padrão – Experimento 3	1 (ns)
Padrão – Experimento 4	5 (ns)
Experimento 3 – Experimento 4	4 (ns)
dms (MINIM, 2006)	15
<b>Acidez</b>	
Padrão – Experimento 3	5 (ns)
Padrão – Experimento 4	16 (s)
Experimento 3 – Experimento 4	11 (ns)
dms (MINIM, 2006)	15

(ns) – não significativo, (s) – significativo

De acordo com a Tabela 4.24 as amostras que apresentaram maior sabor foram o experimento padrão, e o experimento 3; por outro lado, o experimento mais saboroso foi o



padrão, diferindo significativamente do experimento 4, enquanto o experimento que apresentou o melhor odor foi o experimento padrão.

Para a acidez, o experimento que apresentou menor acidez foi o experimento padrão e o que apresentou maior acidez, foi o 4.

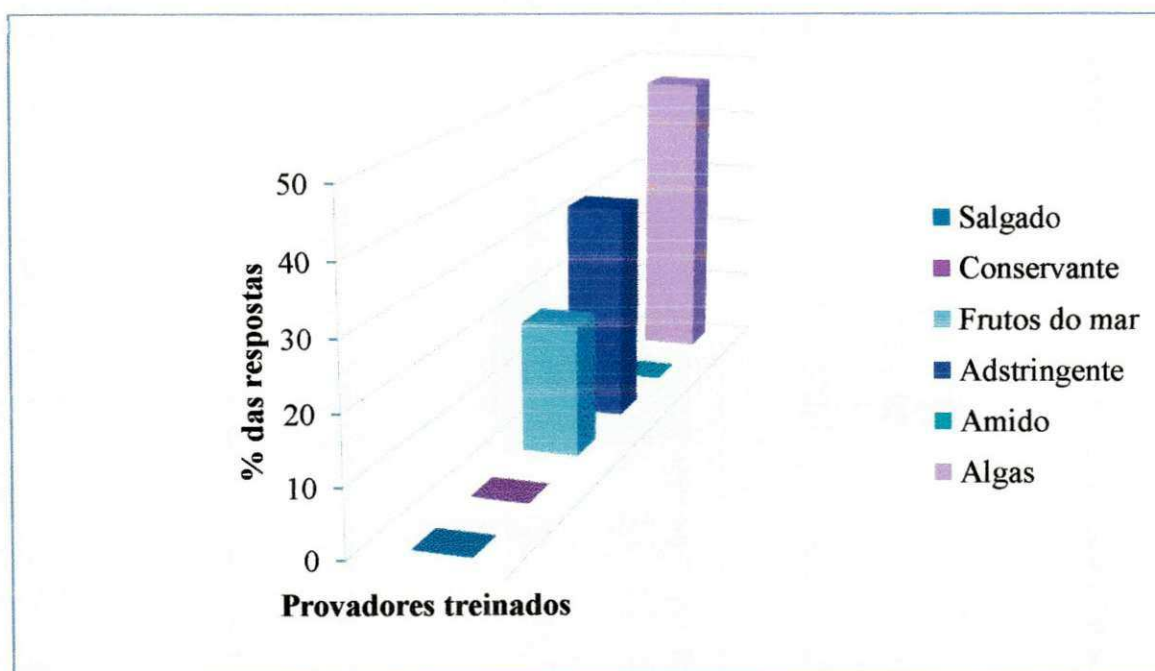
Na Tabela 4.25 estão as respostas do teste de aceitação, com escala hedônica, as quais tiveram escores variando de 1 – desgostei muitíssimo e até 5 – gostei muitíssimo.

**Tabela 4.25** – Respostas do teste de aceitação

Experimentos	Provedores
Experimento 3	2,67
Experimento 4	2,17
Padrão	4,06

Analisando a Tabela 4.25 vê-se que o experimento mais aceito foi o padrão, acompanhado do experimento 3, não tendo havendo rejeição entre as amostras.

Quanto à pergunta se foi percebido algum sabor diferente do habitual em bebidas lácteas, 100 % dos provedores responderam que sim, respostas apresentadas na Figura 4.20.



**Figura 4.20** – Respostas dos provedores



Analisando a Figura 4.20 observa-se que os provadores treinados não perceberam os sabores: salgado, conservante e amido; já foram perceptíveis para eles os sabores de frutos do mar (20 %), adstringentes (33,33 %) e algas (46,67 %).

Na Tabela 4.26 se encontram as respostas do teste de intenção de compra com escala hedônica, cujos escores variaram de 1 – certamente não os compraria, até 5 – certamente os compraria.

**Tabela 4.26** – Respostas do teste de intenção de compra

Experimentos	Provadores
Experimento 3	2,33
Experimento 4	1,78
Padrão	4,00

Na Tabela 4.26, se encontra a intenção de compra dos provadores observando que o experimento padrão foi o que obteve melhores notas, e posicionando-se em segundo lugar o experimento 3.

#### 4.8 – Análise físico-química dos elaborados láteos

A análise físico-química foi realizada apenas com os experimentos que apresentaram maior aceitação na análise sensorial, excluindo o padrão, neste caso o experimento 1 (para bebida láctea – com 0,25% de ágar, 6,5% de leite e 1,5% de inóculo) e 3 (para iogurte – com 0,25% de ágar, 13% de leite e 1,5% de inóculo). As análises foram realizadas em triplicata, visando avaliar os constituintes presentes em cada produto.

Na Tabela 4.27 se acham os valores obtidos para cada análise realizada, com suas médias e seus respectivos desvios padrões.

**Tabela 4.27** – Resultados da composição centesimal e da análise de lactose efetuada na bebida láctea de maior aceitação, com seus respectivos desvios padrão

Componente centesimal (%)	1	2	3	Média	Desvio Padrão
Umidade	<b>84</b>	83,7	83,8	83,83	0,15
Cinzas	0,567	0,569	0,568	0,568	0
Lipídios	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	0
Proteínas (N x 6,38)*	2,836	2,861	2,848	2,85	0,01
Carboidratos	12,60	12,87	12,78	12,75	
Lactose	2,597	2,87	2,784	2,75	0,14

\*Fator utilizado na determinação de proteínas, referente ao leite e derivados

\*\*Resultados com base em matéria úmida (%)

Analisando os valores relacionados na Tabela 4.27, nota-se que a umidade média foi de 83,83 %, resultando em um extrato seco de 16,16%, dividido em cinzas 0,568%, lipídios 0%, proteínas 2,85% e carboidratos de 12,75%.

CUNHA *et al.* (2008) encontraram valor de umidade de 81,91% próximo ao encontrado neste trabalho (83,83%); já ALMEIDA *et al.* (2001) observaram valores médios de 91,2%.

As cinzas observadas neste estudo (0,568%) estão próximas às encontradas na literatura (0,65%) (CUNHA *et al.*, 2008).

Não foram encontrados relatos na literatura em que os lipídios estivessem com 0%, como visto neste trabalho. O valor mais próximo encontrado foi observado por SANTOS *et al.* (2006) ao trabalhar com elaboração e caracterização de uma bebida láctea fermentada com polpa de umbu (*Spondias tuberosa* sp.), os quais obtiveram 0,78% de lipídios.

Para as proteínas os valores encontrados na literatura, 2,08% (ALMEIDA *et al.*, 2001) e 2,23% (CUNHA *et al.*, 2008), estão condizentes com os valores encontrados nesta pesquisa (2,85%).

Na Tabela 4.28 estão relacionados os valores obtidos para cada análise realizada no iogurte de maior aceitação, com suas médias e respectivos desvios padrões.

**Tabela 4.28** – Resultados da composição centesimal e da análise de lactose efetuada no iogurte de maior aceitação, com seus respectivos desvios padrão

<b>Componente centesimal (%)</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
Umidade	78,6	78,7	78,6	78,63	0,06
Cinzas	0,87	0,871	0,869	0,87	0
Lipídios	0	0	0	0	0
Proteínas (N x 6,38)*	5,346	5,329	5,365	5,35	0,02
Carboidratos	15,18	15,10	15,17	15,15	
Lactose	5,184	5,1	5,166	5,15	0,04

\*Fator utilizado na determinação de proteínas, referente ao leite e derivados

\*\*Resultados com base em matéria úmida (%)

Para os valores relacionados na Tabela 4.28, a umidade média foi de 78,63%, resultando em um extrato seco de 21,37%, dividido em cinzas 0,87%, lipídios 0%, proteínas 5,35% e carboidratos 15,15%.

TORRES *et al.* (2000) encontraram valor de umidade (85,87%), trabalhando com a composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal; valores semelhantes também foram observados por CUNHA *et al.* (2008) (80,56%) e por BORGES *et al.* (2009) (84,4%).

Na literatura foram observados valores de 0,60%, 0,71%, 0,25% (CUNHA *et al.*, (2008); TORRES *et al.*, (2000) e BORGES *et al.*, (2009), respectivamente) para cinzas, estando próximos ao valor médio encontrado nesta pesquisa (0,87%).

Não foram encontrados relatos na literatura em que os lipídios estivessem com 0%, como referindo neste trabalho, devido à utilização de leite em pó desnatado.

Analisando a percentagem de proteínas os valores encontrados na literatura, 4,29% (TORRES *et al.*, 2001) e 4,77% (BORGES *et al.*, 2009) estão condizentes com os relatos desta pesquisa (5,35%); já o valor observados por CUNHA *et al.* (2008), foi 2,80%,

#### **4.9 - Vida útil do elaborado lácteo**

A vida útil dos elaborados lácteos mais aceitos na análise sensorial foi realizada acompanhando os produtos (bebida láctea – experimento 1 e iogurte – experimento 3)

durante 36 dias, realizando-se as mesmas análises feitas no estudo cinético (acidez, pH, crescimento celular, ART e AR).

Na Tabela 4.29 se encontram as médias dos resultados para a vida útil dos produtos.

**Tabela 4.29 - Resultados da vida útil dos produtos elaborados**

<b>Produto</b>	<b>Tempo (dias)</b>	<b>Acidez (°D)</b>	<b>pH</b>	<b>Crescimento celular (g/L)</b>	<b>ART (g/L)</b>	<b>AR (g/L)</b>
Bebida láctea	0	66	3,69	0,048	2,80	2,75
	7	70	3,48	0,059	2,65	2,52
	14	70	3,46	0,058	2,63	2,49
	21	70	3,49	0,049	2,60	2,47
	29	70	3,48	0,049	2,53	2,39
	36	70	3,48	0,050	2,53	2,39
Iogurte	0	100	3,82	0,137	6,99	6,90
	7	100	3,80	0,135	6,86	6,73
	14	104	3,64	0,142	6,70	6,59
	21	106	3,67	0,146	6,59	6,45
	29	106	3,64	0,149	6,57	6,43
	36	106	3,63	0,151	6,52	6,40

No tempo zero do armazenamento da bebida láctea e do iogurte observou-se pH de 3,69 e 3,82, respectivamente, e acidez 66 e 100 °D, dentro, portanto, dos padrões normais vigentes.

Durante os 36 dias de armazenamento sob refrigeração foram observadas características normais, tanto na bebida láctea quanto no iogurte, nas condições de estocagem (6 °C).

## 5 – CONCLUSÕES

Com os resultados deste estudo, conclui-se:

Quanto à identificação das algas e à toxicidade frente à *Artemia salina* Leach, que:

- As algas em estudo foram caracterizadas como sendo a *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira e a *Gracilaria caudata* J. Agardh.
- A *Gracilaria caudata* J. Agardh e a *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira obtiveram baixa concentração letal média (CL<sub>50</sub>), classificando-as como inócua e própria para o consumo.

Referente à composição centesimal das algas:

- As duas algas em estudo (*Gracilaria caudata* J. Agardh e a *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira) apresentaram composição centesimal semelhante.

No que se refere à análise microbiológica da água do mar:

- As amostras analisadas indicaram que a água do local de extração da alga é de excelente qualidade para a balneabilidade.

Em se referindo à extração do ágar:

- A alga que obteve maior rendimento foi a *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira com rendimento aproximado de 9%, no experimento em que foram adicionados 1% de hipoclorito, alga triturada e 300 mL de água, para 10 gramas de alga.
- Na extração do ágar da *Gracilaria caudata* J. Agardh, o experimento que obteve maior rendimento foi o com uma média de 6,4% de ágar, com a alga inteira, 300 mL de água para 10 gramas de alga e fixando-se o valor de hipoclorito em 1%.



Quanto ao estudo do elaborado lácteo

- Similaridade nas condições de crescimento da flora láctica termófila (*L.bulgaricus* e *S. termophilus*) nas formulações contendo *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira, se comparadas com as bebidas lácteas industriais.
- As enzimas resultantes dos metabólitos microbianos em reação com a *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira, resultaram em condições favoráveis de viscosidade, plasticidade, características dos iogurtes e elaborados lácteos atuais.
- Ausência de sinérese, indicativa da ação tensoativa da *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira, com estabilidade proteica nos formulados lácteos, sem formação de soro e emulsificação estável do produto.
- Condições simbióticas de crescimento microbiano com substratos e transformações características da cultura termófila, na presença da *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira, com tempo ideal de incubação.
- A velocidade máxima de crescimento celular dos 11 experimentos foi igual a  $0,2171 \pm 0,0769 \text{ h}^{-1}$ .
- A quantificação de coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C nos elaborados lácteos, está dentro dos Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, mostrando excelente qualidade microbiológica.

Quanto à análise sensorial

- Para as bebidas lácteas o experimento mais aceito foi o padrão, acompanhado do experimento com 0,25% de ágar, 6,5% de leite e 1,5% de inóculo (experimento 1).
- Para os iogurtes, o experimento padrão foi o que obteve melhor aceitação seguido do experimento com 0,25% de ágar, 13% de leite e 1,5% de inóculo (experimento 3).

Em relação à vida útil dos elaborados lácteos

- Observaram-se características normais, tanto na bebida láctea quanto no iogurte nas condições de estocagem (6 °C) durante todo o período de armazenamento.

Quanto à conclusão geral do trabalho

- O ágar nativo da *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira, mostrou-se excelente espessante, visto que aumentou consideravelmente a viscosidade dos produtos elaborados. A extração de ágar apresenta-se como método visivelmente promissor para a produção e adequação industrial deste insumo, na indústria láctea.

**LITERATURA CITADA**

ÁGAR-ÁGAR. Agar ou Agar-agar, o mais antigo ficocolóide. **Aditivos e ingredientes**. n.56, 9 p. 2008.

ALISTE, A. J. **Uso de substâncias antioxidantes na resposta a radiação dos hidrocolóides carragenanas, agaranas e alginatos utilizados na indústria alimentícia**. (Tese de Doutorado). IPEN, 90p. 2006.

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

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. A. **Engenharia Bioquímica**. Biotecnologia. 2.ed. São Paulo. Ed. Edgard Blucher Ltda. 300p. 1983.

ARAÚJO, P. G. **Ecologia populacional de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) na Área de Proteção Ambiental da Barra do Rio Mamanguape, Paraíba – Brasil**. (Dissertação de Mestrado). UFPE, 95p. 2005.

ARMISEN, R. Word-wide use and importance of *Gracilaria*. **Journal of Applied Phycology**, Lawrence, v.7, p.231-243, 1995.

ASCENCIO, S. D.; **Heterosídeos sintetizados por linhagens de cor e estágios reprodutivos de macroalgas vermelhas dos gêneros *Hypnea* e *Gracilária*** (Tese de Doutorado). Curitiba, 2006.

BARROS NETO, B. de; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2 ed. Editora da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, SP, 299p. 1996.

- BELLORIN, A. M. **Sistemática e filogenia molecular de algas gracilarióides (*Gracilariaceae*, *Rhodophyta*)** (Tese de Doutorado). Instituto de Biociência. Universidade de São Paulo, 194p. 2002.
- BIRD, K. T.; HINSON, T. K. Seasonal Variations in Agar Yields and Quality from North Carolina agarophytes. **Botanica Marina**, v.35. p.291-295. 1992.
- BORGES, K. C.; MEDEIROS, A. C. L. de; CORREIA, R. T. P. Iogurte de leite de búfala sabor cajá (*Spondias lutea* L.): Caracterização físico-química e aceitação sensorial entre indivíduos de 11 a 16 anos. **Alimentos e Nutrição**, v.20, n.2, p.295-300, 2009.
- BRANCO, I. G.; SANJINEZ-ARGANDONA, E. J.; SILVA, M. M. da; PAULA, T. M. de. Avaliação sensorial e estabilidade físico-química de um blend de laranja e cenoura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p.7-12, 2007.
- BRASIL. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. 4º ed. 1º edição digital. São Paulo, 1020 p, 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea**. Diário Oficial da União de 24/08/2005 , Seção 1 , Página 7.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Resolução nº 5, 13 de novembro de 2000. Padrões de identidade e qualidade (PIQ) de leites fermentados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 27 nov. p.9-12, 2000.
- BRAVIN, I. C.; VALENTIN, Y. Y.; YOKOTA, N. S. Formação de calos e regeneração de segmentos apicais de *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (*Gigartinales*, *Rhodophyta*): obtenção de culturas axênicas e efeitos da concentração do Agar. **Revista Brasileira de Botânica**, v.29, n.1, p.175-182, 2006.

CABRAL, I. S. R.; SHIRAHIGUE, L. D.; ARRUDA, L. F. de; CARRES, S. T.; OETTERER, M. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante e antimicrobiano. **Boletim do CEPPA**, v.29, n.2, p.181-192, 2011.

CALDEIRA, L. A.; FERRÃO, S. P. B.; FERNANDES, S. A. DE A.; MAGNAVITA, A. P. A.; SANTOS, T. D. R. Desenvolvimento de bebida láctea sabor morango utilizando diferentes níveis de iogurte e soro lácteo obtidos com leite de búfala. **Ciência Rural**. Santa Maria, Online. 2010.

CARTÉ, B.K. Biomedical potential of marine natural products. **BioScience** v.46, p.271-286. 1996.

CARVALHO FILHO, J. Algas – Uma alternativa para a comunidade pesqueira. **Panorama da Aqüicultura**. n.14, v.84, p.52-56. 2004.

CONAMA. Resolução n. 274, de 2000. Trata da balneabilidade, dá definições e revoga artigos da resolução 020/86 – Data da legislação: 29/11/2000 – Publicação DOU n. 18, de 8/01/2001, p. 70-71. Brasília (DF): Ministério do Meio Ambiente; 2001.

CHOW, F.; CAPOCIAMA, F. V.; FARIA, R.; OLIVEIRA, M. C. de. Characterization of nitrate reductase activity *in vitro* in *Gracilaria caudate* J. Agardh (*Rodhophyta*, Gracilariales). **Revista Brasileira de Botânica**, v.30, n.1, p.123-129, 2007.

COULTATE, T. P. **Alimentos: a química de seus componentes**. Editora Artmed. Porto Alegre. 3º ed. 368p. 2004.

COSTA, F. H. DA S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. DE; PEREIRA, J. E. S. Efeito de agentes gelificantes alternativos no meio de cultura no cultivo *in vitro* de abacaxizeiro e bananeira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.1; p.41-46, 2007.

CUNHA, S. R.; PAZETO, F. D.; CRESTANI, D. E. V. LIMA, G. B.; NASCIMENTO, J.; SANT'ANNA, F.; MANZONI, G. C.; MARENZI, A. W. C.; MAFRA JÚNIOR, L. L. Potencial de crescimento de macroalgas cultiváveis presentes na Enseada de Armação do



Itapocoroy (Penha, SC): Avaliação preliminar. **Notas Técnicas Facimar**, n.3, p.17-25, 1999.

CUNHA, T. M.; CASTRO, F. P. de; 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. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v.29, n.1, p.103-116, 2008.

FARIA, E. V. de; YOTSUYANAGI, K. **Técnicas de análise sensorial**. ITAL. São Paulo, 116p. 2002.

FARIAS, W. R. L.; NAZARETH, R. A.; MOURÃO, P. A. S. Dual effects of sulfated D-galactans from the red algae *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. **Thrombosis and Haemostasis**, v.86, n.6, p.1540-1546, 2001.

FERRARIO, M.; SAR, E. **Macroalgas de interes econômico. Cultivo, manejo, industrialización**. Editorial de La Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina. 296p. 1996.

FERREIRA, V. L. P. **Análise sensorial: Testes discriminativos e efetivos**. SBCTA – Manual. Campinas, 127p., 2000.

GLICKMAM, M. Utilization of seaweed hydrocolloids in the food industry. **Hydrobiologia**. v.31, n.4, p.151-152, 1987.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A.; ARAÚJO, R. P de A.; RAMOS, M. de L. L. de C. Procedimentos para a utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo: **CETESB**, 17p. 1990.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. Bifidobacterium spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v.10, 139-157, 1999.

IBERAGAR. Agar-agar poderoso espessante e gelificante natural. A alternativa mais saudável e produtiva a outros espessantes. **Aditivos e ingredientes**. n.70, 2010.

JOHNSON, E. J. A biological role of lutein. **Food Reviews International**, v.20, n.1, p.1-16, 2004.

KEMPKA, A. P.; KRÜGER, R. L.; VALDUGA, E.; Di LUCCIO, M.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R.; OLIVEIRA, D. de. Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego utilizando substratos alternativos e cultura probiótica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.170-177, 2008.

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

LELIS, F. C. L. **Avaliação do crescimento da alga marinha *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta), cultivada em estrutura de long-line**. Universidade Federal do Ceara, Departamento de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 72p. 2006.

LIMA RF, CRIDDLE DN, SOUZA EP, SAMPAIO AH, NASCIMENTO KS, CAVADA BS, ASSREUY AM. Red marine alga *Bryothamnion triquetrum* lectin induces endothelium-dependent relaxation of the rat aorta via release of nitric oxide. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.11, n.56, p.1415-1421, 2004.

LOBBAN, C.S. e HARRISON, P.J. **Seaweed ecology and physiology** cambridge University Press, USA. 366 p, 1994.

LUCENA, L. A. F. de; KANAGAWA, A. I.; MARTINS, G. J. M.; TARGINO, C. H.; MIRANDA, G. E. C.; HORTA, P. A. Levantamento da flora infralitoral do município de Pitimbú, Litoral Sul do Estado da Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, Porto Alegre, v.5, suplemento 2, p.585-587, 2007.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.16, n.2, p.158-163, 2006.

LUNA J.S, SANTOS A.F, LIMA M.R.F, OMENA M.C, MENDONÇA F.A.C, BIEBER L.W, SANT'ANA A.E.G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacol**. n.97, v.2, p.199-206. 2005.

MABEAU, S.; CAVALOC, E.; FLEURENCE, J. L. A.; HAYE, M. New seaweed based ingredients for the food industry. **International Food Ingredient**. v.3, p.38-44, 1992.

MACIEL, J. S.; CHAVES, L. S.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; FREITAS, A. L. P.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, R. C. M. de. Strutral characterization of cold extrated fraction of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Carbohydrate Polymers**, n.71, p.559-565, 2008.

MAMATHA; B. S.; NAMITHA, K. K.; SENTHIL, A.; SMITHA, J.; RAVISHANKAR, G. A. Studies on use of *Enteromorpha* in snack food. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1707-1713, 2007.

MASIH NETO, T. **Cultivo da carragenófito *Hypnea musciformis* (Wulfen) j.v. lamour. (Gigartinales - Rhodophyta) em estruturas long-line.**(Dissertação de Mestrado). UFC. 56p. 2009.

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Resolução Nº 5, de 13 de Novembro de 2000. Aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952 , o art. 84 da Portaria Ministerial nº 574, de 8 de dezembro de 1998.

MARGOLLES, A. GARCIA, L.; SÁNCHEZ, B.; GUEIMOND, M.; REYES-GARILÁN, C. de los. Charasterisation of a Bifidobacterium strain with acquired resistência to cholate-A preliminary study. **International Journal of Food Microbiology**, v.82, 191-198, 2003.

MARINHO-SORIANO, E.; MOREIRA, W. S. C.; CARNEIRO, M. A. A. Some aspects of the growth of *Gracilaria birdiae* (Gracilariaceae, Rhodophyta) in an estuary in northeast Brazil. **Aquaculture International**. v.14, p.327-336, 2006.

MATHIAS, T. R. dos S. **Desenvolvimento de iogurte sabor café: avaliação sensorial e reológica**. (Dissertação de Mestrado). UFRJ. 191p. 2011.

McHUGH, D. J. A guide to seaweed industry. **FAO Fisheries Technical Paper n°441**. Rome. 105 p., 2003.

McHUGH, D. J. Production and utilization of products from commercial seaweed. **FAO Fisheries Technical Paper n°288**. Rome. 194p., 1987.

McHUGH, D. J. Perspectivas para la producción de algas marinas en los países en desarrollo. **FAO Circular de Pesca No. 968**. Roma, FAO. 30p., 2002.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 2.ed. Florida: CRC Press, 1991

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, p.35-34. 1982.

MILANI, M. G.; ZIOLLI, R. L. **Avaliação do potencial tóxico de novos compostos e de compostos de interesse ambiental através do ensaio de toxicidade aguda utilizando *Artemia salina***. Relatório de PIBIC/CNPQ – PUC, Rio de Janeiro, 9p, 2007.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426, 1959.

MINIM, V. P. R. **Análise Sensorial: Estudos com consumidores**. Universidade Federal de Viçosa. Editora UFV. Viçosa. 225 p. 2006.

MURANO, E. Chemical structure and quality of agars from *Gracilaria*. **Journal of Applied Phycology**. v.7, p.245-254, 1995.

OLIVEIRA, E. C.; HORTA, P. A.; AMANCIO, C. E.; SANT'ANNA, C. L. **Algas e angiospermas marinhas bênticas do litoral brasileiro: diversidade, exploração e conservação**. USP, São Paulo. 60p. Disponível em: [http://www.plantas\\_marinhasbrasil.pdf](http://www.plantas_marinhasbrasil.pdf). Acesso em: 02/11/2010.

OLIVEIRA, E. C.; MIRANDA, G. E. C. Aspectos sociais e econômicos da exploração de algas marinhas no Brasil. In: **Congresso Latino-Americano**, 1998, Caxambu, MG-Brasil. Anais... v.II, p.149-156, 1998.

OLIVEIRA FILHO, E. C. **Algas marinhas bentônicas do Brasil**. (Tese Livre-Docência). USP, São Paulo. 407 p., 1977.

OLIVEIRA, S. R. C. de. **Implantação de cultivo experimental de algas marinhas da espécie *Gracilaria cornea* (Rodophyta, Gracilariales) nas comunidades de Galeão e Garapuá, Cairu – Ba**. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Biologia (Monografia). Bahia. 42 p. 2005.

OLIVEIRA, V. M. de; CORTEZ, M. A. S.; FREITAS, M. Q. de, FRANCO, R. M. Avaliação sensorial de bebida láctea fermentada com diferentes concentrações de soro de queijo, enriquecida com ferro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.13, n.2, p.67-70, 2006.

ORNELLAS, L. H. **Técnica e dietética, seleção e preparo de alimentos**. Editora Atheneu. São Paulo, 8º edição, 296p., 2006.

PATARRA, R. F.; PAIVA, L.; ISABEL NETO, A.; LIMA, E.; BAPTISTA, J. Nutritional value of selected macroalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n.2, p.205 – 208, 2010.



PEREIRA, L. **As algas marinhas e respectivas utilidades**. Universidade de Coimbra. (Palestra). 19p. 2008.

PLASTINO, E. M.; OLIVEIRA, E. C. *Gracilaria birdae* (Gracilariales, Rhodophita), a new species from the tropical South American Atlantic with a terete frond and deep spermatangial conceptacles. **Phycologia**, v.41, n.4, p.389-396, 2002.

RADMER, R.J. Algal diversity and commercial algal products. **BioScience**, v.46, p.263-270. 1996.

RAMOS, R. J. **Monitoramento bacteriológico de águas do mar e de ostras (*Crassostrea gigas*) em áreas de cultivo na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina**. (Dissertação de Mestrado). UFSC, Florianópolis, 117p. 2007.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 7º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 760p, 2007.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. Instituto Mauá de Tecnologia. Editora Edgard Blucher LTDA. 1º ed. 184p. 2004.

RODRIGUES, J. A. G. **Atividade anticoagulante de galactanas sulfatadas de algas marinhas vermelhas do gênero *Halymenia* e seu efeito imunoestimulante no camarão marinho *Litopenaeus vannamei***. (Dissertação de Mestrado). UFC, Fortaleza, 77p., 2006

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F.. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia seqüencial de planejamentos**. 1 ed. Editora Casa do Pão. Campinas, SP. 326 p. 2005.

SANTOS, C. T.; MARQUES, G. M. R.; FONTAN, G. C. R.; FONTAN, R. da 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**, Campina Grande, v.8, n.2, p.111-116, 2006.

SILVA, N.; NETO, R. C.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de água**. Livraria Varela. 1º ed. São Paulo. 166p. 2005.

SILVA, N. de; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. Livraria Varela. 4º ed. São Paulo. 632 p. 2010.

SILVA, V. C. **Desenvolvimento de técnicas biotecnológicas utilizando o amido do caroço de manga para diversificação produtiva no setor lácteo**. PIBIC 2010/2011. Universidade Estadual da Paraíba. 2011.

SIMÕES, M. A. **Estudo de cultivo e de biomoléculas da macroalga *Gracilaria birdiae* (Rhodophyta, Gracilariales)**. (Dissertação de Mestrado). UFRPE. 54p. 2009.

SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G.; GARCEZ, W. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo Fitoquímico de *Unonopsis Lindmanii* - Annonaceae, Biomonitorado Pelo Ensaio de Toxicidade Sobre A *Artemia Salina* Leach. **Química Nova**, n.21, v.5, p.557-559, 1998.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory Evaluation Practices**. 2 ed. San Diego: Academic Press, 295p. 1993.

TEBALDI, V. M. R.; RESENDE, J. das G. O. S.; RAMALHO, G. C. de A.; OLIVEIRA, T. L. C. de; ABREU, L. R. de; PICCOLI, R. H. Avaliação microbiológica de bebidas lácteas fermentadas adquiridas no comércio varejista do sul de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.4, 2007.

TEXEIRA, V. L.; KELECOM, A.; GOTTLIED, O. R. Produtos naturais de algas marinhas. **Química Nova**, v.14, n.2, p.83-90, 1991.

TRIBOLI, E. P. D. R.. Métodos analíticos para o acompanhamento da fermentação alcoólica. **Apostila – Laboratório de Engenharia Bioquímica e de Alimentos**, Escola de Engenharia de Mauá, Instituto Mauá de tecnologia, São Caetano do Sul. 52 p. 1989.

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

URBANO, M. G.; GOŃI, I. Bioavailability of nutrients in rats fed on edible seaweeds, Nori (*Porphyra tenera*) and Wakame (*Undaria pinnatifida*), as a source of dietary fiber. **Food Chemistry**, v.76, p.281-286, 2002.

VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas não alcoólicas: Ciência e tecnologia**. Editora Blucher. v.2. 2010.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. do C. E. Algas: Da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**. v.27, n.1, p.139-145, 2004.

WERLINGER. C., LÉPEZ, I.; KLEMPAU, C.; SOBARZO G. Acuicultura: cultivo y producción de organismos acuáticos In: *Biología Marina y Oceanografía: Conceptos y Procesos*. Nacional del libro y la Lectura. Universidad de Concepción. Chile. **Trama Impresores**. v.II, p.559 -594. 2004.

WILLIS, M. S.; WIANS JÚNIOR., F. H. The role of nutrition in preventing prostate cancer: a review of the proposed mechanism of action of various dietary substances. **Clinica Chimica Acta**, v.330, n.1/2, p.57-83, 2003.

WYNNE, M. J. A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: second revision. **Berlin-Stuttgart: Nova Hedwigia**, 152 p., 2005.

YOSHIMURA, C. Y. **Avaliação do potencial de cultivo e produção de ágar de Gracilaria domingensis e de Gracilaria caudata (Rhodophyta, Gracilariales) na**

**Enseada de Armação do Itacoroy (Penha, Santa Catarina).** (Tese de Doutorado). USP, São Paulo, 163 p., 2006.

# ANEXO



## ANEXO I

### Dados Pessoais:

Nome: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_ e-mail: \_\_\_\_\_

Provador treinado? ( ) Sim ( ) Não

1) **Faixa etária?**

- ( ) Menos de 25 anos
- ( ) De 25 a 35 anos
- ( ) De 35 a 45 anos
- ( ) Mais de 45 anos

2) **Sexo?**

- ( )  
Feminino
- ( )  
Masculino

3) **Ocupação?**

- ( ) Aluno de  
graduação
- ( ) Professor
- ( ) Outra

**4) Indique sua frequência de consumo de Bebida láctea ou Iogurte de morango.**

**Observação: 5 copos = 1 litro de Bebida láctea ou iogurte.**

- ( ) Mais de 1 litro por semana
- ( ) Apenas 1 litro por semana
- ( ) Menos de 1 litro por semana
- ( ) Não consumo Iogurte nem Bebida Láctea

**5) Se consome.**

- ( ) Consome por que gosta.
- ( ) Consome por que sabe que lhe faz bem, mas não gosta.
- ( ) Consome por que é obrigado.

**6) Você já consumiu algas?**

**Observação: Algas são ingredientes bastante utilizados na culinária japonesa.**

- ( ) Sim, e gostei.
- ( ) Sim, mas nem gostei, nem desgostei.
- ( ) Sim, mas não comeria novamente.
- ( ) Não.

**Obrigada!**

## ANEXO II

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA-UEPB  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA- PRPGP  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS  
COMPROVANTE SISNEP

Andamento do projeto - CAAE - 0725.0.133.000-11

Título do Projeto de Pesquisa
ESTUDO DE TÉCNICAS DE ABSORÇÃO INDUSTRIAL DA <i>Gracilaria birdiae</i> PLASTINO & OLIVEIRA PARA DIVERSIFICAÇÃO PRODUTIVA NO SETOR LÁCTEO

Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	22/11/2011 12:08:50	09/12/2011 08:21:27		

Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	21/11/2011 17:33:35	Folha de Rosto	FR481667	Pesquisador
3 - Protocolo Aprovado no CEP	09/12/2011 08:21:27	Folha de Rosto	0725.0.133.000-11	CEP
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	22/11/2011 12:08:50	Folha de Rosto	0725.0.133.000-11	CEP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Profª Dra. Domicília Pedrosa de Araújo  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

### ANEXO III

#### Treinamento – Análise sensorial (Teste Triangular)

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

Você está recebendo amostras de bebidas lácteas, duas das três amostras apresentadas são idênticas. Por favor, prove as amostras da esquerda para a direita e circule o código daquela que lhe pareça diferente em cada série (triângulo). Enxague a boca após a degustação e espere trinta segundos.

435

273

892

Comentários: \_\_\_\_\_

Obrigada pela participação!

## ANEXO IV

### Treinamento – Análise sensorial (Teste Duo-Trio)

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

Você está recebendo uma amostra padrão (P) e duas amostras codificadas de iogurte de morango. Uma amostra codificada é igual ao padrão e a outra diferente do padrão, primeiramente prove a amostra padrão (P) e então prove as amostras codificadas da esquerda para direita. Identifique com um círculo, a amostra codificada que for igual ao padrão.

452

868

Comentários: \_\_\_\_\_

Obrigada pela participação!

## ANEXO V

### Treinamento – Análise sensorial (Teste de Ordenação)

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

Prove as amostras da esquerda para a direita e ordene-as em ordem crescente de sabor de morango.

\_\_\_\_\_

SABOR MENOS INTENSO SABOR MAIS INTENSO

Comentários: \_\_\_\_\_

Obrigada pela participação!

## ANEXO VI

Treinamento – Análise sensorial (Teste de Escala de Intensidade)

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

Quanto a acidez ordene de forma CRESCENTE qual amostra você avalia como mais ácida e qual você avalia como menos ácida.

\_\_\_\_\_

MENOS ÁCIDA

\_\_\_\_\_

MAIS ÁCIDA

Comentários: \_\_\_\_\_

Obrigada pela participação!





**Gostos básicos:**

4 – Quanto à acidez, ordene de forma crescente qual amostra você avalia como menos ácida e qual você avalia como mais ácida.

\_\_\_\_\_   
Menos ácida

\_\_\_\_\_   
Mais ácida

**Percepção:**

5 – Foi percebido algum sabor diferente nas amostras? ( ) Sim ( ) Não

6 – Se sim, qual?

<input type="checkbox"/> Salgado	<input type="checkbox"/> Conservante	<input type="checkbox"/> Frutos do mar
<input type="checkbox"/> Adstringente	<input type="checkbox"/> Amido	<input type="checkbox"/> Algas

**Intenção de compra:**

7 – Avaliando as três amostras codificadas, qual a sua intenção de compra?

Amostras:  _____ xxx                  yyy                  zzz	5 – Certamente compraria. 4 – Provavelmente compraria. 3 – Tenho dúvidas se compraria. 2 – Provavelmente não compraria. 1 – Certamente não compraria.
---	---

Observação:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Obrigada pela participação!