

JULIANA DE CÁSSIA GOMES ROCHA

**ADIÇÃO DOS CORANTES NATURAIS ANTOCIANINAS E LUTEÍNA EM
BEBIDAS FORMULADAS COM PROTEÍNAS DE SORO DE LEITE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

R672a
2013

Rocha, Juliana de Cássia Gomes, 1987-
Adição dos corantes naturais antocianinas e luteína em
bebidas formuladas com proteínas de soro de leite / Juliana de
Cássia Gomes Rocha. – Viçosa, MG, 2013.
xiv, 111f. : il. (algumas color) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Paulo Cesar Stringheta

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 90-100

1. Compostos bioativos. 2. Corantes. 3. Leite – Proteínas.
4. Antioxidantes. 5. Antocianinas. 6. Carotenoides. I.
Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.07

JULIANA DE CÁSSIA GOMES ROCHA

**ADIÇÃO DOS CORANTES NATURAIS ANTOCIANINAS E LUTEÍNA EM
BEBIDAS FORMULADAS COM PROTEÍNAS DE SORO DE LEITE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 7 de março de 2013.

Antônio Fernandes de Carvalho
(Coorientador)

Valéria Paula Rodrigues Minim
(Coorientadora)

Ítalo Tuler Perrone

Paulo Cesar Stringheta
(Orientador)

A minha mãe Maria José, ao meu pai Antonio Luiz, aos meus irmãos:

Viviane e Antônio Augusto;

Todo meu Agradecimento, admiração e carinho!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, ser alicerce para minha sustentação e me guiar sempre rumo às minhas conquistas. À Maria, mãe santíssima, pelas inúmeras vezes que me colocou no colo nos momentos de prova e aflição.

À Universidade Federal de Viçosa, instituição responsável pela minha formação e ao programa de pós-graduação Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade da realização deste curso.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Paulo Cesar Stringheta, pela orientação e amizade, por ter acreditado no meu trabalho, pelos conhecimentos, experiências e ensinamentos compartilhados.

Ao meu coorientador, Professor Antônio Fernandes, pelo fornecimento do soro, empréstimo do laboratório, e pelo incentivo constante.

À minha coorientadora, Professora Valéria Minim, pela acolhida e pelos ensinamentos compartilhados, pelas sugestões para o aprimoramento deste trabalho.

Ao professor Ítalo, pela disponibilidade de participação na banca e contribuição valiosa para melhoria do meu trabalho.

Ao professor Afonso, por ter disponibilizado o laboratório para as análises de viscosidade e ao Anderson por ter me ajudado na realização das mesmas.

Ao Valério Poletto, funcionário do laboratório de Corantes Naturais e Compostos Bioativos, por sua presteza, dedicação, e pelas conversas divertidas e todos os cafezinhos.

Aos amigos do laboratório: Adriana; pelas inúmeras conversas e discussões, incentivo e amizade de sempre, Isadora; por estar sempre pronta a me ajudar, pelas sugestões e ajuda na formatação, além do carinho imenso, a Kéllen pelas horas empenhadas na realização deste trabalho, por sempre me incentivar além de todo o carinho e amizade; A Rita, pela amizade e alegria de sempre, a disposição para o trabalho e ajuda em inúmeras etapas do meu experimento. Ao Ígor e Tonye, pela amizade e ajuda na análise sensorial, além das discussões divertidas dos cafezinhos.

Aos estagiários, Mariza, Mariana e Vinícius, pelo apoio e colaboração, pelo trabalho dedicado ao meu experimento com tanto zelo e cuidado, sem vocês eu não teria conseguido.

À Eliana, Natália e Fabiano que chegaram ao final, mas não mediram esforços em me ajudar nas análises e nas discussões. E a Paula Cipriano e Paula Araújo, que partiram antes do fim deste trabalho, mas que contribuíram muito com sugestões e experiências vividas.

Aos amigos do Laboratório de Leite e Derivados por toda dedicação, e estarem sempre dispostos a ajudar independente de qual seja o trabalho, em especial; a Maura que me auxiliou em todas as etapas, nas análises microbiológicas, além de toda a amizade durante o período do mestrado. Ao Guilherme, pela boa vontade, em realizar as análises de proteínas, sacrificando seu tempo em favor do meu experimento.

À empresa Duas Rodas Industrial, pelo fornecimento dos aromatizantes. À empresa Gemacon Tech, por ter fornecido o concentrado proteico de soro, em especial ao amigo Gabriel por ter viabilizado o fornecimento e transporte deste ingrediente.

Aos meus pais, Maria José e Antonio Luiz, por nunca medir esforços para que meus sonhos transformassem realidade, pelo amor incondicional, dedicação, carinho e incentivo em todos os momentos.

A minha irmã Viviane e meu cunhado Odair, pela hospedagem, pelas caronas de fim de semana, pelo zelo, carinho e amizade, por acreditarem em mim sempre!

Ao meu irmão Antônio Augusto, meu grande amigo, companheiro, pelas brincadeiras, conversas, sempre me trazendo alegrias e proporcionando momentos inesquecíveis. A minha família (Vó, tios, tias, primos e primas) pelo incentivo incansável, pelas orações e torcida.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, pelos ensinamentos e momentos compartilhados durante o mestrado.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para minha formação e me auxiliaram na realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

JULIANA DE CÁSSIA GOMES ROCHA, filha de Maria José Gomes Rocha e Antonio Luiz da Rocha, nasceu em 05 de maio de 1987, em Viçosa – MG.

Iniciou seus estudos na Escola de 1º grau Manoel Firmino Lopes Valente em 1993, Zona rural do município de Canaã-MG, onde cursou até a 4ª série do ensino fundamental, transferindo-se para Escola Estadual Maria Aparecida David, localizada na cidade de Canaã-MG, onde concluiu o ensino médio em dezembro de 2004.

Em maio de 2006, ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, no curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios. Em julho de 2010 graduou-se Bacharel em Ciência e Tecnologia de Laticínios pela UFRV.

Em agosto do mesmo ano, iniciou seus estudos no curso de pós-graduação como aluno não vinculado no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa–MG, onde em março de 2011 tornou-se estudante regular, submetendo a defesa da dissertação em março de 2013.

SÚMARIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
1. Soro de Leite	3
1.1 Proteínas do Soro de Leite	4
1.1.1 β -lactoglobulina	6
1.1.2 α - lactoalbumina.....	7
1.1.3 Outras Proteínas	8
2. Propriedades Funcionais e Nutricionais das Proteínas do Soro	11
3. Processo de Separação por Membranas	12
4. Alimentos Funcionais.....	15
5. Antocianinas.....	17
6. Luteína.....	20
OBJETIVOS.....	23
1. Objetivo Geral	23
1.1 Objetivos Específicos	23
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
2.1 Planejamento Experimental	24
2.2 Matéria-prima	25
2.3 Extração das Antocianinas das Cascas de Jabuticaba.....	25
2.4 Processo de Separação por Membranas.....	26
2.4.1 Microfiltração do Soro	26
2.4.2 Ultrafiltração do Soro.....	26
2.5 Elaboração das Formulações	26
2.6 Caracterização do Extrato das Cascas de Jabuticaba.....	29
2.6.1 pH.....	29
2.6.2 Acidez	29
2.6.3 Sólidos Solúveis Totais.....	29
2.6.4 Determinação da Cor	29
2.6.5 Antocianinas Totais.....	30
2.6.6 Fenólicos Totais	30
2.6.7 Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	30
2.7 Determinações Físico-químicas dos Formulados	31
2.7.1 Teor de Proteínas	31
2.8 Extração e Quantificação das Antocianinas e Fenólicos Totais dos Formulados	31
2.9 Extração e Quantificação da Luteína dos Formulados	31

2.10	Determinação da Atividade Antioxidante dos Formulados	32
2.11	Análises Microbiológicas	32
2.11.1	Análises Microbiológicas das Bebidas Proteicas	32
2.11.2	Avaliação da Contaminação do Ar da Fábrica.....	33
2.12	Viscosidade	33
2.13	Aceitabilidade Sensorial	34
2.13.1	Impressão Global	34
2.13.2	Cor.....	35
2.14	Estudo de Estabilidade.....	36
2.15	Análises Estatísticas.....	37
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
3.1	Resultados das Análises de Caracterização do Extrato das Cascas de Jabuticaba	38
3.2	Resultados da Caracterização Físico-química dos Formulados.....	41
3.2.1	Composição Química.....	41
3.2.2	Características Colorimétricas	46
3.3	Características Bioativas.....	50
3.4	Análises Microbiológicas	55
3.5	Viscosidade	58
3.6	Aceitabilidade Sensorial	59
3.6.1	Impressão Global	59
3.6.2	Cor.....	66
3.7	Estudo de Estabilidade.....	73
3.7.1	Antocianinas Totais.....	74
3.7.2	Carotenoides Totais.....	75
3.7.3	Atividade Antioxidante	76
3.7.4	Acidez	78
3.7.5	pH.....	79
3.7.6	Sólidos Solúveis Totais	81
3.7.7	Cor.....	81
4.	CONCLUSÃO	89
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
	ANEXOS	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do leite e soro doce.....	4
Tabela 2 – Composição das proteínas do leite bovino.....	5
Tabela 3 – Codificações das formulações, tipo de corante, tipo de soro e teor de proteínas das bebidas.....	24
Tabela 4 – Concentração dos ingredientes adicionados às formulações.....	27
Tabela 5 – Resultados referentes às análises físico-químicas e bioativas do extrato de cascas de jabuticaba.	38
Tabela 6 – Resultados da composição química das bebidas proteicas formuladas com extrato de casca de jabuticaba e luteína.	42
Tabela 7 - Modelagem estatística do efeito do teor de proteínas sobre os valores de acidez e sólidos solúveis totais das formulações adicionadas de extrato de antocianinas e luteína.	43
Tabela 8 – Valores médios das coordenadas colorimétricas dos formulados proteicos adicionados de extrato de antocianinas.	46
Tabela 9 – Valores médios dos parâmetros colorimétricos dos formulados proteicos adicionados de luteína.	48
Tabela 10 – Modelagem estatística do efeito do teor de proteínas sobre os parâmetros b^* , c^* e h^* dos formulados proteicos adicionados de luteína.	49
Tabela 11 – Valores médios dos teores de antocianinas totais, fenólicos totais e atividade antioxidante das formulações adicionadas de extrato de antocianinas.....	50
Tabela 12 – Modelagem estatística do efeito do teor de proteínas sobre os teores de fenólicos totais e atividade antioxidante das formulações adicionadas de extrato de antocianinas.....	51
Tabela 13 – Valores médios dos teores de carotenoides totais e atividade antioxidante das formulações adicionadas de luteína.	52
Tabela 14 – Análise microbiológica das bebidas formuladas com extrato de antocianinas.....	55
Tabela 15 - Análise microbiológica das bebidas formuladas com luteína.....	57
Tabela 16 – Médias dos julgamentos para impressão global das bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas.	59
Tabela 17 – Médias dos julgamentos para impressão global das bebidas proteicas adicionadas de luteína.	63

Tabela 18 - Médias dos julgamentos para o atributo cor das bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas.	66
Tabela 19 - Médias dos julgamentos para o atributo cor das bebidas proteicas adicionadas de luteína.	69
Tabela 20 - Variação das coordenadas cor das bebidas proteicas formuladas com extrato de antocianinas de cascas de jabuticaba (F3) e luteína (F6), durante 60 dias de armazenamento.	83
Tabela 21 – Modelagem estatística do efeito do tempo sobre os valores de ΔE^* das formulações F3 e F6.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Filtração por Membranas: Microfiltração (MF), Ultrafiltração (UF), Nanofiltração (NF), Osmose Reversa (RO)	14
Figura 2 – Estrutura química de uma antocianina, defilnidina-3-malonilglicosídeo-5-glicosídeo.	18
Figura 3 – Estrutura química da luteína	21
Figura 4 – Fluxograma de processamento das bebidas proteicas.	28
Figura 5 – Ficha de avaliação usada para o teste de impressão global.	35
Figura 6 – Ficha de avaliação usada para o teste de cor.	36
Figura 7 – Espectro de absorção da luteína extraída dos formulados, obtido no espectrofotômetro Shimadzu UV-Visível 1601PC.	54
Figura 8 - Mapa de preferência interno em relação à impressão global para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas.....	61
Figura 9 - Mapa de preferência interno em relação à impressão global para as bebidas proteicas adicionadas de luteína.....	64
Figura 10 - Mapa de preferência interno em relação ao atributo cor para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas.....	68
Figura 11 - Mapa de preferência interno em relação ao atributo cor para as bebidas proteicas adicionadas de luteína.....	71
Figura 12 – Variação dos teores de antocianinas totais durante o período de armazenamento da bebida proteica (F3).	74
Figura 13 – Variação dos teores de carotenoides totais (luteína) durante o período de armazenamento da bebida proteica (F6).	75
Figura 14 – Variação da atividade antioxidante durante o período de armazenamento para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas (F3) e de luteína (F6).....	77
Figura 15 – Variação da acidez titulável durante o período de armazenamento para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas (F3) e de luteína (F6)..	79
Figura 16 – Variação dos valores de pH durante o período de armazenamento para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas (F3) e de luteína (F6)..	80
Figura 17 – Variação dos valores de sólidos solúveis totais durante o período de armazenamento para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas (F3) e de luteína (F6).	81

Figura 18 - Variação dos valores da coordenada luminosidade (L^*) para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas (F3) e de luteína (F6) durante o período de armazenamento.	84
Figura 19 - Variação dos valores da saturação ou chroma (c^*) para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas (F3) e de luteína (F6) durante o período de armazenamento.	85
Figura 20 - Variação dos valores de tonalidade (h^*) para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas (F3) e de luteína (F6) durante o período de armazenamento.	86
Figura 21 - Variação dos valores da diferença global de cor (ΔE^*) para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas (F3) e de luteína (F6) durante o período de armazenamento.	87

RESUMO

ROCHA, Juliana de Cássia Gomes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. **Adição dos corantes naturais antocianinas e luteína em bebidas formuladas com proteínas de soro de leite.** Orientador: Paulo Cesar Stringheta. Coorientadores: Antônio Fernandes de Carvalho e Valéria Paula Rodrigues Minim.

A tendência atual pelo consumo de alimentos mais saudáveis, nutritivos e com funcionalidades adicionais, leva à busca de novos produtos e ingredientes que possam atender as necessidades destes consumidores. O desenvolvimento de um alimento à base de proteínas de soro de leite, ricas em aminoácidos essenciais, adicionado de antocianinas e luteína, de elevada atividade antioxidante, torna-se um importante aliado na alimentação de indivíduos que buscam saúde e bem estar. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi formular e caracterizar bebidas com diferentes teores de proteínas de soro de leite adicionadas de antocianinas e luteína; determinar o conteúdo de antocianinas totais, fenólicos totais, carotenoides totais e capacidade antioxidante; bem como a aceitabilidade sensorial e estabilidade das formulações. As bebidas foram caracterizadas quanto aos parâmetros físico-químicos (pH, acidez titulável, SST, teor de proteínas e cor) e microbiológicos. Foram desenvolvidas bebidas com 0,5%, 2,0%, 4,0% e 6,0% de proteínas de soro de leite, cada qual, adicionadas de luteína e antocianinas. As análises físico-químicas indicaram que a concentração de proteína alterou significativamente ($p < 0,05$) os valores de acidez e os teores de sólidos solúveis totais das bebidas. O mesmo foi observado para fenólicos totais e atividade antioxidante dos formulados adicionados de extrato de antocianinas. Pelas coordenadas colorimétricas, as bebidas formuladas com extratos de antocianinas apresentaram tonalidades de cores claras (altos valores de L^*), que tendiam ao vermelho (pequeno ângulo h^*), ou seja, proximidade do eixo a^* , característico da presença de antocianinas, enquanto que para as bebidas adicionadas de luteína, apresentaram maiores valores do ângulo h^* , indicando maior proximidade do eixo b^* , tendendo a coloração amarela. Os valores de C^* foram elevados, indicando coloração amarela intensa para as bebidas com luteína. Não houve alteração significativa ($p > 0,05$) no teor de antocianinas e carotenoides das bebidas em função da concentração de proteínas. A atividade antioxidante dos formulados adicionados de extrato de jabuticaba foi superior aos adicionados de luteína. Os valores das contagens microbiológicas mostraram que todas as formulações são consideradas seguras para o consumo. As formulações F1, F2 e F3,

foram igualmente aceitas quanto à impressão global, enquanto que para o atributo cor as formulações mais aceitas foram F2 e F3. Para as bebidas adicionadas de luteína a formulação mais aceita quanto à impressão global foi a F6 e para o atributo cor foram as formulações F6 e F7. Com base nos resultados da aceitabilidade sensorial, foram escolhidas as formulações F3 e F6 para realizar o estudo de estabilidade. O estudo da estabilidade das bebidas mostrou que não houve alteração significativa ($p > 0,05$) do teor dos compostos bioativos, das características físico-químicas e colorimétricas. Apenas para os valores de ΔE^* , houve alteração significativa ($p < 0,05$), indicando diferença da coloração entre as formulações no tempo 0 (inicial) e tempo 60 (final). Verificou-se que a condição de refrigeração (5 °C) mostrou ser eficiente no armazenamento destas bebidas, contribuindo para manter as características físico-químicas, bioativas e atividade antioxidante. É possível a utilização de corantes naturais na formulação de bebidas proteicas, pois além de manterem os parâmetros físico-químicos, bioativos e microbiológicos, apresentou padrão de cor e sabor bem aceitos pelos consumidores, oferecendo-lhes um produto diferenciado, com alto valor agregado, além de trazer saúde e bem estar contribuindo para boa forma física.

ABSTRACT

ROCHA, Juliana de Cássia Gomes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2013. **Addition of natural colorantes anthocyanins and lutein in drinks made with whey protein.** Adviser: Paulo Cesar Stringheta. Co-advisers: Antônio Fernandes de Carvalho and Valéria Paula Rodrigues Minim.

The current trend by consuming more healthy foods, nutritious and with additional features takes to the search for new products and ingredients that they can meet the needs of these consumers. The development of a food based on protein whey, rich in essential amino acids, added of anthocyanins and lutein, with high antioxidant activity; it becomes an important ally in the feeding of individuals searching for health and wellness. In this context, the objective of this study was to formulate and characterize drinks with different levels of whey proteins added lutein and anthocyanins; determine the content of total anthocyanins, total phenolics, total carotenoids and antioxidant capacity, as well as the sensory acceptability and stability of formulations. The drinks was characterized as the physico-chemical parameters (pH, titratable acidity, TSS, protein content and color) and microbiological. Drinks was developed with 0.5%, 2.0%, 4.0% and 6.0% of whey proteins, each, added lutein and anthocyanins. The physico-chemical analyzes indicated that the protein concentration significantly altered ($p < 0.05$) values of acidity and total soluble solids of the drinks. The same was observed for total phenolics and antioxidant activity of the formulated added extract of anthocyanins. Through the colorimetric coordinates, beverages formulated with extracts of anthocyanins showed shades of light colors (high values of L^*), that tended to red (small angle h^*), in other words, the proximity of the axis a^* , characteristic of the presence of anthocyanins, while for drinks added lutein showed higher values of angle h^* indicating proximity of the b^* axis, tending to yellow. The values of C^* were high, indicating intense yellow color to drinks with lutein. There was not significant alteration ($p > 0.05$) on the anthocyanins level and carotenoids drinks depending on the protein concentration. The antioxidant activity of the formulated added of extract of jabuticaba was upper to the added of lutein. The values of microbiological counts showed that all formulations are considered safe for consumption. The formulations F1, F2 and F3 was also accepted as to global impression, while for the color formulations was more accepted F2 and F3. For the drinks with added lutein, the most accepted formulation as

to global impression was the F6 and for the color formulations were F6 and F7. Based on the results of the sensory acceptability were chosen formulations F3 and F6 to realize the stability study. The study of the stability of the drinks showed there was no significant alteration ($p > 0.05$) of the content of bioactive compounds, the physico-chemical and colorimetric. Only the values of ΔE^* , was significant change ($p < .05$), indicating the color difference between formulations at time 0 (initial) and time 60 (final). It was verified that the cooling condition (5°C) showed be efficient in storing these drinks contributing to maintain the physico-chemical and bioactive antioxidant activity. It is possible the use of natural colorants in the formulation of protein drinks because besides maintenance the physico-chemical parameters, microbiological and bioactive, presented a pattern of color and flavor well accepted by consumers, offering them a differentiated product with high value added, in addition to bringing health and wellness contributing to good physical shape.

1. INTRODUÇÃO

A busca por qualidade de vida tem estimulado a população à prática de atividade física aliada a uma alimentação saudável, uma vez que a qualidade da dieta e o estilo de vida do indivíduo estão diretamente relacionados com saúde e bem-estar. Inúmeros estudos mostram que a alimentação inadequada é a principal causa de doenças crônicas não transmissíveis como o diabetes, câncer e doenças coronarianas.

As proteínas de soro de leite têm se popularizado devido às suas propriedades biológicas e tecno-funcionais. Possuem elevado teor de aminoácidos essenciais de cadeia ramificada (isoleucina, leucina e valina). Estes aminoácidos específicos estimulam vias intracelulares associadas com a síntese de proteínas musculares (KATSANOS et al., 2006; PESCUMA et al., 2010) e pode desempenhar um papel na resposta hormonal para alimentação, como estimular a secreção de insulina (CALBET e MACLEAN, 2002; PESCUMA et al., 2010). Estas proteínas são uma excelente fonte de cálcio, que desempenha proteção contra risco de osteoporose, fratura dos ossos e outros problemas de saúde, como a obesidade. São mais bem absorvidas no organismo e atuam na síntese de proteínas musculares, sendo muito utilizadas por atletas e praticantes de atividades físicas, para proporcionar um aumento no ganho de massa muscular.

As características apresentadas por estas proteínas tem levado ao aumento de seu emprego como ingrediente alimentar em muitos produtos e motivado mais pesquisas sobre o desenvolvimento de novas técnicas para a sua concentração, separação e fracionamento.

Alguns ingredientes têm contribuído para conferir funcionalidade aos alimentos como, por exemplo, as substâncias bioativas. Os compostos bioativos são constituintes extranutricionais que ocorrem tipicamente em pequenas quantidades nos alimentos e podem desempenhar diversos papéis em benefício à saúde (CARRATU e SANZINI, 2005). Os corantes naturais, antocianinas e luteína, são compostos bioativos encontrados na natureza, que além da função de colorir possuem características biológicas específicas que lhes conferem uma excelente atividade antioxidante. A atividade antioxidante por sua vez, é a capacidade que certas substâncias têm de reduzir ou bloquear a velocidade das reações de oxidação induzidas por radicais livres através de mecanismos distintos, contribuindo para a prevenção de uma série de doenças que são causadas pelo estresse oxidativo do organismo.

As antocianinas pertencem à classe dos flavonoides do grupo dos compostos fenólicos, possuem um espectro de cor que vai do vermelho ao azul, apresentando-se também como uma mistura de ambas as cores, resultando em tons de púrpura (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009). Enquanto a luteína pertence ao grupo dos carotenoides, à classe das xantofilas, não possuem atividade pró-vitáminica, entretanto, são substâncias ativas contra a degeneração macular relacionada à idade e a catarata. Estudos realizados há décadas demonstram que os carotenoides com nove ou mais duplas ligações conjugadas possuem alto potencial antioxidante, uma função biológica que é independente de qualquer atividade provitamina A (FAULKES e SOUTHON, 1997).

A potencialidade observada nos compostos bioativos para utilizá-los como ingrediente surge como um aliado para o desenvolvimento de novos produtos, com apelo funcional, enquanto que as proteínas de soro de leite apresentam-se como uma alternativa para o aumento da ingestão de proteínas de alta qualidade tanto para praticantes de atividade física como para consumidores em geral.

Diante desse contexto, o desenvolvimento de uma bebida constituída de proteínas de soro de leite adicionada de corantes naturais torna-se um excelente aliado para alimentação de indivíduos que buscam por qualidade de vida, além de atender as necessidades nutricionais específicas.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Soro de Leite

O soro do leite constitui-se o líquido remanescente após a precipitação e remoção da caseína do leite durante a fabricação de queijo. É classificado como soro doce e ácido, sendo distinguidos pela indústria de laticínios de acordo com seu pH. O soro doce provém da coagulação enzimática do leite, que tem a propriedade de coagular a caseína, possui pH entre 6,3 e 6,6. Já o soro ácido, com pH entre 4,3 a 4,6, provém da coagulação ácida do leite para a fabricação de queijos como camembert ou petit suisse (GIRALDO-ZUÑIGA et al., 2004). Até o final dos anos sessenta, o soro era utilizado principalmente para alimentação de animais como porcos ou mesmo espalhado pelo campo ou direcionado para o sistema de esgoto com drásticas consequências ambientais (COIMBRA e TEIXEIRA, 2009).

O soro é considerado um coproduto de grande importância na indústria de laticínios devido ao alto volume produzido e à sua composição nutricional, a produção de 1kg de queijo rende de 8 a 9 kg de soro. Contém mais da metade dos sólidos presentes no leite incluindo as proteínas globulares que representam 20% do total das proteínas presente no leite (REKTOR e VATAI, 2004; BALDASSO et al., 2011a).

Dentre os compostos que constituem o soro estão lactose, gordura, sais minerais e proteínas globulares. Em sua composição o soro possui a mistura de diversas proteínas, atribuindo características tecno-funcionais e nutricionais importantes aos seus produtos, tornando-se de grande potencial para utilização. As principais proteínas presentes são: a β -lactoglobulina, a α -lactalbumina, proteose-peptona, imunoglobulinas, albumina do soro bovino (BSA) e proteínas em menores quantidades como lactoferrina, lactolína, glicoproteína, transferrina de sangue e enzimas (HARPER, 1994; SILVA et al., 2004). O soro possui também boas concentrações de cálcio, sódio, magnésio, potássio e fósforo, além de ser rico em vitaminas hidrossolúveis (MACHADO et al., 2002).

Os componentes constituintes do soro de leite e suas respectivas concentrações são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição do leite e soro doce

Constituinte	Leite (% m/m)	Varição (% m/m)	Soro Doce (% m/m)	Varição (% m/m)
Água	87,1	83,5 - 88,7	93,88	93,0 - 94,0
Sólidos não gordurosos	8,9	7,9 - 10	6,12	6,2 - 7,0
Lactose	4,6	3,8 - 5,3	5,0	4,6 - 5,0
Gordura	3,6	2,5 - 5,5	0,05	0,03 - 0,07
Proteínas	3,4	2,3 - 4,4	0,81	0,5 - 0,9
Caseínas	2,6	1,7 - 3,5	-	-
Minerais	0,7	0,57 - 0,83	0,66	0,65 - 0,67
Ácidos Orgânicos	0,17	0,12 - 0,21	-	-
Diversos	0,15	-	-	-

Fonte: Walstra et al., 2006; Silva e Treichel, 2006.

1.1 Proteínas do Soro de Leite

O leite é um produto rico em proteínas que possuem características funcionais, devido ao padrão de aminoácidos presentes em sua estrutura. Os aminoácidos podem ser classificados em essenciais, aqueles que não são sintetizados pelo organismo e devem ser obtidos através da dieta e não essenciais, aqueles que podem ser sintetizados pelo organismo obtidos através da dieta (ANTUNES, 2003).

A proteína mais abundante no leite são as caseínas, que consiste em várias frações (alfa s1, alfa s2, beta, kappa), se apresentam em uma partícula coloidal conhecida como micela de caseína. O segundo grupo de proteínas são as proteínas do soro, que aparecem em menor concentração, estão na forma globular, são solúveis em água e sensíveis ao calor (GOFF & HILL, 1993; RAIKOS, 2010).

As proteínas exercem inúmeras funções biológicas sobre o organismo humano. Dentre elas destacam-se reparação celular, construção e reparação dos ossos, provem energia e regula uma série de processos metabólicos (ANTUNES, 2003).

As proteínas do soro são um grupo de proteínas recuperadas da fabricação de queijo, sua funcionalidade e utilização como ingredientes alimentares têm sido estudados extensivamente (BRYANT e MCCLEMENTS, 1998; FOEGEDING et al., 2002; ZHANG e ZHONG, 2010). O componente mais valioso do soro são as proteínas, mas em quantidade reduzida, sendo necessárias etapas de concentração para realçar suas propriedades funcionais, tais como solubilidade, emulsificação e formação de espuma (PAGNO et al., 2009).

As proteínas do soro de leite são proteínas globulares, sendo as mais abundantes a β -lactoglobulina e α -lactoalbumina que representam, respectivamente, cerca de 50% e 20% do total das proteínas do soro (SCHOKKER et al., 2000). A β -lactoglobulina apresenta-se em uma concentração de aproximadamente $0,3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, a α -lactoalbumina em menor concentração, aproximadamente $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, a albumina sérica $0,04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e imunoglobulina $0,08 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (ADAMS et al., 2006).

A composição das proteínas presente no leite bovino é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição das proteínas do leite bovino

Proteínas do Leite	g/L	% de Proteína
Total de proteínas	33	100
Total de caseínas	26	79,5
α_{S1}	10	30,6
α_{S2}	2,6	8,0
β	9,3	28,4
κ	3,3	10,1
Total de proteínas do soro	6,3	19,3
α -Lactoalbumina	1,2	3,7
β -Lactoglobulina	3,2	9,8
Albumina de soro bovino	0,4	1,2
Imunoglobulinas	0,7	2,1
Proteases peptonas	0,8	2,4

Fonte: Walstra e Jennes, 1984; Raikos, 2010.

As proteínas do soro são utilizadas para aumentar o valor nutricional de produtos alimentícios enriquecidos, como bebidas e sopas, e como suplemento alimentício para pessoas que demandam uma maior ingestão diária de proteínas, como atletas, idosos e crianças (CHILDS et al., 2007).

As proteínas utilizadas como ingredientes, normalmente se encontram na forma de um concentrado, em que o teor de proteína pode chegar até 80% ou na forma de um isolado, em que o teor de proteína é acima de 90%. O concentrado proteico de soro é designado como WPC (*whey protein concentrate*) seguido do número que representa a porcentagem de proteínas presente. Como exemplo; WPC80 é um concentrado proteico de soro com um teor de proteína de 80% (m/m). O isolado proteico de soro é

representado pela sigla WPI (*Whey protein isolate*), sendo que a porcentagem mínima de proteína não deve ser inferior a 90% (m/m) (CHILDS et al., 2007).

As proteínas de soro possuem inúmeros benefícios nutricionais uma vez que contém aminoácidos essenciais que as tornam uma fonte completa de proteínas. A combinação de proteínas, aminoácidos de cadeia ramificada e minerais presentes nas proteínas de soro de leite podem ajudar a promover a massa corporal magra e limites nos depósitos lipídicos no tecido adiposo, devido a sua fácil absorção no organismo (HA e ZEMEL, 2003).

Dentre todas as proteínas presentes no soro, serão abordados nos próximos itens as que são mais abundantes.

1.1.1 β -lactoglobulina

A β -lactoglobulina é uma proteína globular com uma massa molar de 18,3 kDa e existe principalmente como um dímero em pH neutro. A β -lactoglobulina nativa possui duas ligações dissulfeto e um grupo tiol livre, que está na parte interior da estrutura proteica (SCHOKKER et al., 2000).

A molécula da β -lactoglobulina é composta por 162 aminoácidos, com inúmeras variantes genéticas, sendo que as mais abundantes são a A e B que diferem em duas posições de aminoácidos: Asp64 (aspartato) e Val118 (valina) são substituídos por Gly (glicina) e Ala (alanina), respectivamente. A estrutura dessa proteína depende do pH do meio, sendo que o pH do seu ponto isoelétrico é 5,2 (ANTUNES, 2003). A β -lactoglobulina possui uma estrutura que contribui para que ela seja uma proteína bastante estável em solução, atuando em uma faixa muito ampla de pH, podendo formar diferentes associações (TAULIER e CHALIKIAN, 2001; SGARBIERI, 2005).

É uma proteína que é facilmente desnaturada dependendo da temperatura, sendo considerada termossensível. Os efeitos produzidos pela ação da temperatura são vários, dentre eles destacam-se a perda de solubilidade e a exposição de algumas regiões da molécula que podem interagir com outros componentes de sistemas complexos. Algumas modificações da conformação da estrutura da proteína podem ser reversíveis em torno de 50 °C e irreversíveis em torno de 65-70 °C (IAMETTI et al., 1996; SGARBIERI, 2005).

A β -lactoglobulina tem a capacidade de se ligar a uma gama de compostos, quando isolada do leite possui ácidos graxos que estão naturalmente ligados. A capacidade de ligação desta proteína aos ácidos graxos torna-lhe como um eficiente

agente emulsificador apreciado pelas indústrias de alimentos (LIANG e SUBIRADE, 2010).

Uma das propriedades importantes da β -lactoglobulina é a capacidade de se ligar a compostos hidrofóbicos e anfifílicos, atuando sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas de alguns compostos (LIANG e SUBIRADE, 2010).

Liang et al. (2008) demonstraram em seus estudos que a β -lactoglobulina pode formar um complexo com o resveratrol, sem ter efeitos sobre a estrutura secundária da proteína, a complexação proporciona um aumento significativo da solubilidade do resveratrol em solução aquosa e melhora sua fotoestabilidade.

Hattori et al. (1995) verificaram em seus estudos o efeito protetor da β -lactoglobulina sobre a β -ionona (composto responsável pela atividade pró-vitâmica A de alguns carotenoides), foram realizados complexos do retinol e β -caroteno com a proteína e avaliada a degradação por oxidação, aquecimento e radiação, verificou-se que a β -lactoglobulina tem um efeito protetor sobre a β -ionona de compostos de degradação por oxidação, aquecimento e radiação.

1.1.2 α -lactoalbumina

A segunda proteína mais abundante no soro é α -lactoalbumina, que compreende cerca de 2% da proteína total do leite e 15-25% das proteínas do soro, sendo que a de maior concentração é da β -lactoglobulina (BALDASSO et al., 2011b). Possui 123 resíduos de aminoácidos com massa molar de aproximadamente 14 kDa. A α -lactoalbumina é uma proteína globular compacta e se manifesta como monômero no pH natural do leite, pH 6,6 (ANTUNES, 2003).

O aminoácido que se apresenta em maior concentração é o triptofano, um aminoácido essencial, que tem efeitos benéficos na diminuição do estresse, é também rica em lisina, leucina, treolina e cisteína. A proteína é uma molécula globular, desnatura-se a 65,2 °C, na maioria das vezes essa desnaturação é reversível com o resfriamento (ANTUNES, 2003).

A estrutura da α -lactoalbumina é estabilizada por quatro ligações dissulfeto. Sua estrutura primária apresenta algumas semelhanças de sequências de aminoácidos com a lisozima do ovo de galinha. O íon cálcio na α -lactoalbumina tem um papel estrutural sendo requerido para desdobraimento e formação da ligação dissulfeto nativa da proteína desnaturada (DAMODARAN et al., 2010).

Alguns estudos mostraram que a α -lactoalbumina em solução sofre desnaturação reversível a 64 °C e irreversível quando aquecida em mistura com β -lactoglobulina e albumina de soro bovina (BSA). Com um tratamento térmico severo, ocorre a ruptura das ligações dissulfeto, assim os grupos sulfidrilas livres reagem com grupos semelhantes da β -lactoglobulina, formando ligações intermoleculares (SGARBIERI, 2005).

Uma das aplicações importantes da α -lactoalbumina é na formulação de alimentos infantis, uma vez que é uma proteína que também é predominante no leite humano. Embora algumas formulações tenham maior concentração de β -lactoglobulina do que α -lactoalbumina, estudos estão sendo realizados para que as formulações sejam feitas com uma maior concentração de α -lactoalbumina, aproximando mais da composição do leite humano. Essa proteína possui uma concentração relativamente elevada de triptofano e outros aminoácidos essenciais em comparação com o leite de vaca integral. O triptofano é o precursor do neurotransmissor serotonina, responsável pela regulação de muitos efeitos neurocomportamentais (LIEN, 2003).

Uma função biológica importante da α -lactoalbumina é atuar como coenzima na síntese de lactose. A α -lactoalbumina altera a afinidade da galactosiltransferase para a glicose, assim sendo, a lactose é produzida mais eficientemente. A enzima lactose sintetase é necessária para a produção de lactose e subsequente movimento da água nas vesículas secretoras mamárias, atuando no controle da lactação e secreção do leite. A lactose é considerada o principal regulador osmótico que influencia no volume de leite. Assim há um interesse na produção de leite rico em α -lactoalbumina, por ser precursora da lactose, quanto mais lactose maior o volume de leite produzido (COLMAN, 1996).

1.1.3 Outras Proteínas

As demais frações proteicas que compõe o soro de leite são albumina de soro bovino (BSA), as imunoglobulinas (Ig), lactoferrina, lactoperoxidase, glicomacropéptido (GMP) e proteases peptonas, que são consideradas proteínas minoritárias por estarem presentes em pequena concentração (BALDASSO, 2008).

A albumina de soro bovino (BSA) é a proteína que está presente no plasma sanguíneo e serve como depósito, assim como transporte de proteína para outros compostos. Sua molécula possui uma massa molar de 66 kDa, possui uma única cadeia polipeptídica contendo cerca de 580 aminoácidos. Algumas mudanças conformacionais ocorrem em sua estrutura de acordo com o pH do meio, na faixa de 2,80 a 4,40 as

mudanças conformacionais são reversíveis. A estrutura secundária da albumina bovina contém muitos resíduos de cistina e estes são helicoidais em grande parte da cadeia. Possui alta estabilidade e solubilidade devido à capacidade de isolamento de outros compostos. É a principal proteína que contribui para a pressão coloidal osmótica do sangue (NAKAMURA et al., 1997; JR et al., 2006).

As imunoglobulinas (Igs) são proteínas de alta massa molar, sua estrutura básica é semelhante entre todas suas classes, quatro das cinco classes das imunoglobulinas estão presentes no leite bovino IgA, IgE, IgG e IgM. A massa molar dessas proteínas variam de 150-1000 kDa. A molécula de IgG bovina ocorre predominantemente em duas subclasses: IgG1 e IgG2, com IgG1 representando mais de 90%. As imunoglobulinas predominante na maioria dos outros leites de mamíferos, incluindo o leite humano são IgA, IgG1 e IgG2 que são monômeros com massa molar de aproximadamente 150 kDa, IgA ocorre como um monômero ou um dímero com massa molar de aproximadamente 385 kDa, enquanto IgM é composto por cinco monômeros de massa molar de aproximadamente de 900 kDa (ELFSTRAND et al., 2002).

As imunoglobulinas exercem funções importantes sobre o recém-nascido, devido à elevada concentração das proteínas de soro no colostro. Elas provêm imunidade para o filhote através do colostro, esta proteção ocorre até que o animal seja adulto o bastante para sintetizar seus próprios anticorpos (SGARBIERI, 2004; BALDASSO, 2008).

A lactoferrina é uma glicoproteína de 80 kDa, que liga-se com o ferro, sua concentração é relativamente baixa e varia com a estação de ordenha, estando na faixa de 2-40 mg·L⁻¹. No leite humano a concentração de lactoferrina é bem maior, na faixa de 1000-3000 mg·L⁻¹. Esta proteína isolada do soro de leite é utilizada em fórmulas para lactentes, sendo realizada uma formulação semelhante ao do leite humano (WAKABAYASHI et al., 2006; SAUFI e FEE, 2011). Muitos estudos são realizados analisando os efeitos benéficos da lactoferrina para a saúde humana. Esta fração proteica pode desempenhar um papel de defesa e apresentar uma variada gama de atividades biológicas, incluindo as atividades antimicrobiana, antiviral e antioxidante (BAVEYE et al., 1999 ; CHIERICI, 2001; WAKABAYASHI et al., 2006).

Lactoperoxidase é uma glicoproteína contendo 608 aminoácidos dando-lhe uma massa molar de aproximadamente 78 kDa. Exerce atividade bacteriostática e bacteriocina, contribuindo para o sistema de defesa do hospedeiro. Para exercer a função antimicrobiana a lactoperoxidase necessita da presença de peróxido de

hidrogênio e tiocianato (BOOTS e FLORIS, 2006). No leite age como um inibidor de bactérias, particularmente as patogênicas *Salmonella* e *Streptococcus*, na presença de peróxido e tiocianato, que estão presentes no leite (SGARBIERI, 2005). A lactoperoxidase tem a capacidade de degradar o peróxido de hidrogênio, esta propriedade pode ser usada como um indicador de processo de pasteurização do leite, pois sua atividade deve permanecer, em boa parte, após pasteurização adequada do leite (SGARBIERI, 2005; TAYEFI-NASRABADI et al., 2011).

O glicomacropéptido (GMP) possui uma massa molar de aproximadamente 6,7 kDa, é considerado um péptido resistente ao calor assim como à algumas mudanças de pH. Muitos autores não o consideram como um péptido do soro, na verdade o GMP é liberado da k-caseína pela ação do coalho durante a produção de queijo. O soro de leite obtido por coagulação enzimática contém o GMP, enquanto que o soro ácido não contém este péptido. O GMP corresponde de 15 a 25% do total das proteínas do soro (ABD EL-SALAM et al., 1996).

Para finalizar a revisão das frações proteicas do soro destacam-se as proteases peptonas (PPs), que são uma mistura complexa de glicoproteínas, fosfoproteínas, e péptidos. É uma fração termoestável e solúvel em ácido, pode ser separado de outras proteínas do leite por tratamento térmico e ajuste do pH para 4,6 (ANDREWS e ALICHANIDIS, 1983; INNOCENTE et al., 2011b). Seus componentes podem ser divididos em PP3, PP5 e PP8 (INNOCENTE et al., 2011a). Estudos demonstraram que as proteases peptonas obtidas a partir do leite de vaca tem uma boa atividade emulsificante. No sistema de emulsão óleo em água, a fração total de PPs realiza função emulsificante levando à redução da tensão interfacial. Isto implica que elas podem ser utilizadas como ingrediente funcional em diferentes produtos que exigem a presença de uma emulsão ou espuma estável (INNOCENTE et al., 1998). Com a possibilidade da utilização dessa fração como ingrediente na indústria de alimentos, leva a um aumento na demanda pela sua extração. Portanto surge a necessidade de processos de extração a partir de uma matéria-prima que é um coproduto da produção de queijo, que sejam mais vantajosos e principalmente economicamente viáveis (INNOCENTE et al., 2011a).

2. Propriedades Funcionais e Nutricionais das Proteínas do Soro

As proteínas concentradas ou isoladas estão sendo cada vez mais estudadas como parte de ingredientes para produtos alimentícios, mas em maior intensidade os estudos estão sendo direcionados para o apelo funcional que estas proteínas exercem sobre o organismo humano. As proteínas concentradas estão sendo utilizados para fortificar produtos alimentícios e produzir uma variedade de lanches, sopas, bebidas e cremes para refeição ou como substituição de suplementação proteica para grupos com tal exigência como os idosos, esportistas, vegetarianos ou pacientes com câncer (TARREGA et al., 2012).

Madureira et al. (2007) revisando estudos sobre as inúmeras funções biológicas das proteínas do soro, destacaram as propriedades antimicrobianas e antiviral, modulação do sistema imune e atividade anticarcinogênica. Dentre as propriedades destacam-se a importância dessas proteínas na regulação do sistema imune. As soro proteínas são ricas em aminoácidos como a cisteína, glutamato e glicina que são parte da estrutura primária dos seus peptídeos, estes contribuem para a produção de glutathione, um componente importante encontrado naturalmente em todas as células dos mamíferos. A glutathione atua na defesa do organismo contra o estresse oxidativo da célula, prevenindo a uma série de doenças, o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio durante a injúria celular resulta no consumo desse componente carreador endógeno. O concentrado proteico de soro (WPC) é uma importante fonte de cisteína, sendo eficaz para a reposição de glutathione durante os estados de imunodeficiência, como na prevenção do câncer em animais e melhoria das funções imune do fígado.

As proteínas do soro oferecem uma importante contribuição para a melhoria da força muscular e uma maior tendência de redução de quebra dos ossos. Estas características estão diretamente relacionadas com seu perfil de aminoácidos, devido à composição geral serem muito semelhante à do músculo esquelético, assim as proteínas do soro são consideradas um importante suplemento anabólico. As vantagens dessas proteínas em relação ao anabolismo muscular são devido a sua rápida absorção no organismo, juntamente com a abundância de leucina necessário para iniciar a síntese bem como a composição de aminoácidos, que fornece substratos para a síntese de proteínas (HA & ZEMEL, 2003).

Com relação aos padrões de aminoácidos presentes nas proteínas do soro, estas apresentam todos os aminoácidos essenciais em excesso em relação às recomendações

propostas pela Organização Mundial da Saúde, exceto para os aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina) que não aparecem em excesso, mas atendem às recomendações para todas as idades. Apresentam elevadas concentrações dos aminoácidos triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina (SGARBIERI, 2004).

Pagno et al. (2009) obtiveram concentrado proteico de soro de leite e caracterizaram suas propriedades funcionais tecnológicas. Tais proteínas possuem alto valor nutricional, além de relevantes propriedades tecno-funcionais, tais como capacidade de emulsificação, capacidade em manter estável a emulsão e principalmente solubilidade. Estas propriedades tecnológicas foram avaliadas após a obtenção do concentrado proteico de soro por ultrafiltração e diafiltração. Ao final do experimento foi observado que as propriedades tecnológicas das proteínas foram mantidas, uma vez que não utilizou altas temperaturas, sendo que o processo de separação utilizado mostrou-se eficiente na preservação destas propriedades funcionais.

3. Processo de Separação por Membranas

O processo de separação por membranas é uma tecnologia utilizada por muitas indústrias para a concentração e purificação de alguns compostos. A membrana age como uma barreira seletiva que retém os compostos maiores e permeia os menores de acordo com o diâmetro da membrana e massa molar de cada composto (HABERT et al., 2006).

A indústria de laticínios tem sido particularmente uma das áreas de maior aplicação do sistema de membranas. O número de aplicações bem sucedidas desta tecnologia para o processamento de leite e derivados vem desde a década de 1970, a partir daí tornaram-se cada vez mais importantes e com novas aplicações. O desenvolvimento dessas novas aplicações muitas vezes era um resultado direto da evolução da ciência de membranas (POULIOT, 2008). Na década de 80, os estudos se concentraram na aplicação desse processo para concentração de leite para produção de alguns tipos de queijo. Esta tecnologia torna-se atraente para processamento de leite fluido, pois exige pouca energia, não utiliza tratamento térmico, preservando assim vários compostos que são perdidos durante o processo convencional (REKTOR e VATAI, 2004; CUARTAS-URIBE et al., 2009).

Estas tecnologias abrem novas perspectivas para tirar proveito da diversidade das proteínas e de suas propriedades em diversos campos tais como qualidade nutricional (presença de aminoácidos essenciais e regulação através de seus

biopeptídeos derivados das principais funções fisiológicas dos seres humanos) e funcionalidade técnica (solubilidade, emulsificação, cremosidade e habilidades de formação de espuma, retenção de água, ajuste de viscosidade) (MAUBOIS et al., 2001; CORREIA et al., 2011).

São várias as razões que ocasionaram o sucesso da aplicação das tecnologias de membranas na indústria de laticínios, tais como conhecimento profundo das características bioquímicas do leite e dos coprodutos como o soro, dinamismo das equipes de pesquisa, temperatura de processamento, alta poluição ambiental que se tornou inaceitável, provocada pela descarga de soro de queijo. Em alguns países a tecnologia de membranas é uma técnica comum, sendo que a presença de um equipamento de membrana em uma indústria de laticínios é equivalente ao de uma desnatadeira (CORREIA et al., 2011).

O processo de microfiltração (MF) é utilizado como alternativa para substituir o tratamento térmico que é tradicionalmente aplicado no processamento de leite cru. Através de uma membrana de MF, pode-se separar de um leite desnatado aquecido todas as células somáticas, gordura residual e os micro-organismos. Além disso, membranas de microfiltração retêm esporos formadores de bactérias, os quais representam os principais sobreviventes à pasteurização (CORREIA et al., 2011). A membrana de microfiltração (MF) possui poros de 0,1 a 10 μm , ela retém partículas em suspensão e reduz a quantidade de bactérias e esporos presente no leite ou no soro de leite, que leva a uma vida útil mais longa do que a pasteurização. (BRANS et al., 2004; BOSCHI, 2006). Um esquema dos processos de separação por membranas é apresentado na Figura 1.

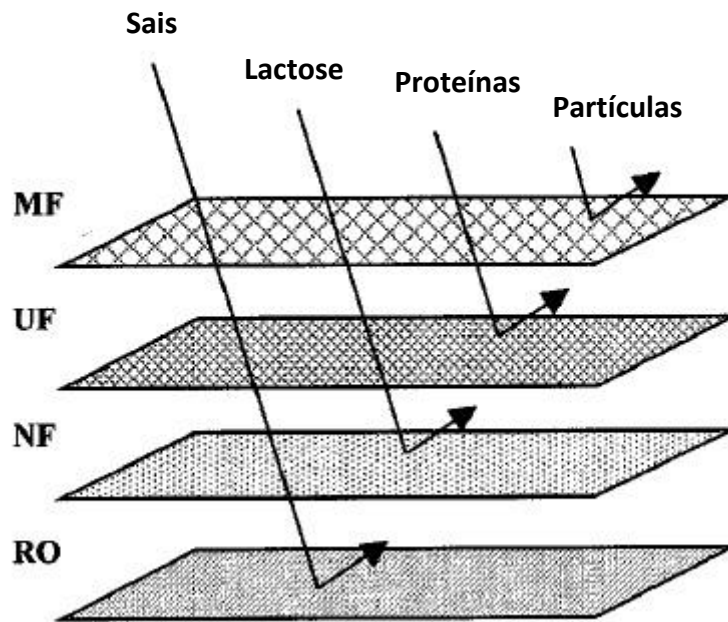


Figura 1 – Filtração por Membranas: Microfiltração (MF), Ultrafiltração (UF), Nanofiltração (NF), Osmose Reversa (RO) (SABOYA e MAUBOIS, 2000).

O processo de ultrafiltração (UF) é um método alternativo bastante atraente para as indústrias alimentícias, por ser um processo de concentração mais econômico, devido a não utilização do calor. É utilizado normalmente para reter macromoléculas, na indústria de laticínios tem sido usada na recuperação e fracionamento dos componentes do leite (BALDASSO et al., 2011a).

O uso da ultrafiltração foi extensivamente aplicado ao soro, a fim de permitir o desenvolvimento de uma ampla variedade de concentrado de proteico de soro (WPC). A fabricação de WPC de alta qualidade exige um cuidado especial dos tratamentos tecnológicos aplicados ao leite usado para fazer queijo devido à termosensibilidade das proteínas do soro (COIMBRA e TEIXEIRA, 2009).

Para as membranas de UF, o tamanho do poro é normalmente definido como "massa molar de corte" cuja unidade mais utilizada é o Dalton. Como o tamanho das proteínas é usualmente expresso em termos de sua massa molar, tornou-se usual caracterizar membranas de UF em termos de sua capacidade de reter proteínas de determinada massa molar. O termo "massa molar de corte" para membranas de UF designa o tamanho da proteína que será retida por uma membrana de determinada eficiência, dependendo da finalidade. A UF retém macromoléculas tais como proteínas ou partículas maiores que 0,001 a 0,02 μm (LEITE et al., 2006).

As moléculas maiores do soro de leite como proteína e gordura são recuperadas por ultrafiltração, as que são mantidas na membrana são chamadas de retentado, enquanto a lactose e os sais são capazes de passar através da membrana, portanto, chamados de permeados (YEE et al., 2007).

A nanofiltração (NF) realiza simultaneamente a separação e concentração dos sais principalmente espécies monovalentes como Na, K, H⁺ e Cl. O tratamento do leite e de permeados da UF por NF conduz a uma taxa de desmineralização em torno de 35% e quando há etapa de diafiltração a taxa chega a 42%. Isso gera benefícios como: redução de custos na condensação do permeado, menos depósito no evaporador final e melhorias no processo de cristalização da lactose (COIMBRA e TEIXEIRA, 2009).

Cuartas-uribe et al. (2009) descrevem o processo de diafiltração como uma técnica utilizada para aumentar as taxas de purificação dos macro e microsolutos, usando uma taxa de permeação do fluxo que seja economicamente aceitável. O processo de diafiltração envolve três etapas principais: pré-concentração, diafiltração e pós-concentração.

A osmose reversa (OR) é um processo de separação por membranas amplamente utilizado na dessalinização, no reuso e no tratamento de águas, este processo visa gerar tanto água pura que é o permeado como soluções aquosas ricas em minerais ou outras moléculas de massa molar maior, chamado de concentrado (CARVALHO et al., 2001).

Tendo em vista os processos de separação por membranas e as propriedades funcionais, fisiológicas e biológicas de cada uma das proteínas de soro de leite, há um crescente interesse no fracionamento destas proteínas, para sua aplicação nos diversos segmentos das indústrias farmacêutica, cosméticos, alimentícia e de biotecnologia.

4. Alimentos Funcionais

Uma alimentação rica em frutas e hortaliças fornece uma gama de macro e micronutrientes que são essenciais ao organismo, sendo que a maioria desses alimentos possui alguns compostos extranutricionais que exercem potente atividade biológica, comprovada cientificamente. Tais compostos são chamados de bioativos ou fitoquímicos e ocorrem tipicamente em pequenas quantidades nos alimentos. Estudos realizados com estes componentes inspirou o conceito de alimentos funcionais, que surgiu no Japão na década de 80 e era utilizado pela indústria para descrever alimentos enriquecidos com ingredientes específicos, que desempenhavam alguns benefícios à saúde humana (CARRATÙ e SANZINI, 2005).

Dada a importância de uma alimentação adequada e saudável e o papel que exerce na qualidade de vida, são grandes os esforços na área de ciência e tecnologia de alimentos, a fim de produzir alimentos capazes de promover o bem estar, a saúde e a redução do risco de doenças. Devido a isto houve o surgimento de um novo conceito de alimentos em nutrição, o de alimentos funcionais, que está relacionado à ação dos alimentos em alguns sistemas biológicos (MAIA e SANTOS, 2006).

O alimento funcional é definido como alimento que além das funções nutricionais básicas, exerça efeitos metabólicos, fisiológicos ou efeitos benéficos para a saúde, devidamente seguro para o consumo humano (BRASIL, 1999). Os alimentos funcionais contêm substâncias com atividade biológica que agem promovendo a saúde, beneficiando a nutrição, incluindo alimentos fortalecidos, enriquecidos ou realçados que têm efeitos potencialmente benéficos à saúde, quando consumidos como parte de uma dieta variada em uma base regular em níveis eficazes (HASLER, 2000).

Um alimento pode ser considerado funcional se for demonstrado que o mesmo pode afetar benéficamente uma ou mais funções alvo no corpo, além de possuir os adequados efeitos nutricionais, de maneira que seja tanto relevante para qualidade de vida quanto para a redução do risco de uma doença (ROBERFROID, 2002).

Araújo e Araújo (1999) relataram que o alimento para ser denominado funcional deve atender pelo menos um dos seguintes critérios: conter um componente alimentar que afete uma ou um número limitado de funções no corpo, ter efeitos fisiológicos ou psicológicos positivo, além do efeito nutricional tradicional. Com base nestes critérios é possível observar que nem todo alimento pode ser considerado funcional, sendo que esta função será exercida de acordo com a característica individual de cada alimento e sua ação sobre o organismo.

Segundo um relatório realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS)/ Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), os hábitos alimentares juntamente com os padrões de vida são fatores importantes, que podem ser modificados, diminuindo o risco de desenvolvimento de doenças como: doenças cardíacas, câncer, diabetes tipo 2, obesidade, doenças dentárias e osteoporose. Por este motivo a nutrição deve ser tratada dentre as políticas de saúde pública (OMS, 2003).

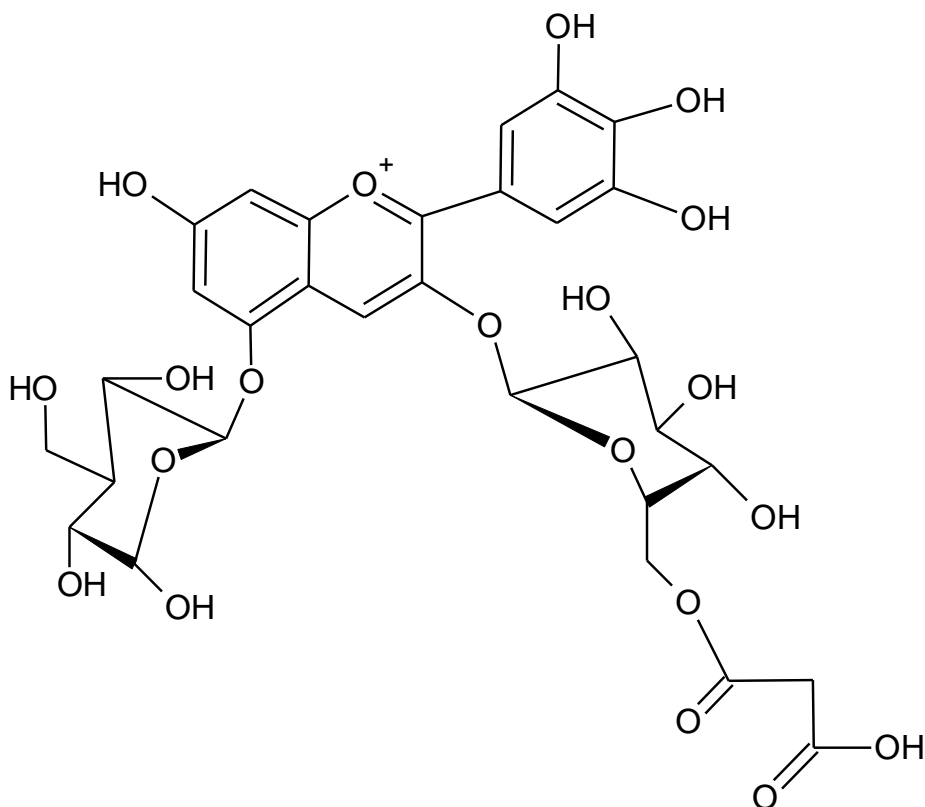
O leite e seus derivados são produtos bastante aceitos pelo mercado consumidor por estarem relacionados a hábitos alimentares ditos saudáveis, já que são fontes de minerais importantes como o cálcio, proteínas como as caseínas e proteínas do soro, e vitaminas A e E. Tendo em vista o crescimento do mercado de produtos derivados do

leite e de alimentos funcionais, os produtos lácteos se apresentam como potenciais veículos de adição de substâncias benéficas à saúde, como a luteína, seu consumo está relacionado a prevenção da DMRI (XAVIER et al., 2012) e as antocianinas, compostos fenólicos importantes, que possuem uma excelente capacidade antioxidante, contribuindo para o combate as doenças crônicas degenerativas.

5. Antocianinas

As antocianinas são pigmentos amplamente distribuídos na natureza, solúveis em água e de cor intensa, responsáveis pela coloração azul, vermelha, violeta e púrpura de muitas espécies do reino vegetal. Pertencem ao grupo dos flavonoides, compostos fenólicos caracterizados por apresentar o núcleo básico *flavilium* (cátion 2-fenilbenzopirílio), o qual consiste de dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos, que são condensados por um oxigênio. A molécula de antocianina (Figura 2) é constituída por duas ou três porções, uma aglicona (antocianidina), um grupo de açúcares e, frequentemente, um grupo de ácido orgânico (FRANCIS, 1989; JACQUES e ZAMBLAZI, 2011).

As formas antociânicas encontradas diferem quanto ao número de grupos hidroxílicos, no grau de metilação destes grupos, na natureza e no número de açúcares ligados à molécula e na posição dessas ligações (STRINGHETA e BOBBIO, 2000). A cor das antocianinas depende muito da sua estrutura química; do número e da posição dos grupos hidroxilas e metoxilas que a compõem, no entanto, o pH também é um fator importante que determina sua cor característica. Em meio extremamente ácido (pH entre 1,0 e 2,0), as antocianinas apresentam coloração intensamente avermelhada, já em meio básico as antocianinas apresentam coloração azul e em meio extremamente básico apresentam coloração amarelada (LOPES et al., 2007).



Fonte: SILVA, 2011.

Figura 2 – Estrutura química de uma antocianina, defilnidina-3-malonilglicosídeo-5-glicosídeo.

As antocianidinas livres são raramente encontradas em plantas, ocorrendo normalmente glicosiladas com açúcares que estabilizam a molécula (FRANCIS, 2000). As antocianinas podem ser glicosiladas por diferentes açúcares em diferentes posições, mas normalmente a glicosilação ocorre na posição C-3. Os açúcares; glicose, ramnose, xilose, galactose, arabinose e frutose são os açúcares mais comumente ligados às antocianidinas, ocorrendo como monoglicosídios, diglicosídios e triglicosídios glicosilados diretamente na aglicona (FRANCIS, 1989).

As fontes de antocianinas comercialmente utilizadas são as cascas de uva e repolho roxo, há inúmeras outros frutos e flores que são estudadas como fonte deste pigmento; jabuticaba e açaí, inflorescência de capim gordura, berinjela, batata-doce roxa e alguns frutos não convencionais como camu-camu (SILVA, 2011). Uma das grandes dificuldades da inserção de novas fontes desse pigmento para uso comercial é devido a sua estabilidade, há uma série de fatores que contribuem para a degradação e dificulta utilização. Dentre estes fatores destacam-se a temperatura, tempo de

armazenamento, presença de luz, oxigênio, pH, solventes, concentração do corante, estrutura, enzimas, entre outros aspectos (CAVALCANTI et al., 2011).

Estudos recentes relacionam a ingestão de frutas e hortaliças com propriedades antioxidantes e a diminuição do risco e desenvolvimento de algumas doenças crônico-degenerativas. A indústria de alimentos buscando atingir o anseio dos consumidores por produtos naturais que tenha propriedades benéficas para o organismo tem utilizado pigmentos naturais correlacionados com sua atividade antioxidante nos alimentos. O uso desses pigmentos é um fator essencial para a funcionalidade, bem como para a agregação de valor à imagem do produto final (FALCÃO et al., 2007).

Uma das propriedades de maior evidência das antocianinas é sua atividade antioxidante. Elas são incluídas na lista dos compostos naturais capazes de agir como potentes antioxidantes. As células e tecidos do organismo humano estão continuamente sofrendo agressões causadas pelos radicais livres e espécies reativas do oxigênio, os quais são produzidos durante o metabolismo normal do oxigênio ou são induzidos por danos exógenos. As antocianinas apresentam uma deficiência natural de elétrons, que as torna muito reativas, por este motivo apresentam uma grande sensibilidade a mudanças de pH e temperatura (VOLP et al., 2008).

Em relação à saúde, os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células. Os antioxidantes são um conjunto heterogêneo de substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais e, ainda, enzimas, que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres (ATOUI et al., 2005).

O potencial antioxidante das antocianinas é regulado por suas diferenças na estrutura química, é dependente do número e da posição dos grupos hidroxilas e sua conjugação, assim como da presença de elétrons doadores no anel da estrutura, devido à capacidade que o grupo aromático possui de suportar o desaparecimento de elétrons. Os mecanismos de ação antioxidante incluem suprimir a formação de espécies reativas tanto pela inibição enzimática quanto por quelar traços de elementos envolvidos na produção de radicais livres, eliminar espécies reativas de oxigênio e manter o mecanismo antioxidante de defesa regular e protegido (KUSKOSKI et al., 2004).

Cavalcanti et al. (2011) revisando estudos sobre os mecanismos de estabilização das moléculas de antocianinas destacaram a gama de atividades biológicas que este pigmento pode desempenhar no organismo, dentre elas estão a capacidade antioxidante, anti-inflamatória, anti-câncer, atividades quimiopreventivos, inibição de doenças

coronarianas e inibição da agregação plaquetária. Há uma tendência e interesse mundial para a maior utilização nos alimentos de corantes a partir de fontes naturais, em vez de corantes sintéticos, como consequência das preferências dos consumidores e da intensificação de estudos nesta linha demonstrando a atividade benéfica de tal composto, além de medidas legislativas de alguns países que não permitem o uso de certos corantes sintéticos nos alimentos devido aos seus efeitos alergênicos.

6. Luteína

Os carotenoides são uma das principais classes de pigmentos naturais, e sua distribuição no reino vegetal é bastante ampla. São compostos lipossolúveis e apresentam uma grande diversidade estrutural e numerosas funções importantes para a saúde humana. Existem aproximadamente 600 pigmentos carotenoides presentes na natureza sendo que desses, somente 40 são regularmente consumidos na dieta humana. Os seis carotenoides presentes em maior quantidade no plasma sanguíneo são o β -caroteno, α -caroteno, luteína, licopeno, zeaxantina e criptoxantina. Altas concentrações no plasma destes carotenoides estão associadas ao decréscimo do risco de angiogênese, cardiopatias e cataratas (FAULKES e SOUTHON, 1997).

A coloração do pigmento dos carotenoides varia do amarelo ao vermelho e tem sido largamente utilizados como corantes em alimentos, bebidas, cosméticos e rações animais. Além disso, alguns desses pigmentos possuem comprovada atividade de provitamina A e existem evidências de outras propriedades biológicas, terapêuticas e preventivas de vários tipos de distúrbios e enfermidades em humanos (NUNES e MERCADANTE, 2004).

A função biológica clássica atribuída aos carotenoides é sua atividade pró-vitamina A. Os carotenoides são divididos em dois grupos distintos, os carotenos, tais como β -caroteno (hidrocarbonetos lineares que podem ser ciclizados em uma ou ambas as extremidades da molécula) e as xantofilas como a luteína, violaxantina, neoxantina e zeaxantina, que são os derivados oxigenados de carotenos (VALDUGA et al., 2009). Alguns dos carotenoides possuem atividade pró-vitamina A como o β -caroteno, α -caroteno e β -criptoxantina, sendo o β -caroteno o que possui maior atividade pró-vitamina A dentre todos os outros. A luteína e zeaxantina, não possuem atividade pró-vitamina A, no entanto, são ativos contra a degeneração macular relacionada à idade e a catarata. Estudos são realizados há décadas demonstrando que os carotenoides, com nove ou mais duplas ligações conjugadas são potentes supressores de oxigênio singlete,

ou seja, alto potencial antioxidante, uma função biológica, que é independente de qualquer atividade provitamina A (FAULKS e SOUTHON, 1997).

Tais compostos vêm despertando grande interesse em virtude de sua importância na prevenção de determinados tipos de câncer, doenças cardiovasculares e catarata, na ação inibidora nas mucosas contra úlceras gástricas e na atuação sobre o sistema imunológico (DELLA LUCIA et al., 2008).

A luteína (Figura 3) é um carotenoide, lipossolúvel pertencente à classe das xantofilas, e também chamado de carotenoide macular de pigmentação amarela, um potente antioxidante que previne danos causados por radicais livres nos tecidos (STRINGHETA et al., 2006).

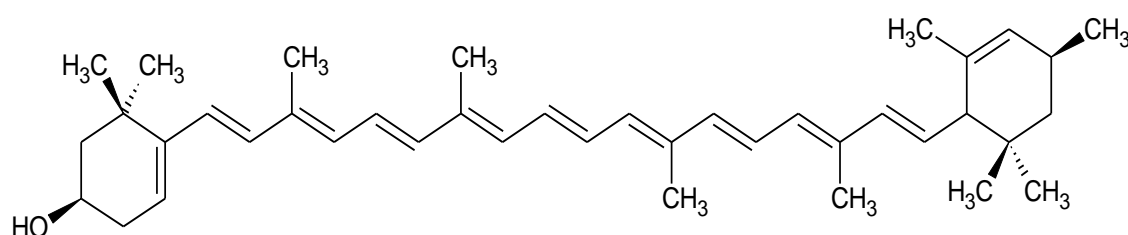


Figura 3 – Estrutura química da luteína.

O organismo humano não tem a capacidade de sintetizar carotenoides, sendo necessária a busca por alimentos ricos destes compostos para serem incluídos na dieta cotidiana. Alguns estudos realizados com animais e humanos demonstram que a concentração de luteína no sangue e nos tecidos está estreitamente relacionada ao consumo de alimentos ricos desse carotenoide (MERCADANTE e RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; NACHTIGALL et al., 2007).

Uma das funções mais estudadas da luteína é o papel essencial que desempenha sobre a saúde dos olhos. A luteína atua juntamente com seu isômero zeaxantina, está concentrada na mancha amarela da retina do olho também chamada de mácula lútea e atua como um filtro de luz azul, portanto, pode contribuir para a prevenção da degeneração macular relacionada a doenças oculares como a catarata. A luteína pode ser encontrada naturalmente em vegetais folhosos verde escuro como espinafre, couve, brócolis como também em abóbora, frutas e na gema de ovo. Quando a ingestão dietética de luteína não é suficiente, pode ser completada por suplementos dietéticos ou em alimentos que são enriquecidos com tal composto (ROBERTS et al., 2009; RODÍĆ et al., 2012).

Dentre os principais benefícios relacionados à luteína está a redução da DMRI (degeneração macular relacionada à idade) que é a perda da sensibilidade visual, ocorrida em pessoas com idade avançada e baixa densidade do pigmento macular nos tecidos oculares, podendo ser a precursora de outras doenças dos olhos. Ao sofrer incidência de luz azul sobre a retina são geradas espécies reativas com oxigênio (EROS), que levam a peroxidação das membranas lipídicas. A luteína atuará como antioxidante, impedindo esta reação e protegendo os olhos dos danos causados pela luz azul (STRINGHETA et al., 2006).

Como os seres humanos não são capazes de sintetizar os carotenoides é necessário uma dieta balanceada com consumo de alimentos ricos nestes compostos, seu consumo contribui significativamente para auxiliar na proteção do organismo contra doenças degenerativas, uma vez que a luteína é comprovadamente um potente antioxidante (STRINGHETA et al., 2006).

Diante desse contexto, o desenvolvimento de bebidas com proteínas de soro de leite adicionadas de corantes naturais, com propriedades antioxidantes, torna-se um excelente aliado na redução do risco de certas doenças crônicas degenerativas, contribuindo para melhoria da saúde, além de atender as necessidades nutricionais diárias.

OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Desenvolver formulações de bebidas constituídas de proteínas de soro de leite adicionadas de corantes naturais, visando atender as necessidades proteicas diárias e incorporar aos formulados compostos antioxidantes importantes para o bom funcionamento do organismo humano.

1.1 Objetivos Específicos

- ✓ Desenvolver formulações de bebidas constituídas de proteínas de soro de leite, adicionadas de corantes naturais: antocianinas de cascas de jabuticaba e luteína;
- ✓ Avaliar as características físicas, químicas, bioativas e microbiológicas dos formulados;
- ✓ Avaliar a aceitabilidade sensorial das bebidas proteicas;
- ✓ Avaliar a estabilidade das formulações mais aceitas em função do período de armazenamento;
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante e variações de cor das bebidas durante o período de armazenamento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Corantes Naturais de Alimentos e Compostos Bioativos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

2.1 Planejamento Experimental

O experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições. Oito formulações de bebidas foram desenvolvidas contendo quatro diferentes concentrações de proteínas de soro de leite (0,5%, 2,0%, 4,0% e 6,0%). O permeado e retentado de soro de leite obtido pelas operações de separação por membranas de microfiltração e ultrafiltração foram utilizados para as formulações com 0,5% e 2,0% de proteínas, respectivamente. O concentrado proteico de soro comercial (WPC60) foi utilizado para as formulações de 4,0% e 6,0% de proteínas. Foram adicionadas de dois corantes naturais distintos: extrato de antocianinas e luteína comercial. Na Tabela 3 são apresentados os teores de proteínas, bem como o corante natural e o tipo de soro utilizado para cada formulação.

Tabela 3 – Codificações das formulações, tipo de corante, tipo de soro e teor de proteínas das bebidas.

Formulação	Corante	Proteína (%)	Tipo de Soro
F1	Antocianinas	0,50	Permeado
F2	Antocianinas	2,0	Retentado
F3	Antocianinas	4,0	WPC60
F4	Antocianinas	6,0	WPC60
F5	Luteína	0,50	Permeado
F6	Luteína	2,0	Retentado
F7	Luteína	4,0	WPC60
F8	Luteína	6,0	WPC60

Para avaliação da aceitabilidade sensorial das bebidas proteicas, procedeu-se também no delineamento inteiramente casualizado, 112 julgadores avaliaram os formulados proteicos adicionados de extrato de antocianinas quanto à cor e impressão global e 114 julgadores que avaliaram os formulados proteicos adicionados de luteína, também quanto à impressão global e cor. Para obtenção do Mapa de Preferência Interno, os dados de aceitação (teste de consumidor) foram organizados numa matriz de amostras (em linhas) e consumidores (em colunas), e esta submetida à Análise de Componentes Principais (ACP). Os resultados foram expressos em um gráfico de dispersão das formulações (tratamentos) em relação aos dois primeiros componentes principais e em outro representando os “loadings” (cargas) da ACP (correlações dos dados de cada consumidor com os dois primeiros componentes principais). Por meio dos resultados da análise sensorial realizou-se o estudo de estabilidade durante 60 dias de armazenamento nos tempos (0, 7, 15, 30, 45 e 60) dias, com três repetições, das formulações que obtiveram maior aceitação sensorial.

2.2 Matéria-prima

O extrato de antocianinas foi obtido de cascas de jaboticaba espécie (*Myrciaria jaboticaba*), proveniente do município de Cachoeira do Campo/MG. Os frutos de jaboticaba foram colhidos, selecionados, higienizados e congelados. As cascas foram obtidas por meio do descascamento dos frutos congelados imediatamente antes das análises.

A luteína utilizada foi na forma de pó, fornecida pela empresa DSM Nutritional Products extraída de flores de *Tagetes erecta*. Os aromas de morango e maracujá foram fornecidos pela empresa Duas Rodas Industrial.

Foram utilizados permeado e retentado de soro de leite obtido no centro de membranas aplicado a indústria de laticínios do DTA/UFV, através de uma operação de separação por microfiltração e ultrafiltração, respectivamente. O concentrado proteico de soro comercial (WPC60) foi fornecido pela empresa Gemacon Tech.

2.3 Extração das Antocianinas das Cascas de Jaboticaba

As antocianinas foram extraídas da casca da jaboticaba com base na metodologia descrita por (Silva, 1996) em que as cascas de jaboticaba foram trituradas em mixer e misturadas com etanol 70% proporção (1:2 m/v), acidificado com ácido cítrico até pH 2. A mistura foi deixada em repouso na ausência de luz por 24 horas sob refrigeração.

Após este período as amostras foram filtradas em papel Whatman n° 1 a vácuo e posteriormente concentradas em evaporador rotativo a vácuo a 40 °C para remover todo o etanol adicionado. Foram armazenadas em frasco âmbar sob refrigeração.

2.4 Processo de Separação por Membranas

2.4.1 Microfiltração do Soro

A microfiltração do soro foi realizada em equipamento construído pela empresa Tetra Pak[®] Processing, França. Primeiramente, foi feita a higienização do equipamento com dois ciclos de limpeza em sistema fechado (*cleaning in place - CIP*), alcalino (80 °C) e ácido (50 °C), respectivamente. O soro foi aquecido a 50 °C e filtrado tangencialmente através de uma membrana cerâmica tubular “Membralox[®]” com poros de tamanho 0,8 µm, velocidade de permeação 7,2 m·s⁻¹, sistema com área total de membrana 0,24 m² e com pressão transmembrana de 0,5 bar.

2.4.2 Ultrafiltração do Soro

A ultrafiltração do soro foi realizada em uma planta piloto da marca “WGM sistemas”, sendo o equipamento utilizado um sistema aberto. O soro foi filtrado através de uma membrana de polissulfona do tipo espiral “Koch Membranes” com uma massa molar de corte de 10 kDa, área filtrante 3,0 m², temperatura de operação de 35 °C e pressão operacional entre 2,1 e 8,3 bar.

2.5 Elaboração das Formulações

As formulações foram elaboradas com diferentes concentrações de proteínas adicionadas dos corantes naturais antocianinas e luteína. O permeado de soro de leite foi utilizado para as formulações com teores de 0,5% de proteína, o retentado para as formulações com teores de 2,0% de proteína e concentrado proteico de soro comercial (WPC60) para as formulações com teores de 4,0% e 6,0% de proteína. As formulações adicionadas de extrato de antocianinas receberam as seguintes codificações (F1, F2, F3, e F4) enquanto que as adicionadas de luteína comercial em pó receberam as codificações (F5, F6, F7 e F8), totalizando quatro formulações para cada um dos corantes adicionados.

A proporção de permeado, retentado e concentrado proteico de soro comercial adicionado às formulações foram calculados de acordo com o teor de proteína inicial de cada um deles por meio de um balanço de massa, para que no produto final obtivesse as

respectivas concentrações de proteínas desejadas (0,5%, 2,0%, 4,0% e 6,0%). Os aromas de morango e maracujá foram adicionados de acordo com a recomendação do fabricante. A Tabela 4 apresenta a proporção dos demais ingredientes utilizados para o desenvolvimento das bebidas.

Tabela 4 – Concentração dos ingredientes adicionados às formulações

Ingredientes	Concentração (g·100 g⁻¹)
Açúcar	15,00
Polpa de Fruta	10,00
Goma Arábica	0,45
Citrato de Sódio	0,07
Sorbato de Potássio	0,03

O permeado de soro de leite acrescido dos ingredientes: água mineral, açúcar, polpa de fruta (maracujá ou morango), goma arábica, citrato de sódio, sorbato de potássio constituíram a mistura inicial. Esta foi homogeneizada em agitador por 5 minutos para completa dissolução de todos os ingredientes. O pH da mistura foi ajustado para 4,0 com agente acidulante (ácido cítrico) e homogeneizada novamente. Depois de homogeneizada a mistura foi tratada termicamente por 63 °C por 30 minutos em cubas de ácido inoxidável capacidade de 20 L. Foi utilizado um banho-maria industrial para o tratamento térmico.

O aroma (maracujá ou morango) foi adicionado logo após o tratamento térmico e imediatamente antes do resfriamento. A bebida foi resfriada até em torno de 40 °C, em seguida foi adicionado o extrato de cascas de jabuticaba para formulações sabor morango e o resfriamento prosseguiu-se até temperatura de 25 °C. O envase foi realizado em embalagens de polietileno de 185 mL. O armazenamento foi realizado à temperatura de refrigeração (5 °C). Para formulações sabor maracujá adicionou-se luteína juntamente com os demais ingredientes (antes da homogeneização). Este procedimento descrito anteriormente constituiu a formulação com teor de 0,5% de proteína, adicionada de luteína (sabor maracujá) ou de extrato de casca de jabuticaba (sabor morango). Este mesmo procedimento foi realizado para as formulações com concentração de proteína de 2,0%, 4,0% e 6,0%. Em todas as formulações sabor morango foi adicionado aproximadamente 2,0 mg de antocianinas para cada 100 g da bebida e as de sabor maracujá foi adicionado 3,2 mg de luteína para cada 100 g da bebida. A Figura 4 apresenta o fluxograma de processamento das bebidas proteicas.

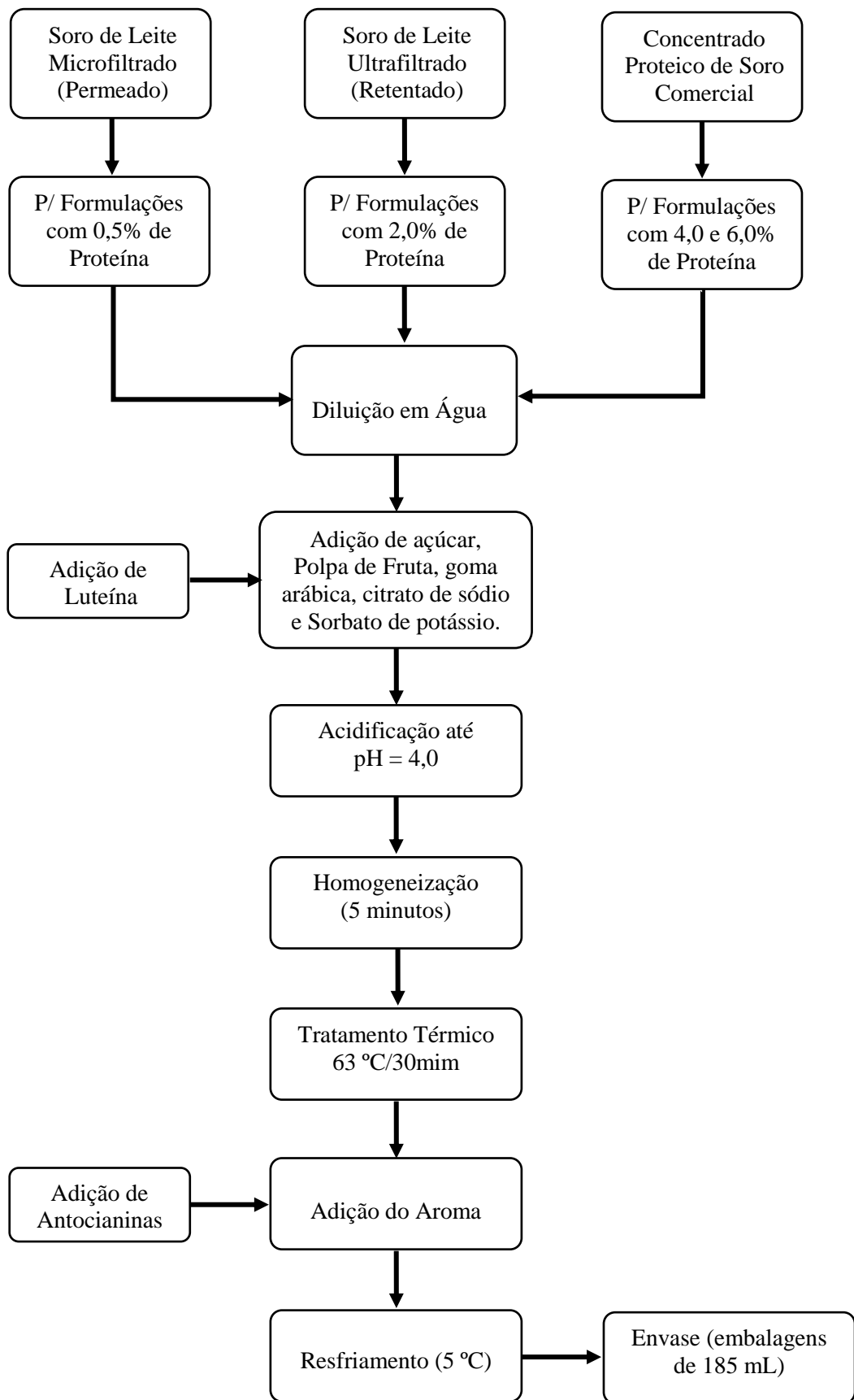


Figura 4 – Fluxograma de processamento das bebidas proteicas.

2.6 Caracterização do Extrato de Cascas de Jabuticaba

2.6.1 pH

A determinação de pH foi realizada em pHmetro digital, marca DIGIMED DM-20, aferido com soluções tampão pH 4,01 e 6,86, segundo as normas analíticas propostas pelo Manual do Instituto Adolfo Lutz (2008).

2.6.2 Acidez

A determinação da acidez foi realizada por titulometria com solução padronizada de NaOH 0,1 mol·L⁻¹ utilizando indicador fenolftaleína. A acidez foi expressa em porcentagem de ácido cítrico presente na amostra (Manual do Instituto Adolfo Lutz, 2008).

2.6.3 Sólidos Solúveis Totais

Os sólidos solúveis totais foram determinados por leitura direta em refratômetro digital (Digital Hand-Held Refractometer AR200, Leica) a temperatura ambiente, previamente calibrado com água destilada, e o resultado expresso em °Brix de acordo com as normas analíticas propostas pelo Manual do Instituto Adolfo Lutz (2008).

2.6.4 Determinação da Cor

A coloração foi determinada em Colorímetro Colorquest XE (Hunter Lab, Reston, VA), com leitura direta dos valores das coordenadas L* (luminosidade), a* (intensidade de vermelho vs verde) e b* (intensidade de amarelo vs azul). Os parâmetros de tonalidade (h*) e saturação (c*) foram calculados a partir dos valores de a* e b*, conforme as equações 1.1 e 1.2, respectivamente. Para efetuar a leitura, empregou-se uma cubeta com capacidade de 50 mL.

$$h^* = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (\text{Eq1.1})$$

$$c^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Eq1.2})$$

2.6.5 Antocianinas Totais

As antocianinas totais foram quantificadas segundo o método espectrofotométrico descrito por Lees e Francis (1972). O teor de antocianinas foi determinado com auxílio de um espectrofotômetro marca Shimadzu modelo UV-VIS 1601Pc, utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de $98,2 \text{ L}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ da cianidina-3-glicosídeo, com leitura a 535 nm referente a absorção máxima das antocianinas, diluídas em etanol acidificado, medida em cubeta de 1 cm. Os resultados foram expressos em mg de antocianinas por mL de extrato ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

2.6.6 Fenólicos Totais

A determinação de fenólicos totais foi realizada de acordo com metodologia descrita por Singleton e Rossi, 1965. Os fenólicos totais foram quantificados através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, baseado na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas, produzindo um complexo de coloração azul em meio alcalino. A absorbância das amostras foram medidas a 760 nm usando um espectrofotômetro marca Shimadzu modelo UV-VIS 1601Pc. O ácido gálico foi usado como padrão e os resultados expressos em mg de ácido gálico equivalente por mL de extrato ($\text{mg AGE}\cdot\text{mL}^{-1}$).

2.6.7 Atividade Antioxidante *in vitro*

A determinação foi realizada por meio do ensaio TEAC (Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox) utilizando o radical ABTS (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonado) segundo metodologia descrita por RE et al. (1999). A reação das amostras com o cátion ABTS ocorreu na proporção 0,5:3,5mL, respectivamente, sendo as leituras espectrofotométricas realizadas após 6 minutos, no comprimento de onda de 734 nm.

Foi construída uma curva analítica com o antioxidante padrão Trolox (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano) e realizadas diluições das amostras para a elaboração de uma curva de amostra. A mesma foi contrastada com a curva do padrão, e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ equivalente de Trolox por grama de amostra.

2.7 Determinações Físico-químicas dos Formulados

Os formulados foram caracterizados segundo as seguintes propriedades físico-químicas, assim citadas nos itens 2.6: pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais (°Brix) e cor. Além disso, foi realizada a análise do teor de proteínas, conforme descrito no item 2.7.1.

2.7.1 Teor de Proteínas

O teor de proteína foi obtido a partir da análise do teor de nitrogênio pelo método de Kjeldahl. A concentração de proteína foi calculado multiplicando-se o teor de nitrogênio total pelo fator de conversão 6,38, de acordo com a FIL (International Dairy Federation) 20B:1993.

2.8 Extração e Quantificação das Antocianinas e Fenólicos Totais dos Formulados

Para as quantificações espectrofotométricas foi necessário extrair as antocianinas e os fenólicos adicionados, pesou-se 5 g de cada formulação adicionou-se 10 mL de solução de etanol:HCl $1,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ proporção (85:15) (v/v) (Lees e Francis, 1972), centrifugou-se a 2500g por 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante e ao precipitado foi adicionado mais 5 mL da solução etanol:HCl (85:15) (v/v) realizando o mesmo procedimento descrito anteriormente. Este procedimento foi repetido por mais uma vez. O volume foi aferido em balão volumétrico de 25 mL e armazenado em frasco âmbar até o momento da análise sob refrigeração. A quantificação das antocianinas e fenólicos totais dos formulados foram realizados como descrito nos itens 2.6.5 e 2.6.6, respectivamente.

2.9 Extração e Quantificação da Luteína dos Formulados

A extração da luteína foi realizada segundo método descrito por Dias (2009) modificado. Pesou-se 10 g da bebida, adicionou-se de 20 mL de álcool 95%, e posteriormente centrifugados a 2500g por 5 minutos. O sobrenadante foi reservado, e ao precipitado foi adicionado 10 mL de etanol 95% realizando o mesmo procedimento descrito anteriormente, este procedimento foi repetido por mais 2 vezes. O sobrenadante total foi dividido em duas alíquotas de 25 mL e procedeu-se a extração com 50 mL de acetona e 45 mL de éter de petróleo, lavando as amostras 3 vezes com água destilada. A

mistura de luteína e éter de petróleo obtida nas duas extrações foi recolhida em um balão de fundo redondo de 250 mL, seca em rotavapor à temperatura de 38 °C, posteriormente ressuspendidas em 10 mL de etanol absoluto 99,8% e armazenado sob refrigeração até o momento da análise. A determinação de carotenoides totais foi realizada por método espectrofotométrico descrito por Rodriguez-Amaya, 2001. O teor de carotenoides foi determinado com auxílio de um espectrofotômetro marca Shimadzu modelo UV-VIS 1601Pc, utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de 2550 L·cm⁻¹·g⁻¹, com leitura a 445 nm referente a absorção máxima da luteína, diluídas em etanol 99,8%, medida em cubeta de 1cm. O teor de carotenoides totais foram expressos em mg de luteína por 100g de bebida, calculado segundo as equações 1.3 e 1.4.

$$x(\text{mg}) = \frac{A \cdot y(\text{mL}) \cdot 10^3}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot 100} \quad (\text{Eq.1.3})$$

$$x(\text{mg} / 100 \text{ g}) = \frac{x(\text{mg})}{\text{amostra}(\text{g})} \cdot 100 \quad (\text{Eq.1.4})$$

x = teor de luteína expresso em mg
 A = absorbância a 445 nm
 $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ = coeficiente de absorvidade molar em etanol absoluto
 y (mL) = volume do balão volumétrico.

2.10 Determinação da Atividade Antioxidante dos Formulados

A atividade antioxidante foi determinada de todas as formulações conforme descrito no item 2.6.7.

2.11 Análises Microbiológicas

2.11.1 Análises Microbiológicas das Bebidas Proteicas

Foram realizadas enumerações de mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos e dos micro-organismos indicadores coliformes, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Diluições seriadas foram preparadas de forma a se obter enumeração entre 15 e 150 colônias por placa. Volumes de 1,0 mL de cada diluição foram inoculados em placas Petrifilm para enumeração de coliformes, *Escherichia coli* (Petrifilm™ EC), para enumeração de mesofilos aeróbicos e anaeróbios facultativos foram utilizadas placas

Petrifilm (Petrifilm™ AC), ambas realizadas de acordo com Wehr e Frank (2004). O mesmo volume foi adicionado nas placas petrifilm para enumeração de *Staphylococcus aureus* (Petrifilm™ Staph Express), de acordo com AOAC (2001). As placas foram incubadas a 35 °C ± 1 °C por 24 horas para *Staphylococcus aureus*, coliformes e 48 horas para *Escherichia coli*, enquanto que para a enumeração de mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos foi incubado 32 °C ± 1 °C por 48 horas. A leitura das placas foi realizada após o período de incubação de cada micro-organismo. Para enumeração de *Staphylococcus aureus*, após a incubação, as colônias típicas (colônias vermelho-violeta) foram contadas e no caso da presença de colônias suspeitas foi adicionado disco de Dnase e as placas foram incubadas por 1 a 3 horas onde poderia ser observada a formação de halo. A presença de halo indicaria resultado confirmativo para o micro-organismo, segundo o fabricante. Os resultados foram obtidos pela multiplicação das contagens encontradas pelo inverso da diluição utilizada e expressos em UFC·mL⁻¹.

2.11.2 Avaliação da Contaminação do Ar da Fábrica

A qualidade do ar na fábrica, durante as etapas de produção, foi avaliada pelo método de sedimentação em placas descrito por Wehr e Frank (2004). Placas de Petri estéreis foram preparadas vertendo-se aproximadamente 15 mL de PCA previamente fundido e resfriado a 45 °C. As placas foram mantidas abertas por 15 minutos durante as etapas de envase de cada tratamento. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por semana segundo a equação 1.5.

$$Partículas\ viáveis\ cm^{-2}\ semana^{-1} = \frac{UFC \times 10080^*}{(\pi \times r^2) \times t} \quad (Eq.1.5)$$

UFC: número de colônias na placa após incubação;

r: raio da placa da placa de Petri em cm;

t: tempo de sedimentação em minutos;

*: minutos em uma semana.

2.12 Viscosidade

As medições reológicas das bebidas foram realizadas em reômetro de cilindros concêntricos tipo Searle, marca Brookfield, modelo R/S plus SST 2000, equipado com software Rheo 2000, fabricado pela Brookfield Engineering Laboratories, Inc, EUA, a

temperatura de 10 °C, mantida constante com o auxílio de um banho termostático. Utilizou-se como sistema de medição o sensor cilíndrico DG DIN, com capacidade de medição de viscosidade acima de 20 mPa.s, com uma taxa de deformação de 10 s⁻¹. O tempo de ensaio foi de 2 minutos, completando um total de 30 pontos. As determinações foram realizadas das 3 repetições e os resultados expressos em mPa.s.

2.13 Aceitabilidade Sensorial

Foi realizada a análise sensorial das formulações das bebidas adicionadas corantes naturais. Utilizou-se uma escala hedônica de nove pontos segundo Minim (2010), variando de “gostei extremamente” (9) a “desgostei extremamente” (1). As análises foram conduzidas no Laboratório de Análise Sensorial (DTA/UFV). Os testes foram realizados em dois dias, sendo que no primeiro dia, realizou-se o teste sensorial com 112 consumidores que avaliaram as bebidas proteicas sabor morango, adicionadas de extrato de antocianinas (F1, F2, F3 e F4), no segundo dia realizou-se o teste sensorial com 114 consumidores que avaliaram as bebidas proteicas sabor maracujá adicionadas de luteína (F5, F6, F7 e F8), ambas quanto à cor e impressão global.

2.13.1 Impressão Global

Os consumidores foram instruídos a avaliar a aceitação em relação à impressão global das amostras apresentadas.

Neste teste, as amostras foram codificadas com números de três dígitos e apresentadas de forma monádica aos consumidores, em copos descartáveis de polietileno com capacidade para 50 mL.

Os consumidores foram solicitados a degustar as bebidas, anotando na ficha de avaliação o quanto gostaram ou desgostaram de cada amostra, utilizando escala hedônica estruturada de nove pontos (Figura 5), sendo atribuído nota 9 para “gostei extremamente” e nota 1 para “desgostei extremamente”.

Nome: _____ Idade: _____ Sexo: ()M ()F

Por favor, avalie as amostras utilizando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou do produto. Enxágue a boca entre cada avaliação e aguarde 30 segundos.

	Código	Nota
9 – Gostei extremamente		
8 – Gostei muito		
7 – Gostei moderadamente	_____	_____
6 – Gostei ligeiramente	_____	_____
5 – Indiferente		
4 – Desgostei ligeiramente	_____	_____
3 – Desgostei moderadamente	_____	_____
2 – Desgostei muito		
1 – Desgostei extremamente		

Comentários: _____

Figura 5 – Ficha de avaliação usada para o teste de impressão global.

2.13.2 Cor

Os consumidores foram instruídos a avaliar a aceitação em relação ao atributo cor das amostras apresentadas. As amostras foram codificadas com números de três dígitos e apresentadas aos consumidores, em garrafas transparente de polietileno de capacidade de 185 mL. Apresentou-se as bebidas nesta embalagem pelo fato dos consumidores estarem habituados a comprarem produtos lácteos como iogurte, leite fermentado e bebidas lácteas em embalagens dessa natureza, o que facilita a visualização da bebida e avaliação do consumidor.

Os consumidores avaliaram as amostras, registrando o quanto gostaram ou desgostaram da cor de cada amostra, utilizando escala hedônica estruturada de nove pontos (Figura 6), sendo atribuído nota 9 para “gostei extremamente” e 1 para “desgostei extremamente”.

Nome: _____ Idade: _____ Sexo: ()M ()F

Por favor, avalie as amostras utilizando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou da COR do produto.

	Código	Nota
9 – Gostei extremamente		
8 – Gostei muito		
7 – Gostei moderadamente	_____	_____
6 – Gostei ligeiramente	_____	_____
5 – Indiferente		
4 – Desgostei ligeiramente	_____	_____
3 – Desgostei moderadamente	_____	_____
2 – Desgostei muito		
1 – Desgostei extremamente		

Comentários: _____

Figura 6 – Ficha de avaliação usada para o teste de cor.

2.14 Estudo de Estabilidade

O estudo de estabilidade foi realizado com as formulações que obtiveram maior aceitação no teste sensorial quanto à impressão global e a cor, foram escolhidas duas formulações; uma do grupo de bebidas adicionadas de extrato de antocianinas e outra do grupo de bebidas adicionadas de luteína. O estudo de estabilidade foi realizado a fim de avaliar o comportamento dos compostos bioativos adicionados às formulações ao longo de 60 dias de armazenamento, sendo realizadas análises nos tempos 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. As análises que compuseram o estudo de estabilidade foram: atividade antioxidante, antocianinas totais, cor, pH, sólidos solúveis totais e acidez, assim descritas nos itens 2.6, além da análise de carotenoides totais descrita no item 2.8.

Para as análises de cor foi acrescentado o cálculo da diferença global de cor (ΔE^*), entre cada um dos tempos avaliados durante o estudo, conforme a equação 1.6.

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (\text{Eq.1.6})$$

2.15 Análises Estatísticas

O efeito do teor de proteínas sob os resultados das análises físico-químicas e bioativas foram avaliados por análise de regressão simples. Regredindo as variáveis respostas em função dos teores de proteína das bebidas em seus componentes lineares e quadráticos, para a escolha do modelo de regressão que melhor descrevesse as variações, avaliando-se também a falta de ajustamento do modelo, a significância dos parâmetros da equação, e por fim, foi calculado o coeficiente de determinação R^2 .

Os dados de aceitabilidade sensorial foram interpretados por análise de variância (ANOVA), teste de comparação de médias (Tukey), ao nível de 5% de probabilidade e por análise multivariada com Análise de Componentes Principais (ACP). Os resultados do estudo de estabilidade foram apresentados por meio de gráficos; foram plotadas as curvas das médias de cada determinação *versus* tempo (dias), uma análise de regressão linear foi utilizada para determinar a adequacidade do modelo. As análises estatísticas foram implementadas no software SAS, (SAS Institute Inc., 2008) versão 9.1, licenciado pela Universidade Federal de Viçosa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Resultados das Análises de Caracterização do Extrato das Cascas de Jabuticaba

Os resultados das análises da caracterização físico-química e bioativa do extrato de cascas de jabuticaba são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados referentes às análises físico-químicas e bioativas do extrato de cascas de jabuticaba.

Análises	Extrato Concentrado
pH	1,43 ± 0,00
SST (°Brix)	31,70 ± 0,61
Acidez (g de ácido cítrico·100 ⁻¹ g)	31,86 ± 0,37
L* - Luminosidade	24,71 ± 0,04
c* - Saturação da Cor	1,54 ± 0,02
h* - Ângulo de Tonalidade (graus)	-10,21 ± 0,65
Antocianinas totais (mg·mL ⁻¹)	1,10 ± 0,05
Fenólicos Totais (mg AGE·mL ⁻¹)	13,50 ± 0,09
Atividade Antioxidante (µmol·L ⁻¹ Trolox·g ⁻¹)	103,40 ± 6,32

SST: Sólidos solúveis totais. Os resultados de fenólicos foram expressos em ácido gálico equivalente (AGE). Os valores representam a média de 3 repetições ± desvio-padrão.

O valor de pH do extrato das cascas de jabuticaba foi de 1,43. O pH baixo apresentado foi devido ao ajuste realizado com a adição de ácido durante a etapa de extração. O pH ácido é um parâmetro importante, uma vez que ajuda na extração do pigmento da matriz estudada e também mantém a coloração vermelha das antocianinas.

O extrato apresentou valores de acidez e teor de sólidos solúveis totais elevados, 31,86 e 31,70, respectivamente. A etapa de concentração dos extratos para aplicação nos alimentos contribuiu para o aumento destes valores. Observa-se que estes dois fatores estão diretamente relacionadas, o aumento da concentração de sólidos contribuiu para o aumento da acidez.

Para o néctar de amora preta Araújo et al. (2009) encontraram valores de pH de 2,41, sólidos solúveis totais de 13,0 °Brix e acidez titulável de 0,54 g de ácido cítrico·100⁻¹g. A amora preta assim como a jabuticaba é uma fruta escura, rica em antocianinas e fenólicos totais, que contribuem para alta capacidade antioxidante. As diferenças encontradas entre os valores de acidez e pH em relação ao presente trabalho, é devido a forma de preparo do néctar, em que há a diluição da amora em água mineral, na proporção de 1:1(v:v).

O valor de L* para o extrato de cascas de jabuticaba foi baixo, 24,71. Este valor indica que havia pouca luminosidade na amostra, sendo considerada escura. A coordenada colorimétrica L* avalia a claridade das amostras, com valores que variam de 0 (preta) a 100 (branca). Quanto mais próximos de zeros são os valores de L*, mais escura é a amostra e quanto mais próximo de 100 mais clara.

A coordenada c* representa a saturação da cor, ou seja, indica a pureza ou intensidade da cor com relação ao branco. O valor de c* para o extrato foi de 1,54, indicando uma cor menos saturada, há uma tendência para a tonalidade azul, mostrando que a cor apresentada tem uma menor pureza em relação ao branco.

O valor da coordenada h* do extrato foi negativo, -10,21. O valor do ângulo de tonalidade indicou que a cor da amostra está na faixa entre vermelho e azul (roxo). Montes et al., (2005) ao avaliar as coordenadas de cor para extrato de jabuticaba utilizando diferentes métodos de extração encontraram valores de h* entre 13° e 24°, os valores de c* foram de 22,8 a 54,3. Observaram que os extratos ricos em antocianinas obtidos por meio da extração ácida, a forma predominante é do cátion *flavilium*, h* deve estar situado próximo ao vermelho, ou entre o vermelho e o azul.

O teor de antocianinas e fenólicos totais do extrato de cascas de jabuticaba foram de 1,10 mg·mL⁻¹ e 13,50 mg AGE·mL⁻¹, respectivamente. Enquanto o valor de atividade antioxidante foi de 103,40 µmol·L⁻¹ Trolox·g⁻¹. O extrato mostrou uma excelente atividade antioxidante, em consequência a alta concentração de antocianinas e fenólicos apresentados, estes contribuem diretamente nesta resposta.

A ação antioxidante de um composto está diretamente relacionada com componentes bioativos presentes, dependem da estrutura química e da concentração destes fitoquímicos no alimento, cujo teor é amplamente influenciado por fatores genéticos, condições ambientais, grau de maturação, variedade da planta, entre outros (MELO et al., 2009).

Santos et al. (2010) encontraram valores de fenólicos totais e antocianinas totais no extrato de cascas de jabuticaba utilizando diferentes métodos de extração, de 36,0 mg AGE·g⁻¹ e 5,41 mg·g⁻¹, respectivamente. O solvente extrator que proporcionou maiores teores dos compostos bioativos foi etanol acidificado, ao passo que os métodos de extração que obtiveram maiores teores de compostos fenólicos foram os que também proporcionaram maior atividade antioxidante. Estes valores foram superiores aos do extrato produzido neste estudo, tal diferença pode ser atribuída às diferenças no processo de extração.

O valor de atividade antioxidante foi de 103,40 μmol·L⁻¹ Trolox·g⁻¹ de extrato, enquanto que Silva et al. (2010) encontrou valores de atividade antioxidante de 723 μM de Trolox·g⁻¹ de extrato, valor este superior ao encontrado durante a elaboração deste trabalho. Leite-Legatti et al.(2012) avaliando os compostos bioativos e atividade antioxidante de cascas de jabuticaba liofilizada encontraram o valor de 9,458 μM de Trolox·g⁻¹ de amostra liofilizada. Rufino et al. (2010) relataram uma atividade antioxidante de 37,5 μM de Trolox·g⁻¹ frutas inteiras frescas de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*). As diferenças de resultados são devido às formas em que as amostras foram preparadas; extrato, amostra liofilizada e fresca.

Os teores de compostos bioativos e a cor apresentada pelo extrato de cascas de jabuticaba neste trabalho reforçam os estudos que apontam a jabuticaba como uma fonte promissora de corante natural. Este fruto tem uma casca de coloração púrpura escura, devido ao elevado teor de antocianinas, que cobrem seu interior branco e gelatinoso, tais características trazem benefício à saúde humana por apresentar uma excelente capacidade antioxidante (SANTOS et al., 2010).

3.2 Resultados da Caracterização Físico-química dos Formulados

3.2.1 Composição Química

Os resultados das análises de pH, sólidos solúveis totais (SST), acidez e teor de proteínas das bebidas proteicas são apresentados na Tabela 6.

Observou-se que não houve efeito significativo ($p>0,05$) do teor de proteínas sobre os valores de pH das formulações, uma vez que foi realizada a padronização do pH para 4 ou o mais próximo deste valor. Como parte das formulações foram adicionadas de extrato de antocianinas, utilizou-se o pH baixo para manter a coloração vermelha das bebidas. Karaaslan et al. (2011) encontraram valores de pH de 4,22 para iogurtes adicionados de antocianinas de quatro variedades diferentes de uva e verificaram que a variedade não afetou significativamente os valores de pH no produto final.

As antocianinas são comercialmente usadas em soluções ácidas, pH entre 2,5 e 3,8, no qual apresentam cor vermelha. Para aplicação geral, o pH entre 1,0 e 3,5 confere maior estabilidade ao pigmento (BARROS e STRINGHETA, 2006; SILVA et al., 2012).

Houve efeito significativo ($p<0,05$) do teor de proteínas sobre os valores de acidez das formulações. Os valores de acidez para as bebidas adicionadas de extrato de antocianinas variaram entre 0,45% a 0,96% de ácido cítrico e entre 0,36% a 0,97% para as bebidas adicionadas de luteína. Assim como a acidez, o teor de sólidos solúveis das formulações teve efeito significativo ($p<0,05$) do teor de proteínas. Os teores de sólidos solúveis totais variaram de 21,10 a 26,96 °Brix para as formulações adicionadas de extrato de antocianinas e de 21,63 a 27,10 °Brix para as formulações adicionadas de luteína.

Tabela 6 – Resultados da composição química das bebidas proteicas formuladas com extrato de cascas de jabuticaba e luteína.

Análises	Formulações adicionadas de antocianinas				Formulações adicionadas de luteína			
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
pH	3,94±0,16	3,98±0,08	4,10±0,07	4,11±0,05	4,08±0,05	4,06±0,03	4,13±0,01	4,14±0,01
SST (°Brix)	21,10±0,11	22,60±0,35	24,06±0,32	26,96±1,22	21,63±0,20	22,96±0,78	24,60±0,70	27,10±0,36
Acidez (g de ácido cítrico·100 ⁻¹ g)	0,45±0,09	0,65±0,04	0,77±0,07	0,96±0,18	0,36±0,02	0,56±0,03	0,76±0,02	0,97±0,03
Proteína (g·100 ⁻¹ g de bebida)	0,57±0,02	2,24±0,03	4,05±0,06	6,09±0,01	0,58±0,02	2,12±0,23	4,13±0,38	6,14±0,28

F1: formulação com 0,5% de proteína; F2: formulação com 2,0% de proteína; F3: formulação com 4,0% de proteína, F4: formulação com 6,0% de proteína, todas as formulações adicionadas de extrato de antocianinas. F5: formulação com 0,5% de proteína; F6: formulação com 2,0% de proteína; F7: formulação com 4,0% de proteína; F8: formulação com 6,0% de proteína, todas as formulações adicionadas de luteína. SST: Sólidos solúveis totais. Os valores representam a média de 3 repetições ± desvio-padrão.

A variação nos teores de sólidos solúveis foi devido ao aumento da concentração de proteínas, uma vez que a formulação base foi a mesma para todas as bebidas, sendo assim o teor deste componente foi que interferiu diretamente para o aumento da concentração de sólidos.

A influência do teor de proteínas sobre os valores de acidez e sólidos solúveis totais foi modelada estatisticamente pelas equações representadas na Tabela 7. Os modelos foram testados quanto à falta de ajuste e significância dos parâmetros da regressão, apresentando a falta de ajuste para o modelo de primeiro grau não significativa ($p > 0,05$) e parâmetros da regressão significativos ($p < 0,05$) para os valores de acidez e sólidos solúveis totais. O coeficiente de determinação foi superior a 97% para as formulações adicionadas de antocianinas, e superior a 98% para as formulações adicionadas de luteína.

Observa-se na Tabela 7 que tanto os valores de acidez como os valores de sólidos solúveis foram influenciados positivamente pelo teor de proteínas, ou seja, com o aumento da concentração de proteínas houve o aumento da concentração de sólidos e também da acidez dos formulados.

Tabela 7 - Modelagem estatística do efeito do teor de proteínas sobre os valores de acidez e sólidos solúveis totais das formulações adicionadas de extrato de antocianinas e luteína.

Formulações	Determinação	Modelo de Regressão	R ²
Adicionadas de extrato de antocianinas	Acidez	$Y = 0,0880.prt + 0,4383$	0,9780
	SST	$Y = 1,0240.prt + 20,5000$	0,9777
Adicionadas de luteína	Acidez	$Y = 0,1090.prt + 0,3274$	0,9973
	SST	$Y = 0,9781.prt + 21,0181$	0,9897

prt = proteínas

Com o aumento do teor de proteínas, houve o aumento proporcional da acidez, mesmo o pH sendo ajustado para 4,0. Quando se mede o pH é quantificado a concentração de íons H⁺ (hidrogênio) em solução, como não houve a variação deste parâmetro, a concentração de íons H⁺ nas formulações não sofreu alterações. As formulações foram desenvolvidas com diferentes teores de proteínas, esta variação contribuiu para o aumento da acidez. A presença de aminoácidos com estruturas específicas assim como a adição de ácido cítrico às formulações contribuiu para tal

variação. Bebidas formuladas com maior concentração de proteína necessitou de uma maior quantidade de ácido cítrico para atingir o pH desejado. As proteínas de soro de leite possui uma estrutura que contribui para que elas sejam bastante estáveis em solução, atuando em uma faixa muito ampla de pH (TAULIER e CHALIKIAN, 2001; SGARBIERI, 2005). Este é chamado efeito tampão, em que mesmo com a adição de pequenas quantidades de ácido, o pH mantém-se constante.

Estudos têm demonstrado que as proteínas e seus aminoácidos contribuem para o aumento da acidez dos alimentos. Fox e Mcsweeney (1998) relataram que as substâncias responsáveis pela acidez natural do leite são os minerais como fosfatos e citratos, as proteínas (caseína e albumina) e o gás carbônico dissolvido. Lehninger et al. (2004) descrevem que as proteínas do soro são ricas nos aminoácidos lisina, histidina e arginina que são aminoácidos que possuem seus grupamentos laterais carregados positivamente, contribuindo conseqüentemente para o aumento na acidez.

Silva (2012) também observou o aumento da acidez titulável com aumento da concentração de proteínas de soro de leite ao realizar a substituição de diferentes teores de gordura dos sorvetes por proteínas de soro de leite. Gonzalez et al. (2011) encontraram valores de acidez titulável das amostras de iogurtes formuladas com leite desnatado de $14,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido láctico e das amostras formuladas com leite integral $13,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido láctico, esta diferença foi atribuída à presença de quantidades ligeiramente mais elevadas de proteína no leite desnatado em comparação com amostras de leite integral.

Tais estudos reforçam a hipótese levantada de que o aumento do teor de proteínas do soro de leite contribui para o aumento da acidez das bebidas. As proteínas do soro de leite abaixo do seu ponto isoelétrico possuem mais cargas positivas em solução, esta condição contribui diretamente para o aumento da acidez.

A concentração de proteína foi um dos parâmetros utilizados para diferenciar as formulações das bebidas. Os valores de proteínas encontrados nas formulações estão apresentados na Tabela 6. Verifica-se que estes valores estão dentro dos determinados para cada uma das formulações.

O permeado de soro de leite foi utilizado para as formulações com concentrações de proteína de 0,5%, uma vez que este produto possui um teor de proteína igual ao do soro utilizado para a microfiltração. A utilização deste ingrediente foi realizada com intuito de oferecer as indústrias uma alternativa viável para a

utilização deste soro fluído, sem a necessidade das etapas de concentração e secagem. A técnica de microfiltração permite a obtenção de um produto totalmente estéril, utilizando tratamento térmico relativamente brando, o que resulta em menores alterações dos componentes termolábeis, contribuindo para uma melhor digestibilidade deste produto.

O soro concentrado obtido por ultrafiltração foi utilizado nas formulações com 2,0% de proteína, tal ingrediente assim como o permeado de soro de leite é de alta qualidade, por possuir uma maior concentração das proteínas do soro e boa qualidade microbiológica, uma vez que é obtido por meio do soro que foi submetido à microfiltração.

O concentrado proteico de soro (WPC60) comercial foi utilizado para as formulações com maiores concentrações de proteína 4,0 e 6,0%. Este ingrediente possui uma alta concentração de proteína, podendo ser utilizado para todas as formulações, além de ser um produto disponível no mercado, de fácil utilização para as indústrias que não possuem os equipamentos de separação por membranas e secagem.

Das bebidas encontradas no mercado como fonte de proteínas pode-se destacar: leite, bebidas a base de soja, iogurte, bebidas lácteas entre outras. Uma porção de 200 mL de leite integral oferece ao consumidor cerca de 6,2 g de proteínas, que corresponde a 8,0% da recomendação diária. Para as bebidas com proteínas de soja, a mesma porção fornece cerca de 5,2 g de proteínas, correspondente a 7% da recomendação diária, enquanto as bebidas lácteas fornece 3,7 g de proteínas, que corresponde a 5% da recomendação diária. Para as bebidas desenvolvidas no presente estudo além de serem adicionadas de compostos bioativos com excelente capacidade antioxidante, as proteínas de soro de leite são de alta qualidade biológica, ricas em aminoácidos essenciais e cálcio, desempenhando uma série funções benéficas para o organismo humano. As bebidas formuladas com 4,0 e 6,0% de proteínas para cada porção de 200 mL fornecem 8,0 e 12,0 g de proteínas, respectivamente. A bebida com 6,0% de proteínas possui o dobro de proteínas que o leite integral na mesma porção, enquanto a com 4,0% possui o dobro de proteínas que a bebida láctea, justificando a potencialidade deste produto como fonte de proteínas.

As amostras de soro utilizadas se mostraram como ingredientes que contribuíram para aumentar o valor nutricional e funcional das formulações, cada um com suas particularidades, sendo que a qualidade das proteínas é a característica comum

entre elas. A concentração de proteínas afetou significativamente a maioria dos resultados físico-químicos apresentados pelas formulações.

3.2.2 Características Colorimétricas

O efeito do teor de proteínas nos valores de a^* (componente vermelho-verde) e valores de c^* (índice de saturação) das bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas, não foram significativos ($p > 0,05$). O teor de proteínas influenciou significativamente ($p < 0,05$) sobre os valores de L^* (luminosidade), b^* (componente amarelo-azul) e h^* (tonalidade cromática). Para os três parâmetros foram testados modelos de primeiro e segundo grau e apresentaram falta de ajustamento significativa ($p < 0,05$) ou os parâmetros da regressão para ambos os modelos não significativo ($p > 0,05$), portanto os modelos não foram considerados adequados para descrever estes parâmetros do sistema.

Os resultados das determinações colorimétricas das bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Valores médios das coordenadas colorimétricas dos formulados proteicos adicionados de extrato de antocianinas.

Coordenadas de cor	F1	F2	F3	F4
L^* – luminosidade	36,92±0,73	43,24±3,99	58,63±2,75	60,91±2,97
a^* – vermelho vs verde	11,10±1,53	10,18±0,48	11,42±1,36	10,06±1,63
b^* – amarelo vs azul	4,45±1,41	2,47±1,01	7,48±0,49	7,73±0,93
h^* – ângulo de tonalidade (graus)	21,60±4,45	13,43±4,60	33,42±4,44	37,79±6,22
c^* – saturação de cor (chroma)	11,99±1,87	10,50±0,71	13,69±0,98	12,74±1,25

F1: formulação com 0,5% de proteína; F2: formulação com 2,0% de proteína; F3: formulação com 4,0% de proteína; F4: formulação com 6,0% de proteína, todas as formulações adicionadas de extrato de antocianinas. Os valores representam a média de 3 repetições \pm desvio padrão.

O parâmetro a^* forneceu valores positivos para todas as bebidas, indicando coloração vermelha nas amostras avaliadas. Os valores referentes ao parâmetro b^* foram também positivos, indicando também a presença da coloração amarela. Observe-se que os valores de L^* (luminosidade) aumentaram com o aumento do teor de proteínas, ou seja, quanto mais proteína mais clara é a amostra.

No diagrama de cor, o parâmetro h^* representa o ângulo de tonalidade, onde o ângulo 0° representa vermelho puro; o 90° , o amarelo puro; o 180° , o verde puro e o 270° , o azul puro. No caso das bebidas formuladas com extratos de antocianinas, percebe-se que estes ângulos foram pequenos (13,43 a 37,79) graus para as quatro formulações. Com isso, observa-se que as bebidas desenvolvidas com extratos de antocianinas possuíam tonalidade variando entre o vermelho e amarelo.

Os valores de c^* variaram de 10,50 a 13,69, entre as formulações, tais valores são desejáveis, pelo fato de ser a expressão da cromaticidade das bebidas, ou seja, representa a quantidade da cor vermelha presente nas amostras avaliadas. Observou-se que o teor de proteínas não alterou os valores deste parâmetro.

Caldeira et al. (2010) avaliaram os parâmetros colorimétricos de 5 formulações diferentes de uma bebida láctea sabor morango, variando as concentrações de soro de leite e iogurte adicionado. Encontraram valores de L^* que variaram de 69,32 a 80,05, quanto mais alta a concentração de soro de leite, maior o valor do parâmetro L^* , já os valores de a^* diminuíram com o aumento da concentração de soro, variaram de 14 a 10,57, os valores de b^* aumentaram com o aumento da concentração de soro, 1,86 a 2,14. Os valores de a^* foram muito semelhantes aos encontrados no presente estudo, no entanto, foram influenciadas pela concentração de soro de leite adicionada às bebidas lácteas, enquanto que neste estudo os valores não foram influenciados pelo teor de proteínas de soro de leite.

Sari et al. (2012) verificaram os valores das coordenadas de cor L^* , c^* e h^* em modelos de bebidas formuladas com tampão citrato, pH 3,0 e adicionadas de antocianinas extraídas de jambolão (*Syzygium cumini*), os valores de L^* foi de 62,44, os valores de c^* de 24,89 e do ângulo de tonalidade h^* de 0,63. O valor de L^* foi muito próximo ao da formulação F4, entretanto, o valor da coordenada c^* foi superior ao encontrado no presente trabalho, evidenciando uma maior intensidade da coloração vermelha para as bebidas adicionadas de antocianinas de jambolão. Este fato pode ser explicado pelas diferenças de formulações e pelo valor de pH das bebidas.

Para as bebidas adicionadas de luteína, houve efeito significativo ($p < 0,05$) do teor de proteínas sobre todas as coordenadas colorimétricas apresentadas na Tabela 9. Foi possível ajustar um modelo matemático para os valores de b^* , c^* e h^* . Para as coordenadas L^* e a^* , foram testados modelos de primeiro e segundo grau e apresentaram falta de ajustamento significativa ($p < 0,05$) ou os parâmetros da regressão

para ambos os modelos não significativo ($p>0,05$), portanto os modelos não foram considerados adequados para descrever estes parâmetros do sistema.

Os resultados das determinações colorimétricas das bebidas proteicas adicionadas de luteína são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores médios dos parâmetros colorimétricos dos formulados proteicos adicionados de luteína.

Coordenadas de cor	F5	F6	F7	F8
L* – luminosidade	43,06±0,27	53,93±1,11	67,20±0,14	68,07±0,26
a* – vermelho vs verde	9,43±0,23	11,09±0,13	10,69±0,06	10,01±0,13
b* – amarelo vs azul	26,67±0,33	41,30±1,45	49,72±0,27	47,98±0,27
h*–ângulo de tonalidade (graus)	70,69±0,52	74,95±0,58	77,87±0,14	78,21±0,11
c* – saturação de cor (chroma)	28,25±0,31	42,77± 1,39	50,86±0,25	49,01±0,29

F5: formulação com 0,5% de proteína; F6: formulação com 2,0% de proteína; F7: formulação com 4,0% de proteína; F8: formulação com 6,0% de proteína, todas as formulações adicionadas de luteína. Os valores representam a média de 3 repetições ± desvio padrão.

Os valores de luminosidade (L*) aumentaram com o aumento do teor de proteínas, assim bebidas formuladas com teores de proteínas elevado apresentaram coloração mais clara em relação a aquelas formuladas com concentrações menores.

A influência do teor de proteínas sobre os valores de b*, c* e h* foi modelada estatisticamente pelas equações representadas na Tabela 10. Os modelos foram testados quanto à falta de ajuste para os modelos de primeiro e segundo grau e significância dos parâmetros da regressão, apresentando a falta de ajuste para o modelo de segundo grau não significativa ($p>0,05$) e parâmetros da regressão significativos ($p<0,05$) para os valores de b*, c* e h*. O coeficiente de determinação foi superior a 99%, indicando que as equações explicam a variação dos valores das coordenadas colorimétricas em função do teor de proteínas.

Tabela 10 – Modelagem estatística do efeito do teor de proteínas sobre os parâmetros b*, c* e h* dos formulados proteicos adicionados de luteína.

Determinação	Modelo de Regressão	R ²
b* - amarelo vs azul	$Y = -1,4003.prt^2 + 12,9335.prt + 20,6940$	0,9992
h* – ângulo de tonalidade	$Y = -0,3522.prt^2 + 3,6466.prt + 68,9883$	0,9996
c* – saturação de cor	$Y = -1,3927.prt^2 + 12,7767.prt + 22,3851$	0,9989

prt = teor de proteínas

Verifica-se através das equações que os valores máximos dos parâmetros b* e c* são encontrados com um teor de proteínas de 5,0%, acima desse teor de proteínas os valores desses parâmetros decrescem. Deste modo, teores de proteína superiores a 5,0%, contribuem para a diminuição da coloração amarela. Através da equação para o ângulo de tonalidade (h*), observa-se que ele atinge seu valor máximo na concentração de proteína de 6,0%, acima deste valor, os valores decrescem, distanciando da coordenada b*, indicando diminuição da coloração amarela.

Apesar dos parâmetros colorimétricos terem sofrido influência do teor de proteínas, todas as bebidas avaliadas obtiveram valores elevados para as coordenadas b* e c*, indicando possuir cor amarela brilhante e saturada, mesmo após as etapas de processamento a luteína adicionada manteve-se predominante.

3.3 Características Bioativas

Os teores de antocianinas totais, fenólicos totais e atividade antioxidante das formulações adicionadas e extrato de antocianinas são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Valores médios dos teores de antocianinas totais, fenólicos totais e atividade antioxidante das formulações adicionadas de extrato de antocianinas.

Determinações	Formulações			
	F1	F2	F3	F4
Antocianinas totais (mg·100 g ⁻¹)	1,53±0,32	1,59±0,70	1,77±0,36	1,37±0,09
Fenólicos Totais (mg AGE·100g ⁻¹)	32,57±0,98	55,31±3,19	74,02±2,53	83,61±6,15
Atividade Antioxidante (μmol·L ⁻¹ Trolox·g ⁻¹)	1,24±0,15	1,43±0,21	1,78±0,17	1,54±0,10

F1: formulação com 0,5% de proteína; F2: formulação com 2,0% de proteína; F3: formulação com 4,0% de proteína; F4: formulação com 6,0% de proteína, todas as formulações adicionadas de extrato de antocianinas. Os valores representam a média de 3 repetições ± desvio padrão.

Os teores de antocianinas totais não variaram significativamente ($p>0,05$) com o aumento do teor de proteínas das formulações, enquanto que para os teores de fenólicos e para a atividade antioxidante houve variação significativa ($p<0,05$) com o aumento do teor de proteínas das formulações. Os teores de antocianinas variaram entre 1,37 a 1,77 mg por cada 100g de bebida, verificou-se que houve a recuperação de cerca de 70 a 88% da quantidade de antocianinas adicionadas.

A influência do teor de proteínas sobre os teores de fenólicos totais e atividade antioxidante foi modelada estatisticamente pelas equações representadas na Tabela 12.

Os modelos foram testados quanto à falta de ajuste e significância dos parâmetros da regressão, apresentando a falta de ajuste para o modelo de segundo grau não significativa ($p>0,05$) e parâmetros da regressão significativos ($p<0,05$) para os teores de fenólicos totais e atividade antioxidante. O coeficiente de determinação foi superior a 99% para fenólicos totais e superior a 88% para a atividade antioxidante.

Tabela 12 – Modelagem estatística do efeito do teor de proteínas sobre os teores de fenólicos totais e atividade antioxidante das formulações adicionadas de extrato de antocianinas.

Determinação	Modelo de Regressão	R ²
Fenólicos Totais	$Y = -1,3528.prt^2 + 18,0000.prt + 24,1526$	0,9996
Atividade Antioxidante	$Y = -0,0381.prt^2 + 0,3157.prt + 1,0526$	0,8859

prt= teor de proteínas

Os valores de atividade antioxidante atinge seu valor máximo na formulação com 4,0% de proteína. A variação significativa nos valores de atividade antioxidante foi atribuída às deficiências durante a etapa de extração das antocianinas dos formulados, uma vez que foi adicionada uma mesma concentração do extrato, pode ter ocorrido perdas dos compostos antioxidantes durante as etapas de extração, contribuindo para tais variações.

Os teores de fenólicos totais das bebidas foram influenciados positivamente pelo teor de proteínas, ou seja, com o aumento de teor de proteínas, houve o aumento do teor de fenólicos. As proteínas de soro de leite são ricas em aminoácidos essenciais como cisteína, tirosina, triptofano e lisina, que atuam como interferentes nas análises de fenólicos totais. A metodologia espectrofotométrica de Folin-Ciocalteu é a mais utilizada para a determinação de compostos fenólicos totais, o princípio da técnica baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas, produzindo um complexo de coloração azul em meio alcalino. No entanto, esta reação quantifica todos os fenólicos em solução, as substâncias redutoras presentes naturalmente nos alimentos ou aquelas que foram intencionalmente adicionadas, tais substâncias interferem diretamente no resultado (ANGELO e JORGE, 2007).

Ribeiro (2012) avaliou a interferência de substâncias redutoras; ácido ascórbico, açúcares e alguns aminoácidos na análise de fenólicos totais nos frutos de camu-camu pelo método de Folin-Ciocalteu. Foi verificado que aminoácidos cisteína, triptofano e tirosina são passíveis de serem detectados por esta técnica, demonstrando uma resposta muito alta, que variou de 21, 56 mg·AGE·L⁻¹ para cisteína, 99,97 mg·AGE·L⁻¹ para triptofano e 107,84 mg·AGE·L⁻¹ para tirosina. Tal fato é decorrido, principalmente, devido à presença de substâncias aromáticas nas estruturas dos aminoácidos (tirosina e triptofano). Após realizar a purificação do extrato, verificou-se que a presença de ácido ascórbico, aminoácidos e açúcares, superestimaram os resultados na proporção de 17 a

21%, nos frutos analisados. O ácido ascórbico foi o composto que causou interferência majoritária nos resultados, por estar presente em maior proporção no fruto do que os demais interferentes, tal fato é justificado pelos altos teores de ácido ascórbico presente no fruto de camu-camu, acima de $1000 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$.

Observou-se que a interferência nos valores de fenólicos totais neste estudo, foi devido aos aminoácidos presentes nas proteínas do soro. Com base no teor de fenólicos totais presente no extrato de cascas de jabuticaba e no volume do extrato adicionado nas bebidas estimou-se tal interferência. Nas formulações com 0,5% de proteína, estima-se que o resultado foi superestimado em 17%, para as formulações com 2,0% de proteína estima-se que o resultado foi superestimado em 50%, para as demais formulações acima de 50%.

Em alimentos em que não se conhece a concentração de fenólicos presentes, é preciso realizar a purificação do analito, para que tenha um resultado preciso da análise. No presente estudo, era conhecida a concentração de fenólicos que foi adicionada às bebidas, por meio da análise prévia do extrato, por este motivo não foi necessária a etapa de purificação do extrato.

Os teores de carotenoides totais e atividade antioxidante das bebidas adicionadas de luteína são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Valores médios dos teores de carotenoides totais e atividade antioxidante das formulações adicionadas de luteína.

Determinações	Formulações			
	F5	F6	F7	F8
Carotenoides Totais ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$)	$2,46\pm 0,09$	$2,68\pm 0,14$	$2,57\pm 0,08$	$2,53\pm 0,20$
Atividade Antioxidante ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$)	$0,10\pm 0,002$	$0,09\pm 0,01$	$0,11\pm 0,01$	$0,10\pm 0,01$

F5: formulação com 0,5% de proteína; F6: formulação com 2,0% de proteína; F7: formulação com 4,0% de proteína; F8: formulação com 6,0% de proteína, todas as formulações adicionadas de luteína. Os valores representam a média de 3 repetições \pm desvio padrão. O teor de carotenoides totais foi expresso em mg de luteína por 100g de bebida.

Os teores de carotenoides totais e atividade antioxidante não variaram significativamente ($p>0,05$) com o aumento do teor de proteínas das formulações. Da concentração de luteína adicionada às bebidas, houve uma recuperação de cerca de 75% a 83% da luteína adicionada, pelo método de extração utilizado.

Foram adicionadas às formulações 3,2 mg de luteína por cada 100g da bebida, este valor foi definido com base a dados da literatura que determinam que uma concentração de 20 mg de luteína por dia é considerado seguro. A ausência de quaisquer efeitos adversos evidentes a partir de dados publicados disponíveis para ensaios clínicos em humanos e animais apresenta a luteína como um ingrediente com elevado grau de confiança para utilização nos alimentos, mas recomenda-se que não extrapole o valor determinado como seguro (SHAO e HATHCOCK, 2006).

Verifica-se que as bebidas proteicas desenvolvidas apresentam um teor de luteína considerável, quando comparados com alimentos dos quais a luteína está presente naturalmente. Nachtigall et al. (2007) avaliaram o teor de luteína em algumas hortaliças comumente consumidas no estado de Minas Gerais, entre elas acelga, agrião, almeirão, azedinho, mostarda, rúcula e alguns vegetais não convencionais, lobrobô, serralha e taioba. Em termos de luteína, a rúcula destacou-se como a fonte mais promissora (5,12 mg·100 g⁻¹), o lobrobô apresentou teores que variou de (4,76 mg·100 g⁻¹ a 3,50 mg·100 g⁻¹), extraídos por meio de etanol e tetraidrofurano, respectivamente. A proporção de luteína em relação ao total de carotenoides foi elevada nas hortaliças amargas, como, almeirão, azedinho e rúcula.

O estudo realizado por Aryana et al. (2006) também avaliou teores de luteína adicionados à produtos lácteos, no entanto, a quantificação foi por cromatografia líquida de alta eficiência. Foram adicionados teores de luteína (0, 0,5, 1,5, e 3,0 mg) ao iogurte e avaliado a estabilidade deste composto durante 5 semanas de armazenamento. O estudo mostrou que houve uma boa recuperação dos teores de luteína adicionados pelo método de extração e quantificação utilizada, o pequeno decréscimo nestes teores ao final do estudo foi devido ao período de armazenamento.

A atividade antioxidante das bebidas adicionadas de luteína foi inferior à atividade antioxidante das bebidas adicionadas de antocianinas conforme apresentado pela Tabela 11. As diferenças das estruturas químicas dos carotenoides e dos fenólicos levam a uma capacidade antioxidante diferente entre estes compostos. O número de duplas ligações conjugadas afeta a coloração e a capacidade antioxidante dos carotenoides. Porém, a atividade antioxidante é afetada pela dupla conjugada do anel, a ação sequestrante de radicais é proporcional ao número de duplas ligações conjugadas, presentes nas moléculas dos carotenoides (STRINGHETA et al., 2007).

As amostras de luteína extraídas foram solubilizadas em etanol absoluto e submetidas a uma análise de varredura por espectrofotometria no UV-VIS entre 350 e 550 nm, onde se obteve como comprimento de onda de máxima absorção o valor de 445 nm.

O espectro de absorção da luteína extraída dos formulados proteicos adicionados de luteína são apresentados na Figura 7.

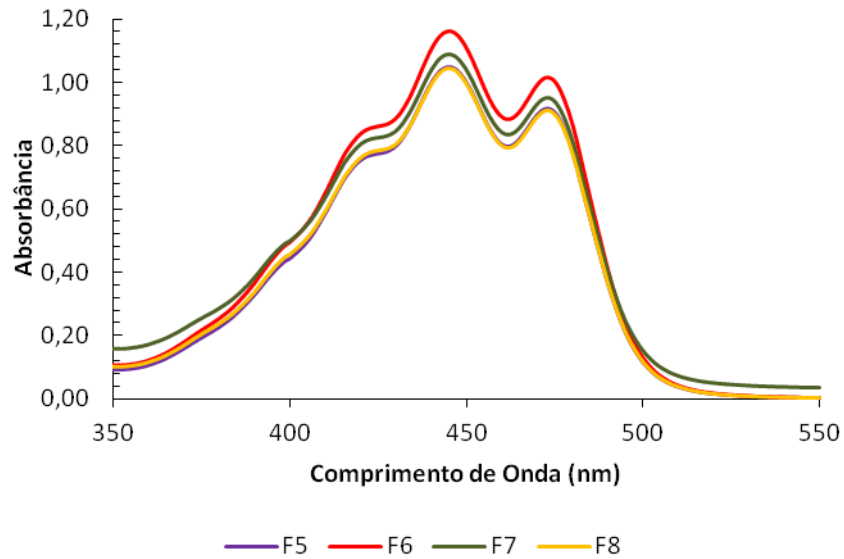


Figura 7 – Espectro de absorção da luteína extraída dos formulados, obtido no espectrofotômetro Shimadzu UV-Visível 1601PC.

Verificou-se que os espectros de absorção apresentados na Figura 7, são característicos da luteína, a absorbância apresentada por cada formulação no comprimento de onda de máxima absorção está diretamente relacionada com o teor de luteína presente em cada bebida, F6 foi a que apresentou maior valor de absorbância, assim apresentou maior concentração de luteína, quanto comparado com as demais formulações. F5 e F8 mostraram seus espectros de absorção quase que sobrepostos, indicando que os teores de luteína de cada uma delas foram muito próximos.

3.4 Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas com o intuito de verificar a eficiência do tratamento térmico assim como a ocorrência de alguma contaminação pós-processamento que colocasse em risco a segurança do consumidor. A qualidade microbiológica das bebidas foi avaliada para verificar a presença de micro-organismos resultantes da contaminação pela matéria-prima, embalagem, ambiente de processamento e manipuladores.

Na Tabela 14 são apresentados os resultados das análises microbiológicas realizadas nas diferentes formulações de bebidas adicionadas de extrato de antocianinas.

Tabela 14 – Análise microbiológica das bebidas formuladas com extrato de antocianinas

Contagem (UFC·mL ⁻¹)	Formulações			
	F1	F2	F3	F4
Mesófilos aeróbios	<10	1,0 x 10 ¹	2,0 x 10 ¹	1,1 x 10 ²
Coliformes	<10	<10	<10	<10
<i>Escherichia coli</i>	<10	<10	<10	<10
<i>Staphylococcus aureus</i>	<10	<10	<10	<10

F1: formulação com 0,5% de proteína; F2: formulação com 2,0% de proteína; F3: formulação com 4,0% de proteína; F4: formulação com 6,0% de proteína, todas as formulações adicionadas de extrato de antocianinas. Os valores representam a média de 3 repetições.

As formulações F1, F2, F3 e F4 apresentaram contagem inferior a 1 UFC·mL⁻¹ para os micro-organismos *Escherichia coli*, coliformes e *Staphylococcus aureus*. Para mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos a formulação F1 também apresentou contagem inferior a 1 UFC·mL⁻¹, enquanto para as formulações F2, F3 e F4 foram encontradas contagens de 1,0 x 10¹, 2,0 x 10¹ e 1,1 x 10² UFC·mL⁻¹, respectivamente. Não há uma legislação específica para bebidas proteicas, que determina seus padrões microbiológicos, no entanto ao observarmos a legislação de bebida láctea, verifica-se que a única diferença que há entre a bebida estudada e a bebida láctea é a adição de leite.

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 outros produtos alimentícios (BRASIL, 2005). Os valores das contagens de mesófilos aeróbios e coliformes encontrados nas bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas foram inferiores aos padrões microbiológicos estabelecidos para a bebida láctea pasteurizada.

Observou-se que a formulação F1 foi a que apresentou menor contagem quando comparada as demais. Este resultado obtido foi devido à qualidade da matéria-prima utilizada; apesar de todas as formulações terem sido tratadas termicamente, a formulação F1 foi produzida utilizando permeado de soro de leite obtido pela operação de separação de microfiltração, que elimina todos os micro-organismos alteradores, dentro do limite de detecção da técnica. Isto mostra a importância do controle da qualidade da matéria-prima para obtenção de um produto final com as características desejadas. Outra justificativa é que a membrana de microfiltração é estéril, o que não ocorre com a membrana de ultrafiltração, sendo considerada também uma fonte de contaminação do retentado, utilizado nas formulações com 2,0% de proteína.

Uma provável fonte de contaminação das formulações é o ambiente de processamento. A média das contagens de mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos encontrados durante o envase das bebidas adicionadas de antocianinas e das adicionadas de luteína foi de $1,1 \times 10^2$ UFC·cm⁻²·semana⁻¹ e $1,8 \times 10^2$ UFC·cm⁻²·semana⁻¹, respectivamente. Os valores recomendados para a contaminação em ambientes de processamento de alimentos é que não seja superior a 30 UFC·cm⁻²·semana⁻¹ (APHA, 1992, citado por ANDRADE, 2008). Os valores encontrados estão acima do recomendado confirmado que o ambiente de processamento contribui para a contaminação das bebidas.

As contagens de mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos encontrados nas formulações F2, F3 e F4 podem ser justificadas pela ocorrência de contaminação durante o processamento, por falhas durante a manipulação do produto, ambiente de processamento e higienização dos utensílios utilizados.

Os resultados das análises microbiológicas das bebidas proteicas adicionadas de luteína são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Análise microbiológica das bebidas formuladas com luteína

Contagem (UFC·mL ⁻¹)	Formulações			
	F5	F6	F7	F8
Mesófilos aeróbios	1,4 x 10 ²	1,9 x 10 ²	3,0 x 10 ²	3,6 x 10 ²
Coliformes	<10	<10	<10	<10
<i>Escherichia coli</i>	<10	<10	<10	<10
<i>Staphylococcus aureus</i>	<10	<10	<10	<10

F5: formulação com 0,5% de proteína; F6: formulação com 2,0% de proteína; F7: formulação com 4,0% de proteína; F8: formulação com 6,0% de proteína, todas as formulações adicionadas de luteína. Os valores representam a média de 3 repetições.

As bebidas proteicas adicionadas de luteína apresentaram contagem inferior a 1 UFC·mL⁻¹ para os micro-organismos *Escherichia coli*, coliformes e *Staphylococcus aureus*. Para a enumeração de mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos as formulações F5, F6, F7 e F8 apresentaram contagens que variaram de 1,4 x 10² a 3,6 x 10² UFC·mL⁻¹.

A formulação que obteve as menores contagens foi a F5, formulada com permeado de soro de leite, obtido por microfiltração. As contagens de mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos assim como as encontradas nas bebidas adicionadas de antocianinas, podem ser justificadas por alguma falha ocorrida durante o processamento e manipulação do produto. Caldeira et al. (2010) avaliaram a qualidade microbiológica de bebidas lácteas sabor morango pasteurizada, e encontraram valores de mesófilos aeróbios que variaram de 1,1 x 10³ a 8,9 x 10³ UFC·mL⁻¹. Estes valores foram superiores aos encontrados no presente trabalho.

Zubiolo et al. (2012) avaliaram a presença de mesófilos aeróbios em duas formulações de bebidas lácteas pasteurizadas produzidas com soro de leite e soro de leite em pó, encontrando contagens de 1,0 x 10² e 1,5 x 10² UFC·mL⁻¹, respectivamente. Os resultados apresentados em ambos os estudos foram inferiores aos estabelecidos pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea para bebida láctea pasteurizada, que permite o máximo de duas amostras, em cinco analisadas, contendo contagens entre 7,5x10⁴ UFC·mL⁻¹ e 1,5x10⁵ UFC·mL⁻¹ de mesófilos aeróbios.

Deste modo, os resultados indicaram que o preparo das bebidas foi realizado atendendo às Boas Práticas de Fabricação (BPF), possibilitando a obtenção de um produto microbiologicamente seguro.

3.5 Viscosidade

Os resultados mostraram que as formulações contendo 4% de proteínas (F3 e F7) apresentaram viscosidade de 21,37 e 26,02 mPa.s, respectivamente, enquanto para as formulações contendo 6% de proteínas (F4 e F8), os valores de viscosidade foram de 61,83 e 54,04 mPa.s, respectivamente. Para as demais formulações os resultados de viscosidade foram expressos como menor que 20 mPa.s, devido ao sensor utilizado possuir um limite de detecção acima deste valor. A partir dos resultados, pode-se inferir que a concentração de proteínas alterou a viscosidade das bebidas.

O aumento da viscosidade relacionado com o aumento do teor de proteínas ocorre devido às propriedades de agregação e capacidade de retenção de água das proteínas de soro de leite (WALSTRA et al., 2006).

Outro fator importante que contribuiu para o aumento da viscosidade foi o tratamento térmico a que as bebidas foram submetidas (63 °C/30minutos). Parte das proteínas do soro desnaturam e ligam-se à outras moléculas por interações hidrofóbicas e pontes dissulfídicas, formando redes que aumentam a resistência ao escoamento do fluido.

O tratamento térmico induz uma mudança conformacional que resulta na exposição dos grupamentos tiol que pode formar ligações dissulfeto com outras proteínas contendo cisteína, como a β -lactoglobulina. A formação de ligações dissulfeto intermoleculares é essencial para a formação de géis de proteínas do soro e de estrutura de espuma estável, além de contribuir para o aumento da viscosidade (FOX e MCSWEENEY, 1998).

Os valores de viscosidade podem influenciar de forma diferenciada na aceitabilidade sensorial dos produtos alimentícios. Durante o processamento de iogurtes é desejável que haja a desnaturação proteica, por facilitar a formação do gel (LUCY e SINGH, 1998). Por outro lado, o aumento da viscosidade geralmente não é apreciado em bebidas por interferir na fluidez do produto final.

3.6 Aceitabilidade Sensorial

3.6.1 Impressão Global

Dos 112 consumidores que participaram da análise sensorial para impressão global das bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas, 60,72% eram do sexo feminino e 39,28% do sexo masculino. As idades dos consumidores variaram entre 15 a 59 anos, sendo a idade média de 25 anos, e o desvio-padrão de 10,51 anos. Observou-se a predominância de consumidores jovens e adultos, correspondendo a 73% dos consumidores. Devido ao teste sensorial ter sido realizado em um laboratório localizado em uma universidade, a maioria dos participantes foram estudantes de graduação, pós-graduação e funcionários da instituição, justificando a predominância desses julgadores.

Os resultados da avaliação da impressão global das bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Médias dos julgamentos para impressão global das bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas.

Formulações	Médias dos Julgamentos
F3	6,33 ^a
F1	6,16 ^a
F2	6,00 ^a
F4	5,63 ^b

F1: 0,5% de proteína; F2: 2,0% de proteína; F3: 4,0% de proteína, F4: 6,0% de proteína, todas as formulações adicionadas de extrato de antocianinas. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($p > 0,05$).

As formulações das bebidas proteicas adicionadas de antocianinas F1, F2 e F3 não diferiram significativamente ($p > 0,05$) entre si pelo teste de Tukey, em relação à impressão global, no entanto diferiram significativamente ($p < 0,05$) da formulação F4. As notas das formulações F1, F2 e F3 ficaram na escala hedônica (entre 6 e 7, ou seja, “gostei ligeiramente” a “gostei moderadamente”), enquanto a nota da formulação F4 na escala hedônica ficou (entre 5 e 6, ou seja, “indiferente” a “gostei ligeiramente”). Os julgadores não perceberam diferenças significativas entre as bebidas F1, F2 e F3, sendo consideradas estatisticamente iguais.

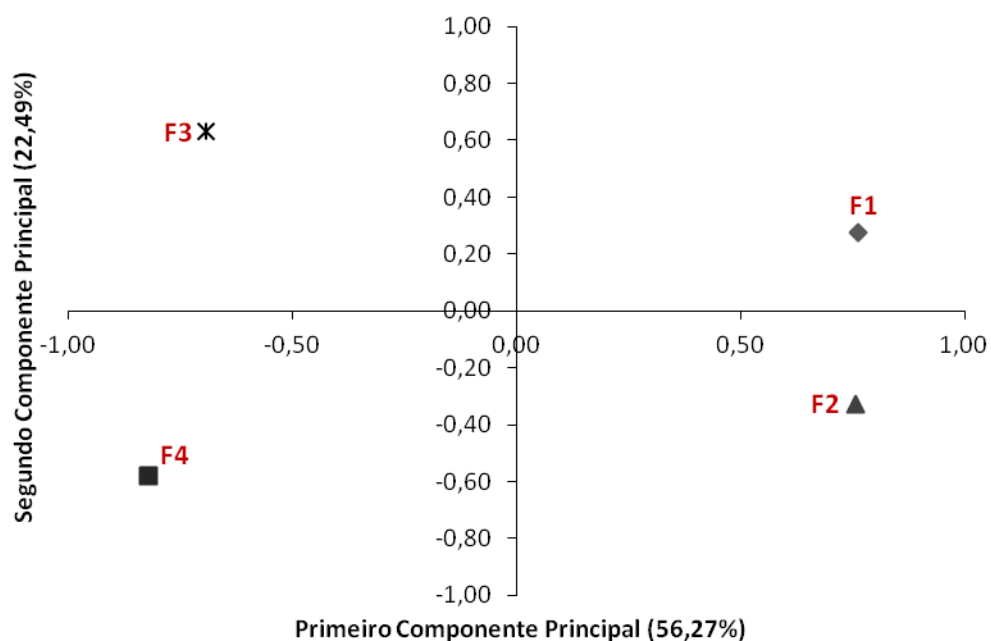
Os resultados dos testes de aceitação sensorial podem ser geralmente avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e testes de comparações de médias,

no entanto, são desconsideradas as individualidades dos julgadores, uma vez que são calculadas as médias dos julgamentos por cada amostra avaliada. O mapa de preferência é uma técnica que permite a comparação das preferências e aceitações e as relaciona com as características de qualidade do produto, considerando as individualidades de cada julgador, por meio da utilização de procedimentos estatísticos multivariados, assim obtêm a representação gráfica das diferenças de aceitação, entre as diversas amostras avaliadas (MINIM, 2010).

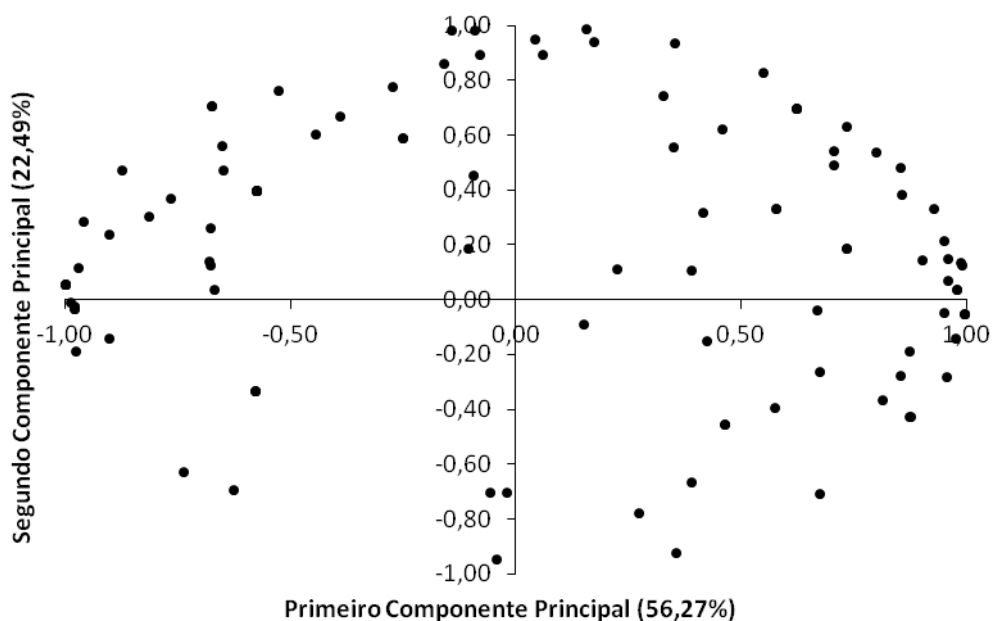
Com os dados obtidos no teste de aceitação para as quatro formulações de bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas foi realizada a análise do Mapa de Preferência interno.

Na Figura 8, o primeiro componente principal explica 56,27% da variação de aceitação entre as amostras das bebidas proteicas e o segundo, 22,49%. Os dois primeiros componentes explicam 78,76% da variância entre as amostras quanto a sua aceitação, sendo considerados suficientes para discriminar as amostras quanto à impressão global.

No mapa de preferência, os consumidores estão representados por pontos onde cada abscissa e ordenada de um ponto é, respectivamente, a correlação linear entre o consumidor e os componentes principais. A correlação dos consumidores com pelo menos um dos componentes indica diferença na aceitação das formulações. Desta forma, os consumidores localizados na região central dos gráficos não correlacionam com nenhum dos componentes, não sendo capaz perceber as diferenças entre as formulações.



A: Dispersão das amostras de bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas em relação à aceitação dos consumidores.



B: Correlação entre a aceitação de cada consumidor e os dois componentes principais.

F1: 0,5% de proteína; F2: 2,0% de proteína; F3: 4,0% de proteína, F4: 6,0% de proteína, todas as formulações adicionadas de extrato de antocianinas.

Figura 8 - Mapa de preferência interno em relação à impressão global para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas.

Na Figura 8, o primeiro gráfico representa a dispersão das amostras em relação aos dois componentes principais, e o segundo gráfico representa a correlação entre os dados de aceitação dos consumidores e os dois componentes principais. Cada ponto representa a avaliação sensorial de um consumidor.

A dispersão das amostras na representação gráfica indica a formação de quatro grupos. O primeiro grupo constituído pela amostra F1 presente no primeiro quadrante. O segundo formado pela amostra F3 presente no segundo quadrante. O terceiro formado pela amostra F4 no terceiro quadrante. E o quarto grupo formado pela amostra F2 no quarto quadrante.

Um grupo pequeno de consumidores correlacionou negativamente com o primeiro e segundo componente principal, tendendo a aceitação da bebida F4. Houve uma distribuição homogênea dos consumidores em relação aos componentes principais, para as bebidas F1, F2 e F3, indicando que elas foram igualmente aceitas.

Tanto os dados analisados por análise de variância (ANOVA) quanto por análise multivariada (análise de componentes principais) levou a mesma conclusão dos resultados, que tanto bebidas formuladas com baixa concentração de proteínas (0,5% e 2%), como as formuladas com uma maior concentração proteínas (4%) foram bem aceitas pelos consumidores. Entretanto, a bebida F4 foi a que obteve menor aceitação, a alta concentração de proteína levou a uma maior viscosidade em relação às demais formulações, que não foi apreciada pelos consumidores. Além disso, a alta concentração de proteínas interferiu na cor do formulado, atributo este decisivo para determinar a aceitação de um produto pelos consumidores.

A avaliação da impressão global das bebidas proteicas adicionadas de luteína foi realizada com 114 consumidores, sendo que 63,15% eram do sexo feminino e 36,85% do sexo masculino. A idade dos consumidores variou de 16 a 64 anos, com média de 26 anos e desvio-padrão de 10,19 anos. Houve predominância de participantes jovens e adultos, correspondendo 80,7% dos consumidores.

Os resultados da avaliação da impressão global das bebidas proteicas adicionadas de luteína são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 – Médias dos julgamentos para impressão global das bebidas proteicas adicionadas de luteína.

Formulações	Médias dos Julgamentos
F6	7,11 ^a
F8	6,40 ^b
F5	6,33 ^b
F7	6,27 ^b

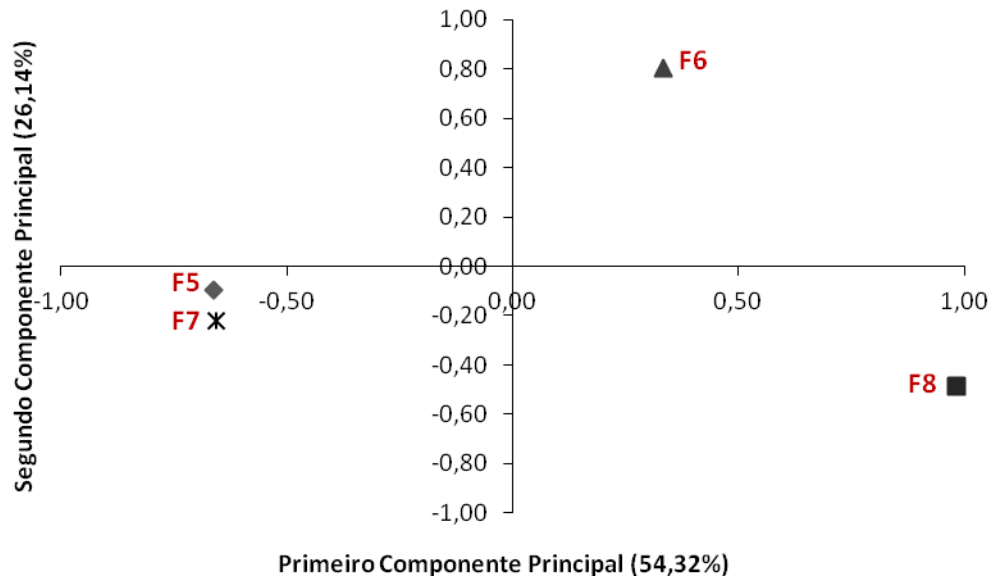
F5: 0,5% de proteína; F6: 2,0% de proteína; F7: 4,0% de proteína, F8: 6,0% de proteína, todas as formulações adicionadas de luteína. Médias seguidas por uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($p>0,05$).

A bebida proteica F6 foi a que obteve a maior aceitação dos consumidores em relação à impressão global, deferindo significativamente ($p<0,05$) das bebidas proteicas F5, F7 e F8 que, por sua vez, não diferiram significativamente ($p>0,05$) entre si. As notas das formulações F5, F7 e F8 variaram na escala hedônica entre 6 e 7 correspondendo a “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”. A nota da formulação F6 na escala hedônica ficou entre 7 e 8, ou seja, “gostei moderadamente” e “gostei muito”.

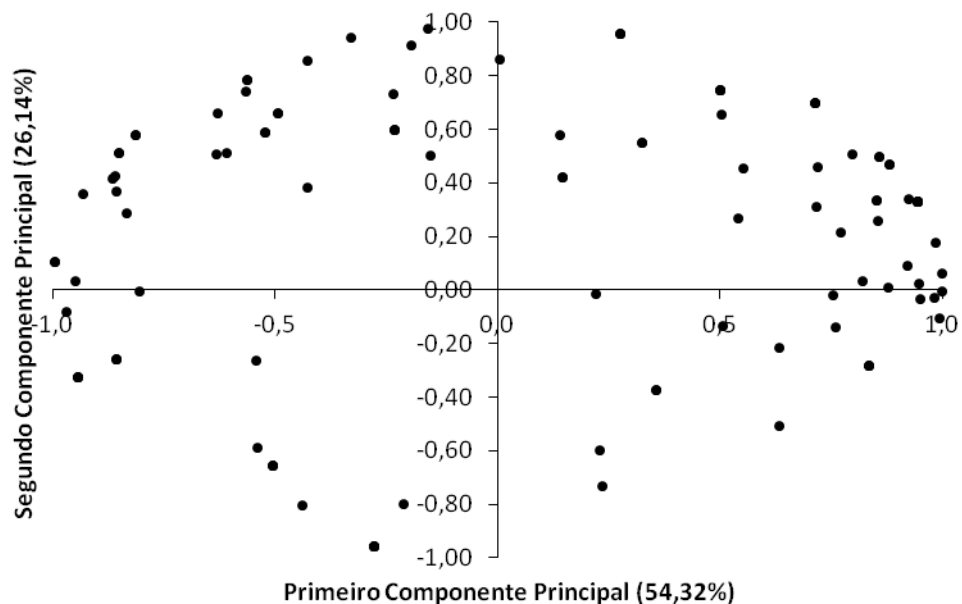
Com os dados obtidos no teste de aceitação para as quatro formulações de bebidas proteicas adicionadas de luteína foi realizada a análise do Mapa de Preferência Interno.

Na Figura 9, o primeiro componente explica 54,32% da variação de aceitação entre as amostras das bebidas proteicas e o segundo, 26,14%. Os dois primeiros componentes explicam 80,46% da variância entre as amostras quanto a sua aceitação, sendo considerados suficientes para discriminar as amostras quanto à impressão global.

A dispersão das amostras na representação gráfica indica a formação de três grupos. O primeiro grupo constituído pela amostra F6 presente no primeiro quadrante. O segundo formado pela amostra F5 e F7 no terceiro quadrante. E o terceiro grupo formado pela amostra F8 no quarto quadrante.



A: Dispersão das amostras de bebidas proteicas adicionadas de luteína em relação à aceitação dos Consumidores.



B: Correlação entre a aceitação de cada consumidor e os dois componentes principais.

F5: 0,5% de proteína; F6: 2,0% de proteína; F7: 4,0% de proteína, F8: 6,0% de proteína, todas as formulações adicionadas de luteína.

Figura 9 - Mapa de preferência interno em relação à impressão global para as bebidas proteicas adicionadas de luteína.

A maioria dos consumidores correlacionaram positivamente com o primeiro e segundo componente principal, tendendo a aceitação da formulação F6. Um pequeno grupo de consumidores correlacionaram negativamente com o primeiro e segundo

componente principal, tenderam a aceitação das bebidas F5 e F7, um comportamento semelhante observou-se para a formulação F8.

Os resultados obtidos pela análise de variância e por meio da análise multivariada (mapa de preferência) levaram a conclusões semelhantes, em que a formulação com maior aceitação foi a F6 e as formulações F5, F7 e F8 foram igualmente aceitas.

Felberg et al. (2010) encontraram resultados parecidos ao avaliarem a aceitação sensorial de bebidas de soja sabor café por meio do mapa de preferência interno e análise de variância. As diferentes formulações foram obtidas variando a concentração do extrato hidrossolúvel de soja e do café solúvel. Os resultados apresentados pela análise de variância e pelo mapa de preferência levaram a conclusões muito semelhantes, indicando boa correlação entre os dois tipos de análises dos dados. Além disso, o mapa de preferência possibilitou distinguir três grupos de consumidores distintos, indicando que a aceitação de cada um dos grupos variou com a forma em que a bebida foi apresentada (quente ou fria) e hábito de consumo deste produto pelos avaliadores.

Avaliando o mapa de preferência observou-se que a formulação F8 ficou entre as amostras que apresentou menor aceitação sensorial, isto pode ser atribuído a maior viscosidade apresentada por este produto, devido à alta concentração de proteínas.

As bebidas proteicas adicionadas de antocianinas com maior aceitação foram F1, F2 e F3, enquanto que das adicionadas de luteína a formulação F6 foi a mais aceita. Observou-se diferenças entre a aceitabilidade sensorial das bebidas adicionadas de antocianinas e de luteína. Estas diferenças foram atribuídas ao tipo de corante utilizado: o extrato de antocianinas foi adicionado puro, enquanto que a luteína foi adicionada em forma de pó contendo carreador (amido modificado, amido de milho e xarope de glicose). Este pode ter contribuído para o aumento da viscosidade das bebidas, interferindo na aceitabilidade sensorial das formulações contendo maior teor de proteínas.

3.6.2 Cor

A aceitação sensorial do atributo cor foi determinada pelo mesmo grupo de consumidores que avaliaram a impressão global das formulações. Assim, 112 consumidores avaliaram a cor das bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas e 114 consumidores avaliaram a cor das bebidas proteicas adicionadas de luteína.

Os resultados da avaliação da cor das bebidas proteicas adicionadas de antocianinas são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Médias dos julgamentos para o atributo cor das bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas.

Formulações	Médias dos Julgamentos
F3	6,32 ^a
F2	6,20 ^a
F1	5,83 ^b
F4	5,72 ^b

F1: 0,5% de proteína; F2: 2,0% de proteína; F3: 4,0% de proteína, F4: 6,0% de proteína, todas as formulações adicionadas de extrato de antocianinas. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($p > 0,05$).

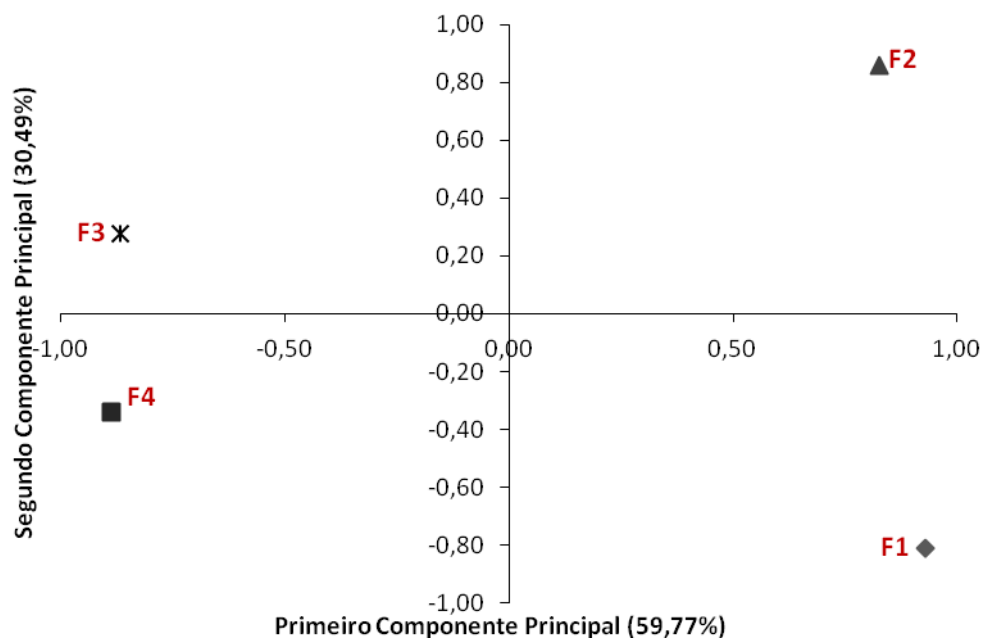
As médias das formulações F2 e F3 não diferiram significativamente ($p > 0,05$) entre si quanto ao atributo cor, o que também foi observado para as formulações F1 e F4. Entretanto, as bebidas F2 e F3 diferiam significativamente ($p < 0,05$) das outras duas.

Observa-se que as formulações F3 e F2 foram as que obtiveram maior nota média dos julgamentos, sendo as mais aceitas pelos consumidores quanto ao atributo cor. Suas médias situaram na escala hedônica entre 6 e 7, ou seja, “gostei ligeiramente” a “gostei moderadamente”, enquanto para as formulações F1 e F4 as médias situaram entre 5 e 6, ou seja, “indiferente” a “gostei ligeiramente”, sendo portanto as menos aceitas.

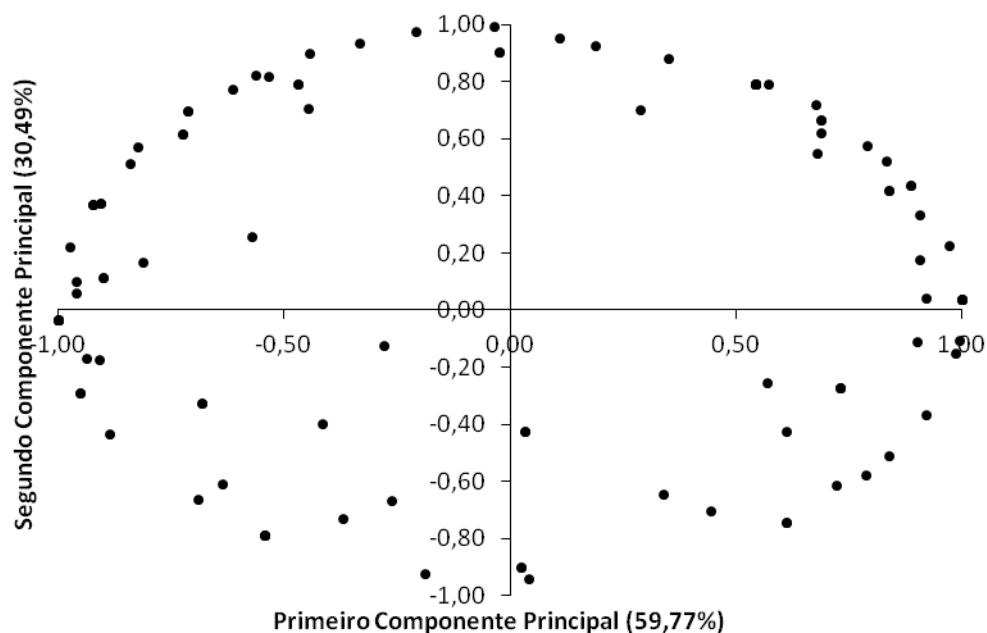
As bebidas formuladas com maior e menor concentração de proteínas F1 e F4, respectivamente, foram as que apresentaram menor aceitação pelos consumidores em relação ao atributo cor. A uma mesma concentração de extrato de antocianinas, a alta concentração de proteína tornou a cor vermelha mais diluída e clara, devido ao aumento de luminosidade; enquanto para a menor concentração, a coloração vermelha foi mais

intensa, devido à menor luminosidade. Tais extremos não foram aceitos pelos consumidores.

Na Figura 10, o primeiro componente explica 59,77% da variação de aceitação entre as amostras das bebidas proteicas e o segundo, 30,49%. Os dois primeiros componentes explicam 90,26% da variância entre as amostras, sendo considerados suficientes para discriminar as amostras quanto ao atributo cor.



A: Dispersão das amostras de bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas em relação à aceitação dos Consumidores.



B: Correlação entre a aceitação de cada consumidor e os dois componentes principais.

F1: 0,5% de proteína; F2: 2,0% de proteína; F3: 4,0% de proteína, F4: 6,0% de proteína, todas as formulações adicionadas de extrato de antocianinas.

Figura 10 - Mapa de preferência interno em relação ao atributo cor para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas.

A representação gráfica da dispersão das amostras indica a formação de quatro grupos. O primeiro grupo constituído pela amostra F2 presente no primeiro quadrante. O segundo formado pela amostra F3 presente no segundo quadrante. O terceiro formado pela amostra F4 no terceiro quadrante. E o quarto grupo formado pela amostra F1 no quarto quadrante.

Partes dos consumidores correlacionaram positivamente com o primeiro e segundo componente principal, isto mostra que os consumidores tenderam a aceitação das bebidas F2 e F3 dispersas nestes dois quadrantes, quanto ao atributo cor. Houve grupo de consumidores que correlacionaram negativamente com segundo componente principal, tendendo a aceitação das bebidas F1 e F4, e alguns consumidores situaram-se no centro do gráfico não correlacionando com nenhum dos componentes.

Não houve nenhuma tendência apresentada pelos consumidores, nenhuma das amostras foi influenciada diretamente pela opinião de um grupo de consumidores, indicando que o atributo cor das bebidas adicionadas de extrato de antocianinas foi avaliado de forma semelhante entre as formulações.

Os resultados da avaliação da cor das bebidas proteicas adicionadas de luteína são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Médias dos julgamentos para o atributo cor das bebidas proteicas adicionadas de luteína.

Formulações	Médias dos Julgamentos
F6	7,39 ^a
F7	7,16 ^{a, b}
F5	6,52 ^{b, c}
F8	6,85 ^c

F5: 0,5% de proteína; F6: 2,0% de proteína; F7: 4,0% de proteína, F8: 6,0% de proteína, todas as formulações adicionadas de luteína. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($p > 0,05$).

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os seguintes pares de formulações: F6 e F7, F7 e F5, F5 e F8. No entanto as formulações F6 e F8 diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre si quanto ao atributo cor. O mesmo observou-se entre as formulações F6 e F5 e entre as formulações F7 e F8.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 19, as formulações F6 e F7 foram as que obtiveram maior média de julgamentos, quanto à cor. Suas médias situaram na escala hedônica entre 7 e 8, ou seja, “gostei moderadamente” a “gostei

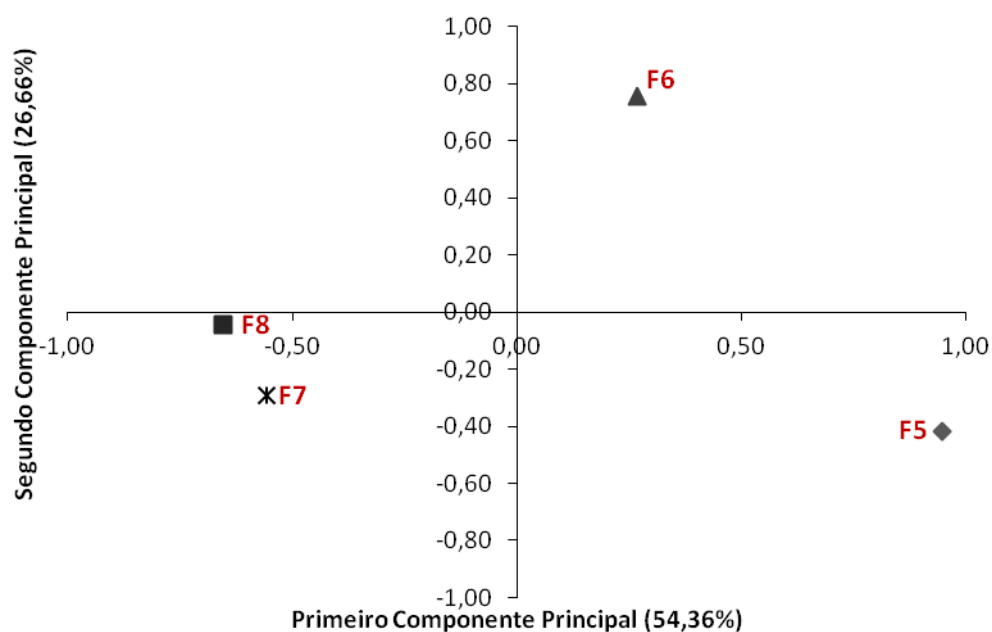
muito”, enquanto para as formulações F5 e F8 as médias dos julgamentos na escala hedônica situaram entre 6 e 7, ou seja, “gostei ligeiramente” a “gostei moderadamente”, sendo portanto as menores médias.

A formulação das bebidas adicionadas de luteína que obteve menor aceitação quanto à cor foi a desenvolvida com maior concentração de proteína. Este resultado mostra que para formular uma bebida proteica com alta concentração de proteína é preciso também aumentar a concentração dos corantes adicionados. Assim é possível diminuir a luminosidade e aumentar a intensidade da cor contribuindo para melhor aceitação dos consumidores.

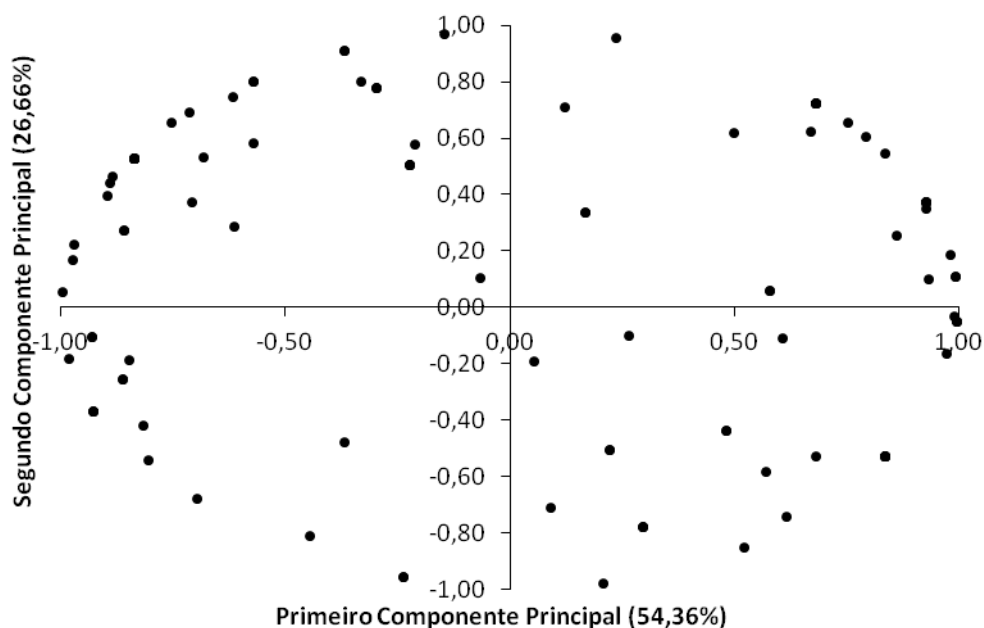
As formulações que obtiveram maiores médias de aceitação em relação à cor foram aquelas adicionadas de luteína. As formulações adicionadas de extrato de antocianinas obtiveram as menores notas, tal fato pode ser explicado pela maior intensidade da coloração das antocianinas ser apresentada em pH abaixo de 3,5, como os formulados foram ajustados para o pH igual a 4,0 a cor vermelha não foi tão intensa. As antocianinas são comercialmente usadas em soluções ácidas como em refrigerantes, pH entre 2,5 e 3,8, em que apresentam cor vermelha. Para aplicação geral, o pH entre 1,0 e 3,5 confere maior estabilidade ao pigmento (BARROS e STRINGHETA, 2006; SILVA et al., 2012).

Na Figura 11, o primeiro componente explica 54,36% da variação de aceitação entre as amostras das bebidas proteicas e o segundo, 26,66%. Os dois primeiros componentes explicam 81,02% da variância entre as amostras quanto a sua aceitação, sendo considerados suficientes para discriminar as amostras quanto ao atributo cor.

A representação gráfica da dispersão das amostras indica a formação de três grupos. O primeiro grupo constituído pela amostra F6 situada no primeiro quadrante. O segundo formado pela amostra F7 e F8 presente no terceiro quadrante. O terceiro formado pela amostra F5 no quarto quadrante.



A: Dispersão das amostras de bebidas proteicas adicionadas de luteína em relação à aceitação dos Consumidores.



B: Correlação entre a aceitação de cada consumidor e os dois componentes principais.

F5: 0,5% de proteína; F6: 2,0% de proteína; F7: 4,0% de proteína, F8: 6,0% de proteína, todas as formulações adicionadas de luteína.

Figura 11 - Mapa de preferência interno em relação ao atributo cor para as bebidas proteicas adicionadas de luteína.

Como se pode observar a separação espacial das formulações para a cor foi muito semelhante quando comparado à impressão global, ou seja, os grupos sugeridos pela análise dos dados da impressão global são semelhantes aos sugeridos para os dados de cor, diferindo apenas a disposição de 2 formulações, os consumidores se encontram localizados nos mesmos quadrantes. Isto mostra que a cor é tão importante para o consumidor discriminar uma amostra, quanto ao sabor e aroma do produto.

Os gráficos representados na Figura 11 mostram uma dispersão uniforme dos consumidores nos quatro quadrantes. A maior parte dos consumidores correlacionaram positivamente com o primeiro e segundo componente principal, a outra parte dos consumidores correlacionaram negativamente com o primeiro e segundo componente principal. Com base na dispersão das amostras verifica-se que a formulação que obteve maior aceitação sensorial quanto ao atributo cor foi a F6 e a que obteve a menor aceitação foi a F5.

Com base nos resultados de aceitabilidade sensorial das bebidas proteicas adicionadas de compostos bioativos foram escolhidas duas formulações mais aceitas pelos consumidores quanto à impressão global e cor para que fossem submetidas ao estudo de estabilidade. Diante dos resultados apresentados, a formulação F6 (com 2,0% de proteína) foi escolhida como a mais aceita quanto à impressão global, e estar entre as mais aceitas quanto à cor, representando, portanto o grupo das formulações adicionadas de luteína. A formulação F3 (com 4,0% de proteína) foi escolhida para o estudo de estabilidade, uma vez que estava dentre o grupo das mais aceitas, quanto à cor e impressão global, das bebidas adicionadas de extrato de antocianinas, além disso, possui a maior concentração de proteínas dentre as formulações mais aceitas, justificando a importância da realização do estudo de estabilidade deste formulado.

3.7 Estudo de Estabilidade

Corantes naturais são muito instáveis a uma série de condições extremas na qual são submetidos, no entanto muitas indústrias alegam que o uso do corante natural é inviável devido a sua instabilidade durante o período de armazenamento. Com base nestas alegações muitas pesquisas vêm sendo realizadas neste âmbito, a fim de provar que dependendo das condições de armazenamento no qual o corante é submetido ele se mantém estável durante este período.

Aryana et al. (2006) realizaram o estudo de estabilidade de iogurtes de morango adicionadas de pequenas concentrações de luteína ao longo de 35 dias. O teor de luteína, a viscosidade, a cor e o pH foram avaliados, sendo os iogurtes armazenados à temperatura de 5 °C. Constatou-se a redução dos teores de luteína em todas as formulações durante o período de armazenamento.

Rosso e Mercadante (2007) realizaram a avaliação da estabilidade de bebidas isotônicas e soluções tampão adicionadas de antocianinas extraídas de açaí e acerola, submetidas à presença de luz. A presença da luz contribuiu significativamente para a degradação das antocianinas de ambas as fontes nos dois sistemas estudados. A composição das bebidas e as fontes das quais foram obtidas os extratos também contribuíram para a estabilidade das antocianinas.

Por outro lado, a luz (fluorescente) não afetou significativamente a estabilidade de antocianinas provenientes de extratos etanólicos de cascas de jaboticaba quando armazenadas à temperatura ambiente por 185 dias. A perda de aproximadamente 23% no teor de antocianinas foi atribuída ao tempo e à temperatura de armazenamento (LIMA et al., 2011).

Sari et al. (2012) realizaram o estudo das propriedades de cor, estabilidade e atividade antioxidante das antocianinas naturais e copigmentadas dos frutos de jambolão em um sistema modelo de bebidas. A estabilidade das antocianinas, natural e copigmentadas foram analisadas quanto o efeito da temperatura de aquecimento, luz fluorescente, e condições de armazenamento por 4 semanas, nas temperaturas de 28 °C e 7 °C. O armazenamento afetou a estabilidade das antocianinas, em que o aumento da temperatura a partir da refrigeração (7 °C) para temperatura ambiente (28 °C) acelerou a degradação ambas antocianinas, naturais e copigmentadas.

3.7.1 Antocianinas Totais

Os resultados da variação do teor de antocianinas totais ao longo do período de armazenamento para a bebida proteica F3 são apresentados na Figura 12.

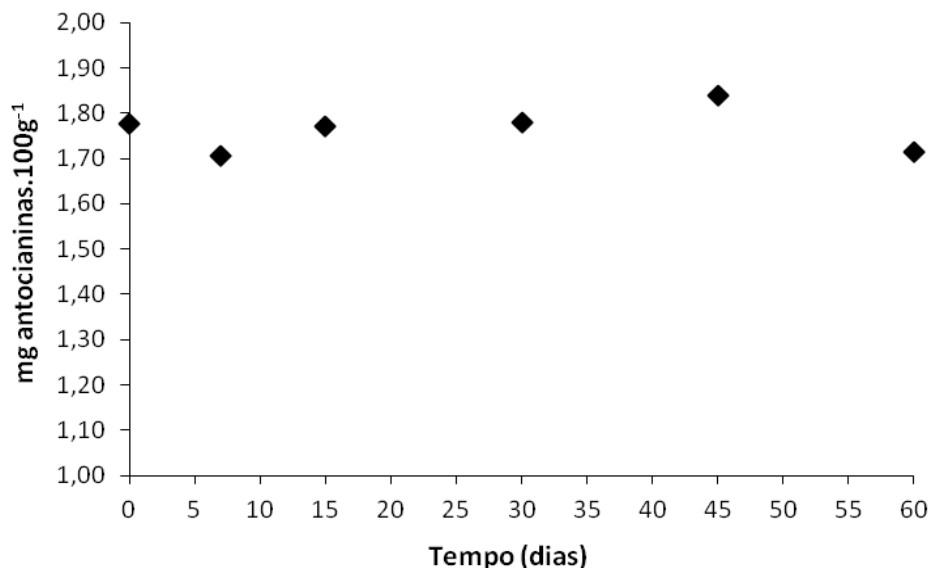


Figura 12 – Variação dos teores de antocianinas totais durante o período de armazenamento da bebida proteica (F3).

Verificou-se que não houve alteração significativa no teor de antocianinas totais ao longo do tempo ($p > 0,05$) para a formulação estudada. Ao longo dos 60 dias de armazenamento, o teor de antocianinas totais variou de 1,78 a 1,71 mg·100 g⁻¹ de bebida, confirmando que as condições de armazenamento utilizadas (refrigeração) não promoveram a degradação das antocianinas. Portanto, o corante utilizado foi estável durante este período, mantendo suas características bioativas.

Araújo et al. (2009) encontraram variações significativas entre os teores de antocianinas totais de néctar de amora armazenado sob congelamento durante 90 dias, variando de 118,95 a 110,84 mg·100 g⁻¹. No entanto, esses valores confirmaram a baixa degradação dos compostos antociânicos do néctar de amora-preta congelado durante o armazenamento, evidenciando a importância dessa condição para a preservação desses compostos.

Cipriano (2011) realizou o estudo de estabilidade de bebidas isotônicas adicionadas de extrato de antocianinas de açaí e de cascas de jabuticaba, sob diferentes

condições de armazenamento: luz e escuro, temperatura ambiente (25 °C) e refrigeração (4 °C). A condição de refrigeração foi a que proporcionou menor degradação das antocianinas ao longo do período de armazenamento, sendo que as bebidas formuladas com extrato de cascas de jabuticaba apresentaram menor degradação que as bebidas formuladas com extrato de açaí.

Fatores como estrutura química, o pH, a temperatura, a luz, a presença de oxigênio influenciam a estabilidade das antocianinas, assim como as interações que ocorrem entre elas e os componentes dos alimentos, tais como ácido ascórbico, íons metálicos, açúcares e copigmentos. O grau de hidroxilação exerce importante efeito na estabilidade das antocianinas, sendo que aquelas que contêm mais grupos hidroxilas em sua estrutura são menos estáveis. Inversamente, alto grau de metoxilação aumenta a estabilidade das antocianinas (FRANCIS, 1989).

Portanto, as condições de armazenamento sob refrigeração e congelamento são as mais apropriadas para evitar a degradação das antocianinas.

3.7.2 Carotenoides Totais

Os resultados da variação do teor de carotenoides totais ao longo do período de armazenamento para a bebida proteica F6 são apresentados na Figura 13.

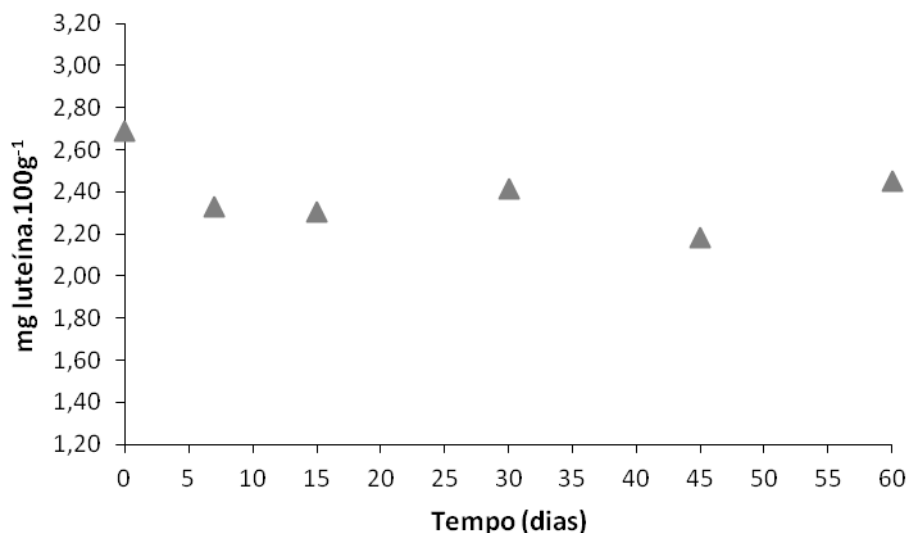


Figura 13 – Variação dos teores de carotenoides totais (luteína) durante o período de armazenamento da bebida proteica (F6).

Os valores do teor de luteína encontrados para a bebida com 2% de proteína estão de acordo com o que foi adicionado, aproximadamente 3,2 mg·100 g⁻¹ de bebida.

O processo realizado para extrair a luteína da bebida recuperou de 75 a 83% da quantidade adicionada.

Não houve degradação significativa ($p>0,05$) do teor de luteína ao longo do tempo para a formulação estudada. Durante os 60 dias de armazenamento, o teor de luteína variou de 2,68 a 2,45 mg·100 g⁻¹, confirmando que a condição de armazenamento utilizada (refrigeração) não promoveu a redução da quantidade de luteína, mantendo suas características bioativas.

Aryana et al. (2006) realizaram a quantificação das diferentes concentrações de luteína (0, 0,5, 1,5, e 3,0 mg·170 g⁻¹) adicionadas em iogurte de morango por um período de 35 dias e verificaram que em todos os tratamentos ocorreu um pequeno decréscimo no teor de luteína ao longo do período de armazenamento. Apesar do iogurte ter sido armazenado a (5 °C), esta condição não foi suficiente para evitar a degradação da luteína ao longo dos 35 dias.

A composição dos alimentos contribuem para a estabilidade dos compostos bioativos, as antocianinas necessitam de um pH baixo para a maior estabilidade da cor, assim como o controle da temperatura, presença de luz e oxigênio. A luteína se mantém estável a uma faixa ampla de pH, no entanto é necessário que haja o controle dos outros fatores para preservação deste composto. Algumas matrizes de alimentos contribuem para maior estabilidade dos corantes naturais, as proteínas de soro de leite são utilizadas como encapsulantes de tais compostos, atuando como uma rede protetora, impedindo a degradação. O estudo realizado por Betz et al. (2011) comprova tal afirmação, em que foi realizado o encapsulamento de extrato de mirtilo por géis de proteínas de soro de leite, mostrando-se eficiência na preservação destes compostos.

3.7.3 Atividade Antioxidante

Os resultados da variação da atividade antioxidante ao longo do período de armazenamento para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas e de luteína, F3 e F6 são apresentados na Figura 14.

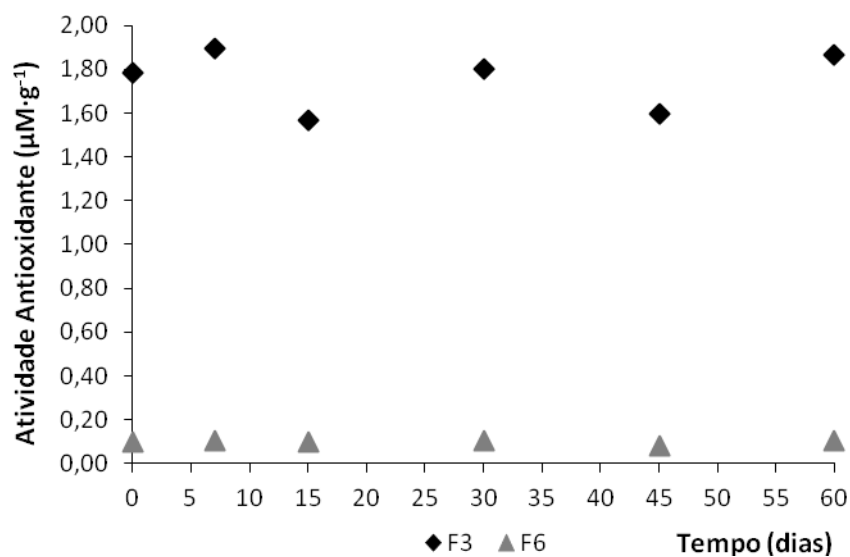


Figura 14 – Variação da atividade antioxidante durante o período de armazenamento para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas (F3) e de luteína (F6).

Verificou-se que não houve alteração significativa ($p > 0,05$) dos valores de atividade antioxidante para as formulações F3 e F6 durante os 60 dias de armazenamento. A atividade antioxidante da formulação F3 variou de 1,78 a 1,59 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ e de 0,09 a 0,08 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para a formulação F6. A manutenção da atividade antioxidante foi devida a ausência de degradação do teor de antocianinas totais e carotenoides totais durante o período em estudo. Isto reforça a importante relação entre a atividade antioxidante e o teor destes componentes no alimento.

A atividade antioxidante da bebida adicionada de extrato de antocianinas foi superior em comparação com a bebida adicionada de luteína. Este efeito é devido às diferenças na composição e estrutura de compostos antioxidantes naturalmente presentes nos alimentos.

O extrato de cascas de jabuticaba é um pigmento rico em antocianinas e possui uma série de outros fenólicos que lhe conferem uma alta capacidade antioxidante, dentre eles se destacam a rutina, quercetina e o ácido elágico. A estrutura desses compostos, a glicosilação e hidroxilação das antocianidinas influenciam diretamente a atividade antioxidante (WANG et al., 1997; EINBOND et al., 2004).

A luteína possui uma estrutura linear, com duplas ligações conjugadas, esta estrutura lhe confere atividade antioxidante, no entanto, é menor em comparação com as

antocianinas, devido às diferenças estruturais entre elas. A luteína não só tem ligações duplas conjugadas, que proporciona atividade sobre o radical livre, mas também possuem dois grupos hidroxilas em ambas as extremidades da sua estrutura química, atribuindo-lhe atividade antioxidante superior a dos demais carotenoides (HAYES et al., 2011). A adição de extratos de antocianinas aos alimentos resulta na incorporação de outros compostos fenólicos, que também contribuem para a atividade antioxidante, ao contrário da luteína que é geralmente adicionada aos alimentos de forma isolada.

Hayes et al. (2011) avaliaram a atividade antioxidante por quatro métodos diferentes de análise (ORAC, FRAP, DPPH e ABTS^{·+}) dos fotoquímicos; ácido elágico, sesamol, extrato de folhas de oliveira e luteína. Foi verificado que a luteína foi o composto que apresentou menor atividade antioxidante dentre os compostos avaliados, para todos os métodos de testes antioxidantes. No entanto, os carotenoides, como a luteína, podem desempenhar um papel como um antioxidante em fases lipídicas, aprisionando radicais livres ou oxigênio singlete, desempenhando um papel importante na inibição da oxidação lipídica.

3.7.4 Acidez

Os resultados da variação da acidez titulável ao longo do período de armazenamento para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas e de luteína, F3 e F6 são apresentados na Figura 15.

Verificou-se que para ambas as bebidas não houve alteração significativa da acidez ($p > 0,05$). Isto implica que sob as condições de armazenamento, não houve alteração da acidez titulável.

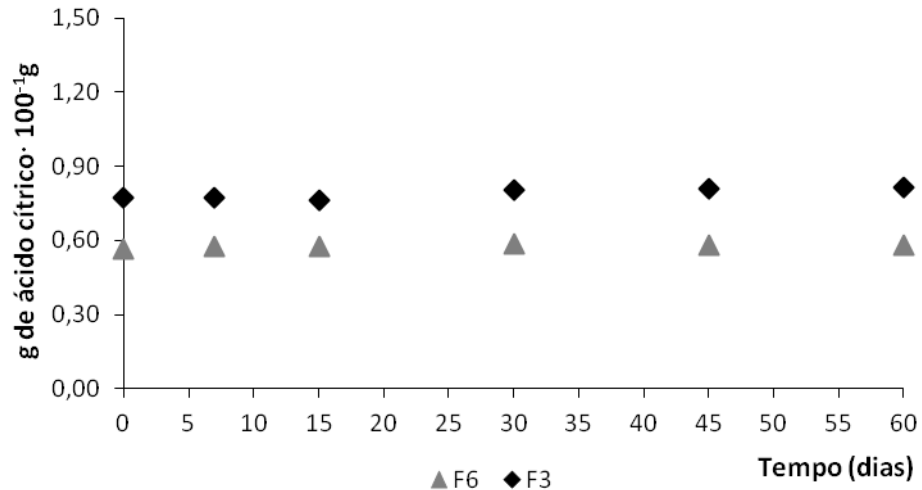


Figura 15 – Variação da acidez titulável durante o período de armazenamento para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas (F3) e de luteína (F6).

A acidez elevada ao longo do período de armazenamento é um indicativo de contaminação microbiológica, pois alguns micro-organismos alteradores produzem ácidos a partir de alguns substratos presentes no alimento, contribuindo para o aumento da acidez titulável. As bebidas foram formuladas mantendo os valores de pH igual a 4,0, armazenadas sob refrigeração, além da adição de sorbato de potássio que é um conservante que inibe o crescimento de alguns micro-organismos. Estes fatores atuaram como barreiras que impediram o desenvolvimento de micro-organismos, contribuindo para a estabilidade da acidez, sendo considerado um indicativo da qualidade microbiológica.

Ao longo dos 60 dias, a acidez titulável para a bebida proteica F3 variou entre 0,77 a 0,81%, enquanto para a bebida proteica F6 variou entre 0,56 a 0,58%. Esta variação entre os valores de acidez de ambas as formulações foi devido aos diferentes teores de proteínas presente em cada uma das bebidas.

3.7.5 pH

Os resultados da variação dos valores de pH ao longo do período de armazenamento para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas e de luteína, F3 e F6 são apresentados na Figura 16.

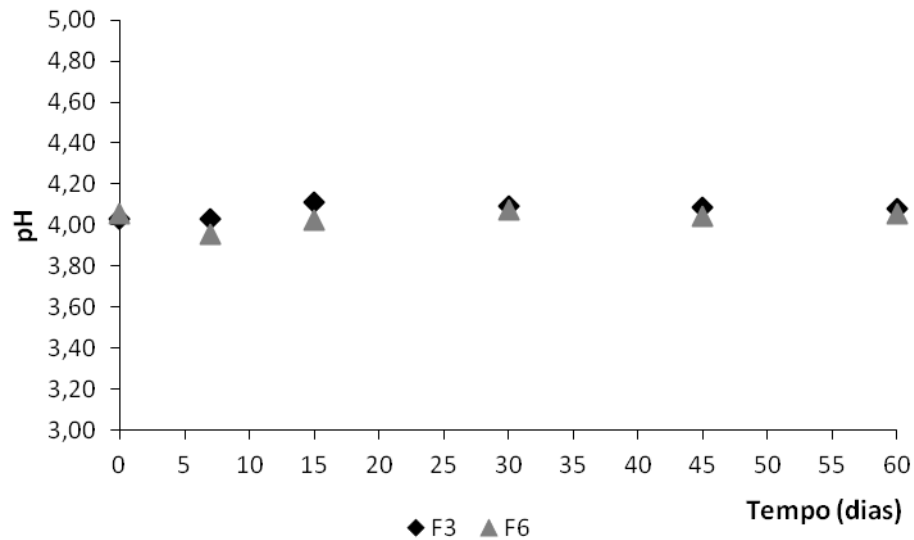


Figura 16 – Variação dos valores de pH durante o período de armazenamento para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas (F3) e de luteína (F6).

Não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) entre os valores de pH das bebidas proteicas adicionadas de antocianinas e luteína durante o período de armazenamento, indicando que o conteúdo de íons H^+ livres presente nas bebidas não variaram significativamente, sob as condições de armazenamento. Os valores de pH para a formulação F3 variou de 4,03 a 4,08, enquanto que para a formulação F6 a variação foi de 4,06 a 4,07. Estes valores revelam a boa estabilidade microbiológica do produto durante o período estudado com relação aos micro-organismos patogênicos. No estudo realizado por Karaaslan et al. (2011) também não foi encontrado variações significativas nos valores de pH e acidez de iogurtes adicionados de extrato de uva de diferentes variedades após 7 dias de armazenamento.

Oscilações nos valores de pH foram encontrados por Araújo et al.(2009) avaliando a estabilidade de néctar de amora armazenado sob congelamento por 90 dias de armazenamento. A variação de pH durante o período de estocagem dependerá principalmente das condições que o alimento está armazenado, da composição e da qualidade microbiológica deste alimento.

Para as bebidas formuladas com extrato de antocianinas é desejável que não haja a variação de pH, uma vez que a sua cor é totalmente dependente desse fator. Variação brusca do pH pode contribuir para a degradação da cor, indicando também a degradação dos compostos bioativos e da capacidade antioxidante.

3.7.6 Sólidos Solúveis Totais

Os resultados da variação do teor de sólidos solúveis totais ao longo do período de armazenamento para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas e de luteína, F3 e F6 são apresentados na Figura 17.

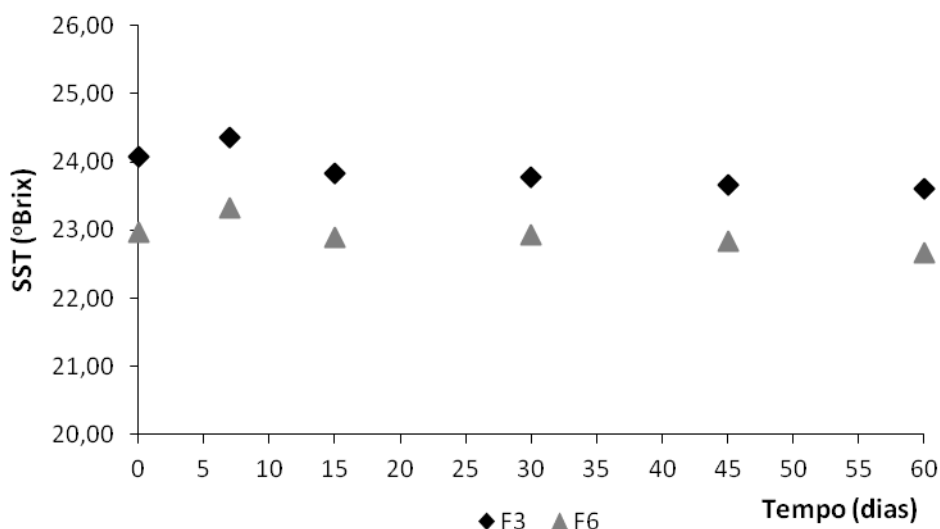


Figura 17 – Variação dos valores de sólidos solúveis totais durante o período de armazenamento para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas (F3) e de luteína (F6).

Os teores de sólidos solúveis totais variaram de 24,1 a 23,6 para as bebidas adicionadas de extrato de antocianinas e de 23,0 a 22,7 para as adicionadas de luteína, sem alteração significativa ($p > 0,05$) durante o armazenamento. O mesmo comportamento foi observado por Araújo et al. (2009) quando não verificaram alteração nos teores de sólidos solúveis totais do néctar de amora durante os 90 dias.

3.7.7 Cor

Os valores das diferenças dos parâmetros de cor entre o tempo inicial (0) e os demais tempos (7, 15, 30, 45 e 60) dias são apresentados na Tabela 20. Os valores das coordenadas de cor, a^* e b^* foram positivos para ambas as bebidas, ou seja, apresentaram coloração vermelha para F3 e amarela para F6, devido a cada tipo de

corante natural adicionado. Os valores de luminosidade (L^*) foram elevados para ambas às bebidas F3 e F6.

Por meio dos resultados apresentados pelas coordenadas a^* e b^* , foram calculados os valores de c^* e h^* . A formulação F6 apresentou valores de c^* superiores aos da formulação F3, isto indica que a amostra de bebida F6 possuía cores mais puras e intensas em relação a F3. Esta diferença se deve as diferenças das matérias-primas utilizadas para a fabricação de cada uma dessas bebidas, levando a diferentes combinações de cores.

Para a coordenada h^* observou-se pequenos valores para a formulação F3, indicando que esta bebida apresentava tonalidades que tendia ao vermelho, enquanto que para a formulação F6 apresentou valores maiores da coordenada h^* , tendendo a coloração amarela. Os resultados mostraram uma relação com cada corante natural que foi adicionado, a formulação F6 que foi adicionada de luteína apresentou coloração amarela, enquanto que a formulação F3 adicionada de extrato de antocianinas apresentou coloração vermelha.

A partir das coordenadas L^* , a^* e b^* foi calculada a diferença global de cor (ΔE^*) entre o tempo 0 e cada tempo de estocagem. Observou-se que com o aumento do período de estocagem, houve aumento dos valores de ΔE^* . Alguns autores relatam que valores de $\Delta E^* > 10$ indicam que a degradação ocorrida na antocianina ou luteína pode ser facilmente percebida pelos olhos humanos, este representa o limiar de percepção da diferença de cor (GONNET, 2001; DE ROSSO E MERCADANTE, 2007). Para ambas as bebidas os valores da diferença global de cor foram muito inferiores a 10. Portanto, a variação de cor que ocorreu ao longo do período de armazenamento foi insignificante, não sendo percebida pelo olho humano, não influenciando na aceitação sensorial das bebidas.

Tabela 20 - Variação das coordenadas cor das bebidas proteicas formuladas com extrato de antocianinas de cascas de jabuticaba (F3) e luteína (F6), durante 60 dias de armazenamento.

Tipo de bebida	Dias	Luminosidade (L*)	Chroma (c*)	Tonalidade (h*)	Diferença Global de cor (ΔE^*)
F3	0	58,63±1,98	13,69±0,75	33,42±3,10	1,82±0,46
	7	58,57±3,01	13,45±0,51	39,51±7,36	
F3	0	58,63±1,98	13,69±0,75	33,42±3,10	2,14±0,29
	15	59,39±2,68	12,99±0,61	41,31±6,26	
F3	0	58,63±1,98	13,69±0,75	33,42±3,10	2,58±1,04
	30	59,05±2,90	13,18±0,99	43,84±8,65	
F3	0	58,63±1,98	13,69±0,75	33,42±3,10	2,82±0,53
	45	59,13±3,01	12,89±1,12	45,01±7,20	
F3	0	58,63±1,98	13,69±0,75	33,42±3,10	2,98±0,97
	60	59,03±3,14	12,88±1,15	45,84±9,18	
F6	0	53,94±1,12	42,77±1,39	74,96±0,58	0,44±0,26
	7	53,66±0,86	42,49±1,22	74,79±0,57	
F6	0	53,94±1,12	42,77±1,39	74,96±0,58	0,83±0,18
	15	53,44±1,08	42,15±1,67	74,84±0,47	
F6	0	53,94±1,12	42,77±1,39	74,96±0,58	1,31±0,19
	30	53,27±1,15	41,65±1,41	74,93±0,59	
F6	0	53,94±1,12	42,77±1,39	74,96±0,58	2,10±0,84
	45	52,95±1,59	40,93±2,07	75,11±0,16	
F6	0	53,94±1,12	42,77±1,39	74,96±0,58	1,72±0,48
	60	53,17±0,96	41,24±1,01	74,80±0,62	

*Os valores representam a média de 3 repetições \pm desvio-padrão.

Os resultados da variação dos valores de luminosidade (L^*) ao longo do período de armazenamento para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas e de luteína, F3 e F6 são apresentados na Figura 18.

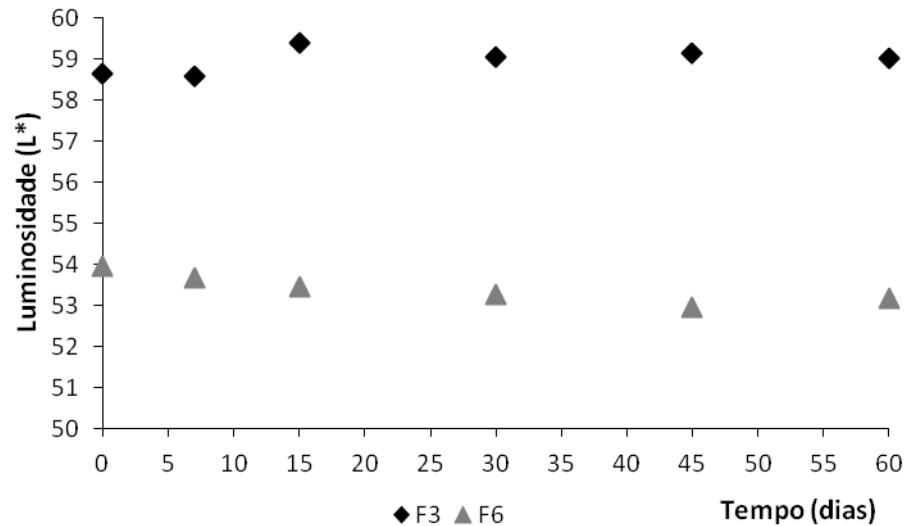


Figura 18 - Variação dos valores da coordenada luminosidade (L^*) para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas (F3) e de luteína (F6) durante o período de armazenamento.

Observou-se que não houve alterações significativas ($p > 0,05$) nos valores da coordenada (L^*) que representa a luminosidade ou clareza das bebidas ao longo do período de armazenamento. Os valores de L^* variaram entre 58,63 no tempo 0 a 59,03 no tempo 60 para a formulação F3, enquanto que para a formulação F6 os valores situaram-se entre 53,94 para o tempo 0 e 53,17 para o tempo 60. As diferenças dos valores de L^* entre o tempo final e inicial foi de menos de 1 unidade para cada uma das bebidas. Diferenças maiores foram relatadas por Cipriano (2011), que avaliando a estabilidade de bebidas isotônicas adicionadas de extrato de cascas de jabuticaba e açaí encontrou um aumento dos valores da coordenada L^* ao longo do período de armazenamento. O aumento foi de 1,5 unidades para as bebidas adicionadas de extrato de cascas de jabuticaba e 3 unidades para as bebidas adicionadas de açaí, sob a condição de refrigeração (4 °C).

O armazenamento sob refrigeração (5 °C) foi a condição utilizada por Aryana et al. (2006) para manter iogurtes de morango adicionados de diferentes concentrações de

luteína, por um período de 35 dias. Os valores de L* decresceram com o tempo de armazenamento, a diminuição desses valores foi atribuído à proteólise realizada pelas bactérias do iogurte ao longo deste período, sendo que a quantidade de luteína adicionada não afetou estes resultados.

Os resultados da variação dos valores de saturação (c^*) ao longo do período de armazenamento para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas e de luteína, F3 e F6 são apresentados na Figura 19.

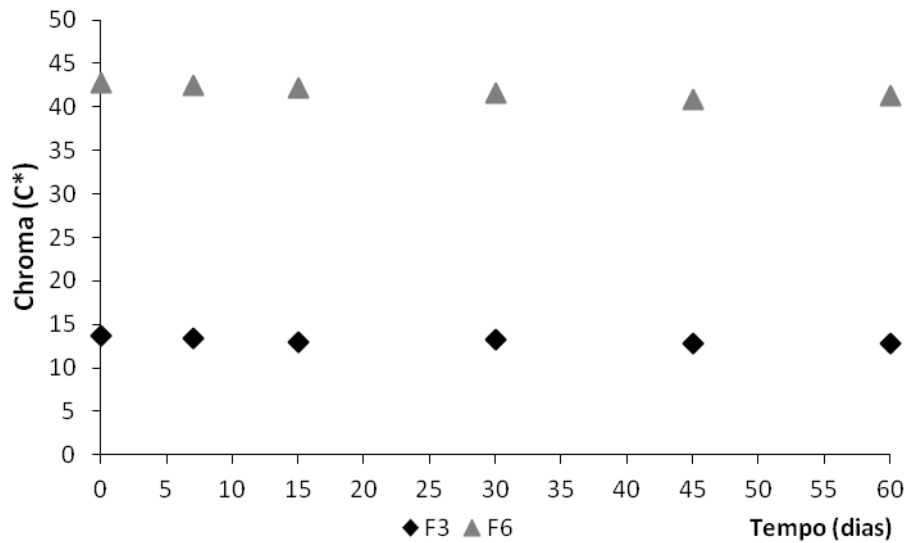


Figura 19 - Variação dos valores da saturação ou chroma (c^*) para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas (F3) e de luteína (F6) durante o período de armazenamento.

Não houve alteração significativa ($p > 0,05$) nos valores de saturação (c^*) ao longo do período de armazenamento. Isto indica que não houve diminuição da intensidade da coloração vermelha, para a formulação F3, e da coloração amarela para a formulação F6. As antocianinas e a luteína adicionadas não degradaram ao longo do período de armazenamento, as Figuras 12 e 13, justificam esta afirmação. Os valores de c^* variaram entre 13,69 no tempo 0 a 12,88 no tempo 60 para a formulação F3, enquanto que para a formulação F6 os valores situaram-se entre 42,77 para o tempo 0 e 41,24 para o tempo 60.

Os resultados da variação dos valores de tonalidade (h^*) ao longo do período de armazenamento para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas e de luteína, F3 e F6 são apresentados na Figura 20.

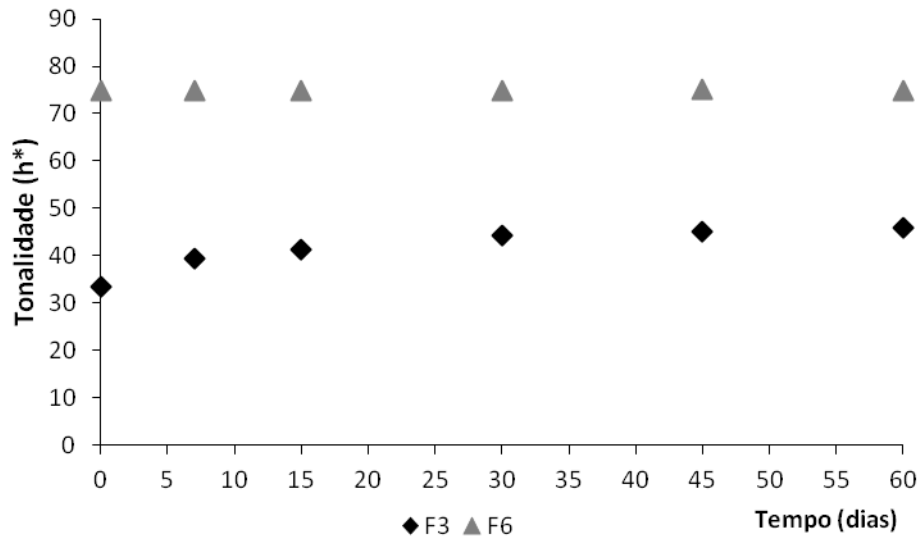


Figura 20 - Variação dos valores de tonalidade (h^*) para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas (F3) e de luteína (F6) durante o período de armazenamento.

Assim como as coordenadas L^* e c^* , os valores de h^* não sofreram alterações significativas ($p > 0,05$) ao longo do período de armazenamento. O valor do ângulo h^* representa a tonalidade da bebida, quanto menor o valor do ângulo, mais próximo a bebida estará do eixo a^* , quanto maior o valor de ângulo h^* , mais próximo a bebida estará do eixo b^* . Os valores de h^* variaram entre 33,42 no tempo 0 a 45,84 no tempo 60 para a formulação F3, enquanto que para a formulação F6 os valores situaram-se entre 74,96 para o tempo 0 e 75,11 para o tempo 60. Estes valores demonstraram as diferenças das cores de cada uma das bebidas, a adicionada de extrato de antocianinas apresentou um valor de h^* inferior da adicionada de luteína. Ângulos menores indicam tonalidade vermelha (antocianinas), ao passo que ângulos maiores indicam tonalidade amarela (luteína).

Os resultados da variação de diferença global de cor (ΔE^*) ao longo do período de armazenamento para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas e de luteína, F3 e F6 são apresentados na Figura 21.

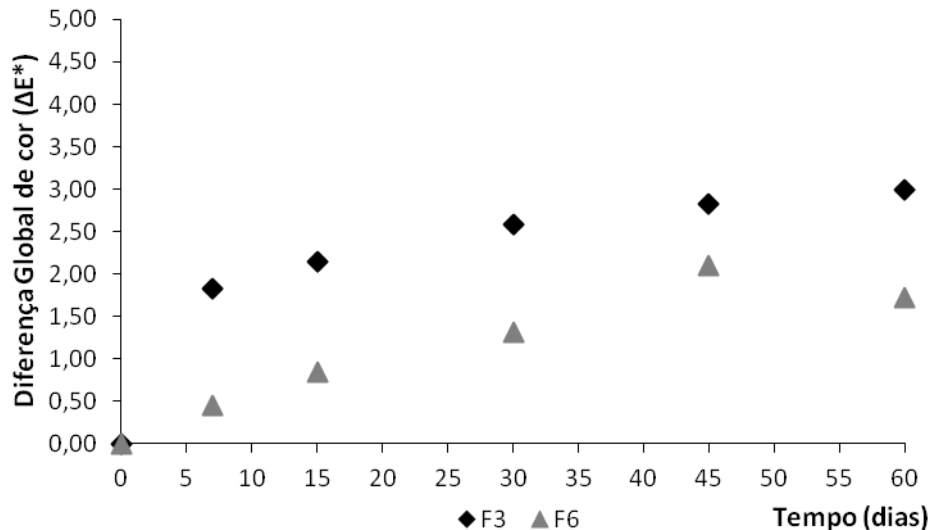


Figura 21 - Variação dos valores da diferença global de cor (ΔE^*) para as bebidas proteicas adicionadas de extrato de antocianinas (F3) e de luteína (F6) durante o período de armazenamento.

Houve efeito significativo ($p < 0,05$) do período de armazenamento sobre os valores de ΔE^* para as bebidas F3 e F6. A influência do período de armazenamento foi modelada estatisticamente pelas equações representadas na Tabela 21. Os modelos foram testados quanto à falta de ajuste e significância dos parâmetros da regressão, para os modelos de primeiro e segundo grau. A formulação F6 apresentou falta de ajuste não significativa ($p > 0,05$) para o modelo de primeiro grau e parâmetros da regressão significativos ($p < 0,05$). O coeficiente de determinação foi superior a 85%, enquanto que a formulação F3 apresentou falta de ajuste não significativa ($p > 0,05$) para o modelo de segundo grau e parâmetros da regressão significativos ($p < 0,05$). O coeficiente de determinação foi superior a 87%.

Tabela 21 – Modelagem estatística do efeito do tempo sobre os valores de ΔE^* das formulações F3 e F6.

Determinação	Modelo de Regressão	R^2
$\Delta E^*/ F6$	$Y = 0,03162.T + 0,2437$	0,8544
$\Delta E^*/ F3$	$Y = -0,00126.T^2 + 0,1138.T + 0,5069$	0,8701

T = Tempo

A variação do parâmetro ΔE^* em função do tempo de armazenamento para a formulação F6 segue um modelo de primeiro grau. O tempo contribuiu positivamente para o aumento dos valores ΔE^* da formulação F6. Para a formulação F3, a variação do parâmetro ΔE^* em função do tempo de armazenamento segue um modelo de segundo grau.

Avaliando o pH e as coordenadas colorimétricas de leite fermentado adicionado de luteína Dias (2009) verificou que o período de armazenamento não teve efeito significativo sobre os valores de cor e pH das amostras avaliadas.

A estabilidade de bebidas isotônicas adicionadas de antocianinas extraídas de açaí e acerola foram avaliadas por Rosso e Mercadante (2007) sob a presença de luz. Houve redução dos valores da coordenada a^* , devido à degradação da coloração vermelha, o mesmo foi observado para a coordenada c^* , diminuição da intensidade da coloração vermelha. Os valores de ΔE^* aumentaram com o tempo de armazenamento (300 horas) indicando a diferença da cor entre o tempo inicial e final das amostras analisadas.

Observou-se que para qualquer que seja o tempo de armazenamento do produto, a condição de estocagem do qual o produto foi submetido deve ser controlada, para que a cor, os compostos bioativos e sua capacidade antioxidante sejam preservados. A resposta colorimétrica obtida para este estudo foi independente do período de armazenamento das bebidas, apenas a diferença global de cor foi afetada por este fator.

4. CONCLUSÃO

As bebidas proteicas mantiveram suas características físico-químicas, microbiológicas e bioativas após o processamento. Os valores de acidez, sólidos solúveis e os parâmetros colorimétricos foram influenciados pelo teor de proteínas para ambos os corantes utilizados, tais alterações foram devido aos diferentes teores de proteínas utilizados nos formulados.

A formulação com 2,0% de proteína adicionada de luteína foi a que apresentou maior aceitação pelos consumidores, enquanto que para as bebidas adicionadas de extrato de antocianinas as formulações com 0,5%, 2,0% e 4,0%, foram igualmente aceitas. As formulações com 6,0% de proteína foram as menos aceitas, devido às variações de cor consequência da alta concentração de proteína, além do aumento expressivo da viscosidade.

As formulações F3 e F6 submetidas ao estudo de estabilidade apresentaram uma excelente estabilidade ao longo do 60 dias de armazenamento. Não houve alteração significativa ($p > 0,05$) nas características físico-químicas, teor dos compostos bioativos e atividade antioxidante ao longo do tempo. A cor de ambas as bebidas também se mostraram estáveis durante o período de armazenamento, havendo apenas uma pequena variação do parâmetro ΔE^* , no entanto, tal variação não compromete a coloração da bebida não interferindo na aceitação sensorial, uma vez que não é perceptível ao olho humano.

É possível adicionar corantes naturais às bebidas formuladas com proteínas de soro de leite, uma vez que eles se mantêm estáveis ao longo do período de armazenamento contribuindo para o aumento do valor nutricional e da capacidade antioxidante do produto final. As bebidas obtiveram uma boa aceitação sensorial, sendo considerado um produto promissor para o mercado, tanto pelo alto valor biológico das proteínas, como pela maior concentração da qual foi adicionada ao produto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-SALAM, M.H.; EL-SHIBINY, S.; BUCHHEIMH, W. Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. **International Dairy Journal**, v. 6, p.327-341, 1996.

ADAMS, J.J.; ANDERSON, B.F.;NORRIS, G.E.;CREAMER, L.K.; JAMESON, G.B. Structure of bovine α -lactoglobulin (variant A) at very low ionic strength. **Journal of Structural Biology**, v.154, p.246–254, 2006.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard methods for the examination of dairyproducts**. 16. ed. Washington: APHA, 1992. 646 p.

ANDRADE, N.J. **Higiene na Indústria de Alimentos/Controle da Adesão Microbiana e Formação de Biofilmes**. Editora Varela, 2008, 415p.

ANDREWS, A.T.; ALICHANIDIS, A. Proteolysis of caseins and the proteose-peptone fraction of bovine Milk. **Journal of Dairy Research**, v.50, p. 275–290, 1983.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.66, p.232-240, 2007.

ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. São Paulo: Ed. Manole, 2003, 135p.

AOAC – Official Methods of AOAC International. **Rapid Enumeration of *Staphylococcus aureus* in Selected Foods**. 2001.

ARAÚJO, P.F.; RODRIGUES, R.S.; MACHADO, A.R.; SANTOS, V.S.; SILVA, J.A. Influência do congelamento sobre as características físico-químicas e o potencial antioxidante de néctar de amora-preta. **Boletim do CEPPA**, v. 27, n. 2, p. 199-206, 2009.

ARAÚJO, W.M.C; ARAÚJO, R.A.C. Alimentos funcionais. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v.14, p.237-246, 1999.

ARYANA, K.J.; BARNES, H.T.; EMMICK, T.K.; MCGREW, P.; MOSER, B. Lutein Is Stable in Strawberry Yogurt and Does Not Affect its Characteristics. **Journal of Food Science**, v.71, n.6, p.467-472, 2006.

ATOUI, AK; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v 89, p.27-36, 2005.

BALDASSO, C. **Concentração, Purificação e Fracionamento das Proteínas do Soro Lácteo através da Tecnologia de Separação por Membranas**. Porto Alegre, 2008. 179p. (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

BALDASSO, C.; BARROS, T.C.; TESSARO, I.C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, p.381–386, 2011a.

BALDASSO, C.; CORRÊA, J.H.K.; TESSARO, I.C. An investigation of the fractionation of whey proteins by two microfiltration membranes with nominal pore size of 0.1µm. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 3, p. 343-349, 2011b.

BARROS, F.A.R.; STRINGHETA, P.C. Microencapsulamento de antocianinas - Uma alternativa para o aumento de sua aplicabilidade como Ingrediente alimentício. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.36, p.18-24, 2006.

BAVEYE, S.; ELASS, E.; MAZURIER, J.; SPIK, G.; LEGRAND, D. Lactoferrin: A multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.37, p.281–286, 1999.

BETZ, M.; KULOZIK, U. Whey protein gels for the entrapment of bioactive anthocyanins from bilberry extract. **International Dairy Journal**, v.21, p.703-710, 2011.

BOOTS, J.W.; FLORIS, R. Lactoperoxidase: From catalytic mechanism to practical applications. **International Dairy Journal**, v.16, p.1272–1276, 2006.

BOSCHI, J.R. **Concentração e Purificação das Proteínas de Soro de Queijo por Ultrafiltração**. Porto Alegre, 2006. 119p. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

BRANS, G.; SCHROEN, C.G.P.H.; VAN DER SMAN, R.G.M.; BOOM, R.M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. **Journal of Membrane Science**, v.243, p.263–272, 2004.

BRASIL, 2005. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 16, de 23 de Agosto de 2005. **Regulamento Técnico de identidade e Qualidade de Bebida Láctea**. 24 de agosto de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Brasília, 1999.

BRYANT, C. M.; MCCLEMENTS, D. J. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. **Trends in Food Science & Technology**, v.9, p.143–151, 1998.

CALBET, J.A.L.; MACLEAN, D.A. Plasma glucagon and insulin responses depend on the rate of appearance of amino acids after ingestion of different protein solutions in humans. **The Journal of Nutrition**, v.132, p.2174–2182, 2002.

CALDEIRA, L.A.; FERRÃO, S.P.B.; FERNANDES, S.A.A.; MAGNAVITA, A.P.A.; SANTOS, T.D.R. Desenvolvimento de bebida láctea sabor morango utilizando

diferentes níveis de iogurte e soro lácteo obtidos com leite de búfala. **Ciência Rural**, v.40, n. 10, p. 2193-2198, 2010.

CARRATÙ, B.; SANZINI, E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetable. **Ann. Ist. Super Sanità**, v.41, n.1, p.7-16, 2005.

CARVALHO, R.B.; BORGES, C.P.; NOBREGA, R. Formação de membranas planas celulósicas por espalhamento duplo para os processos de nanofiltração e osmose inversa. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.11, n. 2, p. 65-75, 2001.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GÁLAN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, v. 113, p. 859-871, 2009.

CAVALCANTI, R. N.; SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems: an overview. **Food Research International**, v.44, p. 499–509, 2011.

CHIERICI, R. Antimicrobial actions of lactoferrin. **Advances in Nutritional Research**, v.10, p.247–269, 2001.

CHILDS, J.L.; YATES, M.D.; DRAKE, M.A. Sensory properties of meal replacement bars and beverages made from whey and soy proteins. **Journal of Food Science**, v.72, n.6, p.425–434, 2007.

CIPRIANO, P.A. **Antocianinas de açai (*Euterpe oleracea mart.*) e casca de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) na formulação de bebidas isotônicas**. f.151. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 2011.

COIMBRA, J.S.R.; TEIXEIRA, A.J. **Engineering Aspects of Milk and Dairy Products**. 1ed. New York: CRC Press Taylor & Francis Group, v. 1, 2009, 275p.

COLMAN, A. Production of proteins in the milk of transgenic livestock: problems, solutions, and successes. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p.639S – 645S, 1996.

CORREIA, L. F. M. ; MAUBOIS, J.-L. ; CARVALHO, A. F. Aplicação de Tecnologias de Membranas na Indústria de Laticínios. **Indústria de Laticínios**, v. 90, p.74-78, 2011.

CUARTAS-URIBE, B.; ALCAINA-MIRANDA, M.I.; SORIANO-COSTA, E.; MENDOZA-ROCA, J.A. ; IBORRA-CLAR, M.I. ; LORA-GARCÍA, J. A study of the separation of lactose from whey ultrafiltration permeate using nanofiltration. **Desalination**, v.241, p.244 – 255, 2009.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª ed., Porto Alegre: Ed Artmed, 2010, 900p.

DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 347–352, 2007.

DELLA LUCIA, C.M.; CAMPOS, F.M.; MATA, G.M.S.M.; SANT'ANA, H.M.P. Controle de perdas de carotenóides em hortaliças preparadas em unidade de alimentação e nutrição hospitalar. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.13, n.5, p.1627-1636, 2008.

DIAS, M. M. S. **Leite de cabra fermentado adicionado de prebióticos, probióticos e compostos bioativos destinado a idosos**. f.141. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, 2009.

EINBOND, L.S.; REYNERTSON, K.A.; LUO, X.; BASILE, M.J.; KENNELLY, E.J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v.84, p.23–28, 2004.

ELFSTRAND, L.; LINDMARK-MANSSON, H.; PAULSSON, M.; NYBERG, L.; AKESSON, B. Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrum and the effects of processing. **International Dairy Journal**, v.12, p.879–887, 2002.

FALCÃO, A.P.; CHAVES, E.S.; KUSKOSKI, E.M.; FETT, R.; FALCÃO, L.D.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Índice de polifenóis, antocianinas totais e atividade antioxidante de um sistema modelo de geléia de uvas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.3, p.637-642, 2007.

FAULKS, R.; SOUTHON, S. Dietary carotenoids. **Nutrition & Food Science**, n.6, p.246-250, 1997.

FELBERG, I.; DELIZA, R.; FARAH, A.; CALADO, E.; DONANGELO, C.M. Formulation of a soy–coffee beverage by response surface methodology and internal preference mapping. **Journal of Sensory Studies**, v.25, p.226–242, 2010.

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

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. New York: Published by Blackie Academic & Professional/Tomphson Science, 1998, 478p.

FRANCIS, F. J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. **Cereal Foods World**, v. 45, p. 208-213, 2000.

FRANCIS, F. J. Food colorants: anthocyanins. CRC Critical Reviews. **Food Science and Nutrition**, v.28, p.273–315, 1989.

GIRALDO-ZUÑIGA, A.D., COIMBRA, J.S.R., GOMES, J.C., MINIM, L.A., ROJAS, E.E.G., GADE, A.D., Tecnologias aplicadas ao processamento do soro de queijo. **Dairy Journal Bimonthly The “Cândido Tostes” Dairy Institute**, v.59, p.53-66, 2004.

GOFF, H. D.; HILL, A. R. **Principles and properties. Chemistry and physics.** Dairy Science and Technology Handbook.. In Y. H. Hui (Ed.), New York: VCH Publishers, v.1, p.1–82, 1993.

GONNET, J. F. Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited. 3: A further description using CIELAB differences and assessment of matched colours using CMC model. **Food Chemistry**, v.63, p.409–415, 2001.

GONZALEZ, N.J.; ADHIKARI, K.; SANCHO-MADRIZ, M.F. Sensory characteristics of peach-flavored yogurt drinks containing prebiotics and synbiotics. **LWT - Food Science and Technology**, v.44, p.158-163, 2011.

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

HARBERT, A.C.; BORGES, C.P.; NOBREGA, R. **Processos de separação por membranas.** Rio de Janeiro: E-papers, 2006.

HARPER, W.J. Whey proteins. **Food Technology New Zealand.** v.19, n.1, p.21-28, 1994.

HASLER, C.M. The changing face of functional foods. **Journal of the American College of Nutrition**, v.19, n. 5, p.499–506, 2000.

HATTORI, M.; WATABE, A.; TAKAHASHI, K. β -lactoglobulin protects β -ionone related compounds from degradation by heating, oxidation, and irradiation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.59, n.12, p.2295-2297, 1995.

HAYES, J.E.; ALLEN, P.; BRUNTON, N.; O'GRADY, M.N.; KERRY, J.P. Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea L.*), lutein, sesamol and ellagic acid. **Food Chemistry**, v.126, p.948–955, 2011.

IAL- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** 4 ed. São Paulo, 2008. 1020p.

IAMETTI, S.; DE GREGORI, B.; VECCHIO, G.; BONOMI, F. Modifications occur at different structural levels during the heat denaturation of β -lactoglobulin. **European Journal Biochemistry**, v.237, p.106-112, 1996.

IDF (International Dairy Federation) **20B:1993:** milk: determination of nitrogen content, 11f., 1993.

INNOCENTE, N.; BIASUTTI, M.; BLECKER, C. HPLC profile and dynamic surface properties of the proteosepeptone fraction from bovine milk and from whey protein concentrate. **International Dairy Journal**, v.21, p.222-228, 2011a.

INNOCENTE, N.; CORRADINI, C.; BLECKER, C.; PAQUOT, M. Emulsifying properties of the total fraction and the hydrophobic fraction of bovine milk proteosepeptones. **International Dairy Journal**, v.8, p.981-985,1998.

INNOCENTE, N.; MARCHESINI, G.; BIASUTTI, M. Feasibility of the SPME method for the determination of the aroma retention capacity of proteose-peptone milk protein fraction at different pH values. **Food Chemistry**, v.124, p.1249–1257, 2011b.

JACQUES, A. C.; ZAMBLAZI, R. C. Fitoquímicos em amora-preta (*Rubus* spp), **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, p. 245-260, 2011.

JR, V.T.; PARRA, D.F.; PITOMBO, R.N.M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, p.127-136, 2006.

KARAASLAN, M.; OZDEN, M.; VARDIN, H.; TURKOGLU, H. Phenolic fortification of yogurt using grape and callus extracts. **LWT - Food Science and Technology**, v.44, p.1065-1072, 2011.

KATSANOS, C.S.; KOBAYASHI, H.; SHEFFIELD-MOORE, M.; AARSLAND, A.; WOLFE, R.R. A high proportion of leucine is required for optimal stimulation of the rate of muscle protein synthesis by essential amino acids in the elderly. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.291, p. 381–387, 2006.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G; GARCÍA-PARILLA, M.C; TRONCOSO, A.M.; FETT, R. Atividade antioxidante de pigmentos antocianícos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.4, p.691-693, 2004.

LEES, D. H.; FRANCIS, F. J. Standardization of pigment analysis in Cranberries. **Hortiscience**, v.7, n.1, p.83-84, 1972.

LEHNINGER, A.L; NELSON, D.L; COX, M.M. **Lehninger principles of Biochemistry**, 4.ed.ny:W.H.Freeman, 2004.1100p.

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

LEITE-LEGATTI, A.V.; BATISTA, A.G.; DRAGANO, N.R.V.; MARQUES, A.C.; MALTA, L.G.; RICCIO, M.F.; EBERLIN, M.N.; THOMAZELA, A.R.M.; SILVA, L.B.C.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; PASTORE, G.M.; JÚNIOR, M.R.M. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v.49, p.596–603, 2012.

LIANG, L.; SUBIRADE, M. β -Lactoglobulin/Folic Acid Complexes: Formation, Characterization, and Biological implication. **Journal Physical Chemistry**, v.114, p.6707–6712, 2010.

LIANG, L.; TAJMIR-RIahi, H. A.; SUBIRADE, M. Interaction of β -Lactoglobulin with resveratrol and its biological implications. **Biomacromolecules**, v. 9, p.50–56, 2008.

LIEN, E.L. Infant formulas with increased concentrations of α -lactalbumin. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, p.1555S–1558S, 2003.

LIMA, A.J.B.; CORRÊA, A.D.; SACZK, A.A.; MARTINS, M.P.; CASTILHO, R.O. Antocianinas, pigmentos e de estabilidade atividade antioxidante em jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg). **Revista Brasileira Fruticultura**, v.33, n.3, p.877-887, 2011.

LOPES, T. J.; XAVIER, M. F.; QUADRI, M. G. N.; QUADRI, M. B.; Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.13, p.291-297, 2007.

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

MACHADO, R.M.G., FREIRE, V.H., SILVA, P.C., FIGUERÊDO, D.V., FERREIRA, P.E. **Controle Ambiental nas Pequenas e Médias Indústrias de Laticínios**. Projeto Minas Ambiente. p. 51; 81. SEGRAC Editora e gráfica limitada, Belo Horizonte, 2002.

MADUREIRA, A.R.; PEREIRA, C.I.; GOMES, A.M.P.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. **Food Research International**, v.40, p.1197–1211, 2007.

MAIA, L.M.S.S.; SANTOS, A.A. Alimentos e suas ações em sistemas fisiológicos. **Veredas FAVIP**, v.3, n° 1 e 2, p.24–34, 2006.

MAUBOIS, J.-L., FAUQUANT, J., FAMELART, M.-H., CAUSSIN, F. **Milk microfiltrate, a convenient starting material for fractionation of whey proteins and derivatives** - The importance of whey and whey components in food and in nutrition. B. Behr's Verlag, Hamburg, Germany, In: 3rd International whey conference, Munich, Germany, p. 59-72, 2001.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; SANTANA, A. P. M. Capacidade antioxidante de hortaliças submetidas a tratamento térmico. **Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition**, v.34, n.1, p.85-95, 2009.

MERCADANTE, A. Z.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmação da identidade da α -criptoxantina e incidência de carotenóides minoritários provitamínicos A em verduras folhosas verdes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.2, p. 216-222, 2001.

MINIM, V.P.R. **Análise sensorial: Estudos com consumidores**. Viçosa, MG: Ed.UFV, 2010, 308p.

MONTES, C.; VICARIO, I.M.; RAYMUNDO, M.; FETT, R.; HEREDIA, F.J. Application of tristimulus colorimetry to optimize the extraction of anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* Berg). **Food Research International**, v.38, p.983-988, 2005.

NACHTIGALL, A. M.; STRINGHETA, P. C.; FIDELIS, P. C.; NACHTIGALL, F. M. Determinação do teor de luteína em hortaliças. **Boletim do CEPPA**, Curitiba v. 25, n. 2, p. 181-192, 2007.

NAKAMURA, K.; ERA, S.; OZAKI, Y.; SOGAMI, M.; HAYASHI, T.; MURAKAMI, M. Conformational changes in seventeen cystine disulfide bridges of bovine serum albumin proved by Raman spectroscopy. **Febs Letters**, v.417, p. 375-378, 1997.

NUNES, I. L; MERCADANTE, A. Z. Obtenção de cristais de licopeno a partir de descarte de tomate. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.3, p.440-447, 2004.

PAGNO, C.H.;BALDASSO, C.;TESSARO, I.C.;FLORES, S.H.;JONG, E.V. Obtenção de concentrados proteicos de soro de leite e caracterização de suas propriedades funcionais tecnológicas. **Alimentos e Nutrição**, v.20, n.2, p. 231-239, 2009.

PELEGRINE, D. H. G.;CARRASQUEIRA, R. L. Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas. **Brazilian Journal of Food Technology**, In: VII BMCFB, p.145-151, dez. 2008.

PESCUMA, M.; HÉBERT, E.M.; MOZZI, F.; VALDEZ, G.F. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, n.30, p.73–81, 2010.

POULIOT, Y. Membrane processes in dairy technology—From a simple idea to worldwide panacea. **International Dairy Journal**, v.18, p.735– 740, 2008.

RAIKOS, V. Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces. A review. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p.259–265, 2010.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying na improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REKTOR, A.;VATAI, G. Membrane filtration of Mozzarella whey. **Desalination**, v.162, p. 279-286, 2004.

RIBEIRO, P.F.A. **Compostos bioativos de camu-camu (*Myrciaria dubia*) em função do ambiente de cultivo e do estágio de maturação**. f.128. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, 2012.

ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v.34, suppl.2, p.S105-S110, 2002.

ROBERTS, R.L.;GREEN, J.; LEWIS, B. Lutein and zeaxanthin in eye and skin health. **Clinics in Dermatology**, v. 27, p.195–201, 2009.

RODÍĆ, Z.; SIMONOVSKA, B.;ALBREHT, A.;VOVK, I. Determination of lutein by high-performance thin-layer chromatography using densitometry and screening of major dietary carotenoids in food supplements. **Journal of Chromatography A**, v.1231, p.59– 65, 2012.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**. IISI Human Nutrition Institute, United of States of American, 2001, 64p.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; JIMÉNEZ, J.P.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v.121, p.996-1002, 2010.

SABOYA, L.V.; MAUBOIS, J, -L. Current developments of microfiltration technology in the dairy industry. **EDP Sciences**, p.541–553, 2000.

SANTOS, D.T.; VEGGI, P.C.; MEIRELES, M.A.A. Extraction of antioxidant compounds from Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: Yield, composition and economical evaluation. **Journal of Food Engineering**, v.101, p.23–31, 2010.

SARI, P.;WIJAYA, C.H.; SAJUTHI, D.; SUPRATMAN, U. Colour properties, stability, and free radical scavenging activity of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit anthocyanins in a beverage model system: Natural and copigmented anthocyanins. **Food Chemistry**, v.132, p.1908–1914, 2012.

SAUFI, S.; FEE, C.J. Recovery of lactoferrin from whey using cross-flow cation exchange mixed matrix membrane chromatography. **Separation and Purification Technology**, v.77, p.68-75, 2011.

SCHOKKER, E.P.;SINGH, H.;CREAMER, L.K. Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin A and B with α -lactalbumin. **International Dairy Journal**, v.10, 843-853, 2000.

SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v.17, n.4, p.397-409, 2004.

SGARBIERI, V.C. Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, n.1, p. 43-56, 2005.

SHAO, A.; HATHCOCK, J. N. Risk assessment for the carotenoids lutein and lycopene. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.45, p.289–298, 2006.

SILVA, G.J.F.; CONSTANT, P.B.L.; FIGUEIREDO, R.W.; MOURA, S.M. Formulação e estabilidade de corantes de antocianinas extraídas das cascas de jabuticaba (*Myrciaria ssp.*). **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 3, p. 429-436, 2010.

SILVA, K.; BOLINI, H.M.A.; ANTUNES, A.J. Soro de leite bovino em sorvete. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 2, p. 187-196, 2004.

SILVA, M. F., TREICHEL, H. Aproveitamento de soro de leite para produção de polissacarídeos. **Vivências**, v. 1, n.3, p. 213-228, 2006.

SILVA, P.H.A.; FARIA, F.C.; TONON, B.; MOTA, S.J.D.; PINTO, V.T. Avaliação da composição química de fermentados alcoólicos de jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*). **Química Nova**, v31, p.595 – 600, 2008.

SILVA, P.I. **Otimização da extração e microencapsulamento de Polifenóis e Antocianinas de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*)**. f.173. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, 2011.

SILVA, P.I.; STRINGHETA,P.C.; TEÓFILO,R.F.; OLIVEIRA, I.R.N. Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. **Journal of Food Engineering**, v.113, p.365-504, 2012.

SILVA, P.I.; STRINGHETA,P.C.; TEÓFILO,R.F.; OLIVEIRA, I.R.N. Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. **Journal of Food Engineering**, v.113, p.365-504, 2012.

SILVA, S.R. **Extração e estabilidade de pigmentos antociânicos de frutos de maria-pretinha (*Solanum americanum, mill.*)**. 99p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 1996.

SILVA, V.M. **Sorvete Light com fibra alimentar: Desenvolvimento, caracterização físico-química, reológica e sensorial**. 147p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 2012.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J.A. JR. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144-158, 1965.

STRINGHETA, P. C.; BOBBIO, P. A. Copigmentação de Antocianinas. **Biociência e Desenvolvimento**, v. 14, p. 34-37, 2000.

STRINGHETA, P. C.; NACHTIGALL, A. M.; OLIVEIRA, T. T.; RAMOS, A. M.; SANT'ANA, H. M. P.; GONÇALVES, M. P. J. C. Luteína: propriedades antioxidantes e benefícios para a saúde. **Alimentos e Nutrição**, v.17, n.2, p.229-238, 2006.

STRINGHETA, P.C.; OLIVEIRA, T.T.; GOMES, R.C.; AMARAL, M.P.H.; CARVALHO, A.F.;VILELA, M.A.P. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n.2, p.181-194, 2007.

TARREGA, A.;RAMÍREZ-SUCRE, M.O.;VÉLEZ-RUIZ, J.F.;COSTELL, E. Effect of whey and pea protein blends on the rheological and sensory properties of protein-based systems flavoured with cocoa. **Journal of Food Engineering**, v.109, p.467-474, 2012.

TAULIER, N.; CHALIKIAN, T. Characterization of pH-induced transitions of β -LG: ultrasonic, densitometric, and spectroscopy studies. **Journal of Molecular Biology**, v.14, p.873-889, 2001.

TAYEFI-NASRABADI, H.; HOSEINPOUR-FAYZI, M.A.; MOHASSELI, M. Effect of heat treatment on lactoperoxidase activity in camel milk: A comparison with bovine lactoperoxidase. **Small Ruminant Research**, v.99, p.187-190, 2011.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMAN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCIO, M. D. Produção de Carotenoides: Microrganismos como Fonte de Pigmentos Naturais. **Química Nova**, v.32, n.9, p.2429-2436, 2009.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; BARRA, K.; STRINGUETA, P. C. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v.23, p.141-149, 2008.

VOLP, A.C.P.; RENHE, I.R.T.; STRINGUETA, P.C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição**, v.20, n.1, p. 157-166, 2009.

WAKABAYASHI, H.; YAMUUCHI, K.; TAKASE, M. Review: Lactoferrin research, technology and applications. **International Dairy Journal**, v.16, p.1241–1251, 2006.

WALSTRA, P., & JENNESS, R. **Dairy Chemistry and Physics**. New York: John Wiley and Sons, 1984.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. **Dairy Science and Technology**, New York: 2^a edition, Taylor & Francis Group, 2006, 763p.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, v.45, p. 304–309, 1997.

WEHR, H. M.; FRANK, J. F. Standard Methods for the Examination of Dairy Products In: **American Public Health Association**. 17th ed. Washington, 2004.

WHO, World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO technical report series 916. Geneva, Switzerland, 2003. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/005/AC911E/AC911E00.HTM>. Acesso: 02 de fevereiro de 2012.

XAVIER, A.A.O.; MERCADANTE, A.Z.; DOMINGOS, L.D.; VIOTTO, W.H. Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico para determinação de corante à base de luteína adicionado em iogurte desnatado. **Química Nova**, v.35, n^o.10, p.2057-2062, 2012.

YEE, K. W.K.; WILEY, D.E.; BAO, J. Whey protein concentrate production by continuous ultrafiltration: Operability under constant operating conditions. **Journal of Membrane Science**, v. 290, p.125–137, 2007.

ZHANG, W.; ZHONG, Q. Microemulsions as nanoreactors to produce whey protein nanoparticles with enhanced heat stability by thermal pretreatment. **Food Chemistry**, v.119, p.1318–1325, 2010.

ZUBIOLO, C.; RODRIGUES, M. A. S.; OLIVEIRA, M. C.; AQUINO, L. C. L.; NUNES, M. L.; CASTRO, A. A. Estudo do desenvolvimento de bebida láctea funcional com adição de polpa de mamão e aveia. **Scientia Plena**, v.8, n.3, p.1-7, 2012.

ANEXOS

Quadro 1 – ANOVA das regressões obtidas para as respostas de acidez titulável e pH dos formulados

Bebidas proteicas adicionadas de Antocianinas						Bebidas proteicas adicionadas de Luteína				
Fontes de Variação	Acidez					Acidez				
	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>
Regressão	3	0,4085	0,1362	11,15	<.0001*	3	0,6148	0,2049	287,52	<.0001*
Resíduos	8	0,0977	0,0122			8	0,0057	0,0007		
Falta de Ajuste	2	0,0089	0,0044	0,37	0,7037 ^{ns}	2	0,0016	0,0008	1,17	0,3584 ^{ns}
Erro Puro	6	0,0888	0,0148			6	0,0041			
Total	11	0,5063				11	0,6205			
Fontes de Variação	pH					pH				
	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>
Regressão	3	0,0708	0,0236	2,40	0,1438 ^{ns}	3	0,0022	0,0007	2,28	0,1562 ^{ns}
Resíduos	8	0,0788	0,0098			8	0,0025	0,0003		
Total	11	0,1497				11	0,0047			

*Significativo a $p < 0,05$, ^{ns} não significativo a $p > 0,05$.

Quadro 2 – ANOVA das regressões obtidas para as respostas de sólidos solúveis totais e luminosidade (L*) dos formulados

Bebidas proteicas adicionadas de Antocianinas						Bebidas proteicas adicionadas de Luteína				
Fontes de Variação	Sólidos Solúveis Totais					Sólidos Solúveis Totais				
	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>
Regressão	3	55,3000	18,4333	42,62	0,0001*	3	49,8491	16,6164	52,47	<.0001*
Resíduos	8	3,4600	0,4325			8	2,5333	0,3167		
Falta de Ajuste	2	1,2328	0,6164	1,43	0,2955 ^{ns}	2	0,5121	0,2560	0,81	0,4788 ^{ns}
Erro Puro	6	2,9272	0,3712			6	2,0212	0,3368		
Total	11	58,7600				11	52,3825			
L*						L*				
Fontes de Variação	L*					L*				
	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>
Regressão	3	1231,1529	410,3843	49,86	<.0001*	3	1277,4242	425,8080	1201,94	<.0001*
Resíduos	8	65,8513	8,2314			8	2,8341	0,3542		
Total	11	1297,0043				11	1280,2584			

Significativo a $p < 0,05$, ^{ns} não significativo a $p > 0,05$. Apesar da significância da regressão para os valores da variável L dos formulados, não foi possível ajustar um modelo que melhor explicasse esta variação.

Quadro 3 – ANOVA das regressões obtidas para as respostas de a* (vermelho vs verde) e b* (amarelo vs azul) dos formulados

Bebidas proteicas adicionadas de Antocianinas						Bebidas proteicas adicionadas de Luteína				
Fontes de Variação	a*					a*				
	GL	SQ	QM	F	p	GL	SQ	QM	F	p
Regressão	3	4,0993	1,3664	0,77	0,5428 ^{ns}	3	5,3284	1,7761	74,39	<.0001*
Resíduos	8	14,2114	1,7764			8	0,1910	0,0238		
Total	11	18,3107				11	5,5194			
Fontes de Variação	b*					b*				
	GL	SQ	QM	F	p	GL	SQ	QM	F	p
Regressão	3	57,5521	19,1840	18,67	0,0006*	3	989,1240	329,7080	557,25	<.0001*
Resíduos	8	8,2191	1,0273			8	4,7334	0,5917		
Falta de Ajuste	-	-	-	-	-	1	0,7145	0,7145	1,21	0,3038 ^{ns}
Erro Puro	-	-				7	4,0189	0,5741		
Total	11	65,7713				11	993,8574			

Significativo a $p < 0,05$, ^{ns} não significativo a $p > 0,05$. Apesar da significância da regressão para os valores da variável a das bebidas adicionadas de luteína e os valores da variável b* das bebidas adicionadas de antocianinas, não foi possível ajustar um modelo que melhor explicasse essa variação.

Quadro 4 – ANOVA das regressões obtidas para as respostas de c* (saturação) e h* (tonalidade) dos formulados

Bebidas proteicas adicionadas de Antocianinas										
Fontes de Variação	c*					h*				
	GL	SQ	QM	F	p	GL	SQ	QM	F	p
Regressão	3	16,2575	5,4191	3,31	0,0783 ^{ns}	3	1110,8630	370,2876	15,29	0,0011*
Resíduos	8	13,1134	1,6391			8	193,7648	24,2206		
Total	11	29,3709				11	1304,6278			

Bebidas proteicas adicionadas de Luteína										
Fontes de Variação	c*					h*				
	GL	SQ	QM	F	p	GL	SQ	QM	F	p
Regressão	3	945,2948	315,0982	573,82	<.0001*	3	109,1304	36,3768	224,64	<.0001*
Resíduos	8	4,3930	0,5491			8	1,2954	0,1619		
Falta de Ajuste	1	0,9790	0,9790	1,78	0,2185 ^{ns}	1	0,0387	0,0387	0,24	0,6379 ^{ns}
Erro Puro	7	3,4140	0,4877			7	1,2513	0,1787		
Total	11	949,6878				11	110,4258			

Significativo a $p < 0,05$, ^{ns} não significativo a $p > 0,05$. Apesar da significância da regressão para os valores da variável h das bebidas adicionadas de antocianinas, não foi possível ajustar um modelo que melhor explicasse essa variação.

Quadro 5 – ANOVA das regressões obtidas para as respostas de atividade antioxidante, antocianinas totais e carotenoides totais dos formulados

Bebidas proteicas adicionadas de Antocianinas						Bebidas proteicas adicionadas de Luteína				
Fontes de Variação	Atividade Antioxidante					Atividade Antioxidante				
	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>
Regressão	3	0,4676	0,1558	5,46	0,0245*	3	0,0007	0,0002	1,56	0,2721 ^{ns}
Resíduos	8	0,2282	0,0285			8	0,0012	0,0002		
Falta de Ajuste	1	0,0533	0,0533	1,87	0,2088 ^{ns}	-	-			
Erro Puro	7	0,1749	0,0249			-	-			
Total	11	0,6959				11	0,0019			
Fontes de Variação	Antocianinas Totais					Carotenoides Totais				
	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>
Regressão	3	0,2587	0,0862	0,47	0,7143 ^{ns}	3	0,0779	0,0259	1,32	0,3343 ^{ns}
Resíduos	8	1,4820	0,1852			8	0,1576	0,0197		
Total	11	1,7407				11	0,2354			

*Significativo a $p < 0,05$, ^{ns} não significativo a $p > 0,05$.

Quadro 6 – ANOVA das regressões obtidas para as respostas de fenólicos totais das formulações adicionadas de antocianinas

Bebidas proteicas adicionadas de Antocianinas					
Fontes de Variação	Fenólicos Totais				
	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>
Regressão	3	4561,4602	1520,4867	109,57	0,0001*
Resíduos	8	111,0166	13,8770		
Falta de Ajuste	1	1,9543	1,9543	0,14	0,7172 ^{ns}
Erro Puro	7	109,0623	15,5803		
Total	11	4672,4767			

*Significativo a $p < 0,05$, ^{ns} não significativo a $p > 0,05$.

ESTUDO DE ESTABILIDADE

Quadro 7 – ANOVA das regressões obtidas para as respostas de acidez e pH das bebidas F3 e F6.

Fontes de Variação	F3					F6				
	Acidez					Acidez				
	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>
Regressão	5	0,0082	0,0017	0,22	0,9462 ^{ns}	5	0,0009	0,0001	0,16	0,9716 ^{ns}
Resíduos	12	0,0897	0,0074			12	0,0142	0,0011		
Total	17	0,0980				17	0,0151			
Fontes de Variação	pH					pH				
	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>
Regressão	5	0,0167	0,0033	0,28	0,9151 ^{ns}	5	0,0265	0,0052	1,91	0,1664 ^{ns}
Resíduos	12	0,1430	0,0119			12	0,0330	0,0027		
Total	17	0,1597				17	0,0525			

F3: bebida proteica com 4,0% de proteína adicionada de antocianinas; F6: bebida proteica com 2,0% de proteína adicionada de luteína.

*Significativo a $p < 0,05$, ^{ns} não significativo a $p > 0,05$.

Quadro 8 – ANOVA das regressões obtidas para as respostas de sólidos solúveis totais, antocianinas totais e carotenoides totais das bebidas F3 e F6.

Fontes de Variação	F3					F6				
	Sólidos Solúveis Totais					Sólidos Solúveis Totais				
	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>
Regressão	5	0,9667	0,1933	3,00	0,0552 ^{ns}	5	0,7294	0,1458	0,30	0,9016 ^{ns}
Resíduos	12	0,7733	0,0644			12	5,7733	0,4811		
Total	17	1,7400				17	6,5027			
Fontes de Variação	Antocianinas Totais					Carotenoides Totais				
	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>
Regressão	5	0,0362	0,0072	0,11	0,9870 ^{ns}	5	0,4431	0,8867	1,80	0,1872 ^{ns}
Resíduos	12	0,7652	0,0637			12	0,5906	0,0492		
Total	17	0,8014				17	1,0337			

F3: bebida proteica com 4,0% de proteína adicionada de antocianinas; F6: bebida proteica com 2,0% de proteína adicionada de luteína.

*Significativo a $p < 0,05$, ^{ns} não significativo a $p > 0,05$.

Quadro 9 – ANOVA das regressões obtidas para as respostas de atividade antioxidante e valores de L* (luminosidade) das bebidas F3 e F6.

Fontes de Variação	F3					F6				
	Atividade Antioxidante					Atividade Antioxidante				
	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>
Regressão	5	0,2816	0,0563	0,63	0,6823 ^{ns}	5	0,0013	0,0003	1,32	0,3190 ^{ns}
Resíduos	12	1,0768	0,0897			12	0,0023	0,0002		
Total	17	1,3584				17	0,0036			
Fontes de Variação	L*					L*				
	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>	GL	SQ	QM	F	<i>p</i>
	Regressão	5	1,4626	0,2925	0,03	0,9992 ^{ns}	5	1,9039	0,3807	0,29
Resíduos	12	102,4310	8,5359			12	15,8959	1,3246		
Total	17	103,8936				17	17,7998			

F3: bebida proteica com 4,0% de proteína adicionada de antocianinas; F6: bebida proteica com 2,0% de proteína adicionada de luteína.

*Significativo a $p < 0,05$, ^{ns} não significativo a $p > 0,05$.

Quadro 10 – ANOVA das regressões obtidas para as respostas de c^* (saturação) e h^* (tonalidade) das bebidas F3 e F6.

Fontes de Variação	F3					F6				
	GL	SQ	QM	F	p	GL	SQ	QM	F	p
Regressão	5	1,6484	0,3297	0,38	0,8516 ^{ns}	5	7,7960	1,5592	0,69	0,6390 ^{ns}
Resíduos	12	10,3538	0,8628			12	27,0280	2,2523		
Total	17	12,0022				17	34,8240			
Fontes de Variação	h^*					h^*				
	GL	SQ	QM	F	p	GL	SQ	QM	F	p
Regressão	5	324,0988	64,8197	1,20	0,3661 ^{ns}	5	0,2250	0,0450	0,16	0,9710 ^{ns}
Resíduos	12	648,2856	54,0238			12	3,2896	0,2741		
Total	17	972,3844				17	3,5146			

F3: bebida proteica com 4,0% de proteína adicionada de antocianinas; F6: bebida proteica com 2,0% de proteína adicionada de luteína.

*Significativo a $p < 0,05$, ^{ns} não significativo a $p > 0,05$.

Quadro 11 – ANOVA das regressões obtidas para as respostas de ΔE^* (diferença global de cor) das bebidas F3 e F6.

Fontes de Variação	F3					F6				
	GL	SQ	ΔE^*		<i>p</i>	GL	SQ	ΔE^*		<i>p</i>
			QM	F				QM	F	
Regressão	5	18,0772	3,6154	8,35	0,0013*	5	9,4457	1,8891	10,61	0,0004*
Resíduos	12	5,1966	0,4330			12	2,1361	0,1780		
Falta de Ajuste	3	2,3472	0,7824	1,81	0,1995 ^{ns}	4	1,3749	0,3437	1,93	0,1699 ^{ns}
Erro Puro	9	2,8494	0,3166			8	0,7612	0,0952		
Total	17	23,2738				17	11,5818			

F3: bebida proteica com 4,0% de proteína adicionada de antocianinas; F6: bebida proteica com 2,0% de proteína adicionada de luteína.

*Significativo a $p < 0,05$, ^{ns} não significativo a $p > 0,05$.