

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

**IOGURTE PROBIÓTICO COM TEOR REDUZIDO DE
LACTOSE ADICIONADO DE ÓLEO DE LINHAÇA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Larissa Vargas Becker

**Santa Maria, RS, Brasil
2009**

IOGURTE PROBIÓTICO COM TEOR REDUZIDO DE LACTOSE ADICIONADO DE ÓLEO DE LINHAÇA

Por

Larissa Vargas Becker

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Neila Silvia Pereira dos Santos Richards

**Santa Maria, RS, Brasil
2009**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos
Alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**IOGURTE PROBIÓTICO COM TEOR REDUZIDO DE LACTOSE
ADICIONADO DE ÓLEO DE LINHAÇA**

elaborada por
Larissa Vargas Becker

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA

**Prof^a. Dr^a. Neila Silvia Pereira dos Santos Richards (UFSM)
(Presidente/Orientadora)**

Prof^a. Dr^a. Rosane da Silva Rodrigues (UFPel)

Prof^a. Dr^a. Leadir Lucy Martins Fries (UFSM)

Santa Maria, 16 de fevereiro de 2009

Dedico este trabalho aos meus pais,
Vânia e Alfonso, pela dedicação,
amor e esperança que sempre
demonstraram a mim e as minhas irmãs.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Vânia e Alfonso, que me deram uma asa cada um para que eu pudesse voar!

À Prof^a. Dr^a. Neila Richards pela orientação, compreensão, paciência e amizade.

Às minhas irmãs, Mariana e Lara, que são a ligação mais curta com o meu passado e a mais forte com o meu futuro.

À colega e amiga Larissa Alves pela colaboração, apoio, incentivo e exemplo de dedicação e determinação.

A todos os tios e tias que me apoiaram em especial a minha “fada madrinha” Nara (Goga) pela ajuda, carinho e patrocínio.

Aos primos, Carlos, Márcia, Eduardo e Maria Alice e aos cunhados Ciro e Johnson pela alegria em cada encontro.

Ao Tintim por fazer a minha infância muito feliz!

Ao Rafael por me apresentar caminhos de felicidade que eu jamais conheceria. Pela paciência, apoio, compreensão e por me fazer rir todos os dias.

Aos funcionários do departamento Ana Paula, Carlos, Lia, Liana, Moisés, Maria, Marialene e Marta pelos grandes ensinamentos e amizade.

Aos acadêmicos Diego, Mateus e Mônica e à farmacêutica Paula pela valiosa contribuição, apoio técnico e amizade.

Aos professores e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos pelo auxílio e apoio prestados.

Às queridas amigas Aline, Luciana e Tatiana pela alegria, apoio e companheirismo.

Ao professor Ptolomeu pela disposição e valiosa colaboração.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

Mostremos valor constância
Nesta ímpia injusta guerra
Sirvam nossas façanhas
De modelo a toda terra

(Trecho Hino Riograndense)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

IOGURTE PROBIÓTICO COM TEOR REDUZIDO DE LACTOSE ADICIONADO DE ÓLEO DE LINHAÇA

Autora: Larissa Vargas Becker
Orientador (a): Professora Dr^a. Neila Silvia Pereira dos Santos Richards
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 16 de fevereiro de 2009.

Mais de 50% da população mundial apresenta condições de deficiência de lactase, sendo que no Brasil, 58 milhões de pessoas sofrem de tal desordem genética. O objetivo deste trabalho foi o de produzir iogurte probiótico com teor reduzido de lactose e adicionado de óleo de linhaça e estudar a viabilidade das bactérias lácticas e bífidas frente ao óleo de linhaça e diferentes teores de lactose. Três dos sete tratamentos desenvolvidos foram adicionados de 0,2; 0,5 e 0,8g de enzima lactase por litro de leite respectivamente. Foram realizadas análises microbiológicas e físico-químicas nos iogurtes. Os iogurtes com reduzidos teores de lactose apresentaram queda de pH e aumento de acidez menos acentuada que os demais iogurtes em vinte e oito dias de armazenamento. Os teores de lactose encontrados nos iogurtes com adição de lactase são considerados baixos, dentro dos padrões regulamentados pela legislação de alimentos para fins especiais. A relação encontrada entre *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* foi de 2:1 favorecendo a diminuição da pós-acidificação. O número de células viáveis de *Bifidobacterium sp.* e *Lactobacillus acidophilus* assim como o de bactérias lácticas se mantiveram até o final da estocagem conforme preconizado na legislação brasileira. Os teores de gordura foram maiores para os iogurtes adicionados de óleo de linhaça e farinha de arroz concomitantemente. Apenas um dos iogurtes apresentou-se de acordo com a legislação quanto ao teor de proteínas, provavelmente pela substituição do leite em pó pela farinha de arroz na formulação dos iogurtes. Considerando os resultados obtidos pode-se inferir que a enzima lactase utilizada hidrolisou eficientemente a lactose dos iogurtes e não comprometeu a viabilidade dos microrganismos da cultura tradicional como da cultura probiótica.

Palavras-chave: iogurte, probiótico, lactose, óleo de linhaça.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Post-Graduation Program in Food Sciences and Technology
Federal University of Santa Maria

PROBIOTIC YOGURT WITH REDUCED LACTOSE CONTENT WITH FLAXSEED OIL

Author: Larissa Vargas Becker
Supervisor: Professor Doctor Neila Silvia Pereira dos Santos Richards
Place and Date of Defense: Santa Maria, February 16, 2009.

More than 50% of the world population presents conditions of lactase deficiency, in Brazil, 58 million people undergo such genetic disorder. The goal of the present work was to produce probiotic yogurt with reduced content of lactose added flaxseed oil and to study the viability of lactic and bifid bacteria compared to the flaxseed oil and different contents of lactose. Three out of the seven developed treatments were added with 0,2; 0,5 and 0,8g of lactase enzyme per liter of milk respectively. Microbiological and physico-chemical analysis were carried out in the yogurts. The yogurts with reduced lactose presented a decrease in pH and an increase in the acidity less strong than the other yogurts during twenty-eight days of storage. The contents of lactose found in the yogurts which were added with lactase are considered low, within the patterns and regulations of the for special dietary uses legislation. The ratio found between *Streptococcus salivarius ssp. Thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* was 2:1, which favors the decrease of post-acidification. The number of viable cells of *Bifidobacterium sp.* and *Lactobacillus acidophilus* as well as the lactic bacteria stood until the end of the storage period according to the recommendations of the legislation. The fat contents were higher in yogurts added with flaxseed oil and rice flour concomitantly. Only one of the yogurts fit the legislation concerning protein content, probably due to the substitution of powder milk by the rice flour in the yogurts. Considering the results it is possible to infer that the enzyme lactase used in the experiment efficiently hydrolyzed the lactose of the yogurts and did not compromise the viability of microorganisms of the traditional culture as the probiotic culture.

Key words: yogurt, probiotic, lactose, flaxseed oil.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
SUMÁRIO	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1. Iogurte	12
2.2. Probióticos	15
2.2.1. Principais Bactérias Probióticas	18
2.2.2. Gênero Bifidobacterium	19
2.2.3. Gênero Lactobacillus	20
2.2.4. Mecanismos de Atuação dos Probióticos	21
2.2.5. Benefícios dos Probióticos	22
2.2.6. Viabilidade Probiótica	23
2.2.7. Probióticos e Laticínios	24
2.2.8. Probióticos e Intolerância à lactose	24
2.3. Lactose	25
2.3.1. Utilização da lactose pelas bactérias lácticas	26
2.3.2. Hidrólise da Lactose	27
2.3.3. Intolerância à Lactose	29
2.4. Lactase	30
2.5. Óleo de linhaça	31
2.5.1. Ácido linolênico	32
2.6. Farinha de arroz	33
3. ARTIGO 1	34
4. ARTIGO 2	61
5. DISCUSSÃO	83
6. CONCLUSÃO	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
8. APÊNDICES	102
8.1. Apêndice 1	103
8.2. Apêndice 2	106
8.3. Apêndice 3	107
8.4. Apêndice 4	106

1 INTRODUÇÃO

O iogurte é um dos derivados lácteos mais consumidos pela população brasileira. Apesar disso, muitos estudos mostram que uma porcentagem significativa da população mundial sofre com transtornos gastrointestinais quando consome leite e derivados lácteos.

Tais sintomas são oriundos da deficiência ou ausência da enzima intestinal beta galactosidase (lactase), este transtorno é chamado de intolerância à lactose. A lactase é responsável pela quebra da molécula de lactose, o principal carboidrato do leite. A quebra da lactose origina dois monossacarídeos, glicose e galactose, mais facilmente absorvidos pelo intestino (SUENGA *et al.*, 2003).

A intolerância à lactose é uma desordem genética muito comum. No Brasil, 58 milhões de pessoas apresentam alguma dificuldade em digerir a lactose pela deficiência da enzima lactase no intestino (BATAVO, 2004).

É possível que os indivíduos aumentem sua tolerância a produtos lácteos por ingestão de produtos fermentados como o iogurte, devido ao fato do teor de lactose ser menor (KLEINMAN, 1990). A lactose presente no iogurte é mais facilmente digerível, pois cerca de 50% de sua concentração original já foi hidrolisada durante a fermentação (BRANDÃO, 1995).

Produtos lácteos fermentados e leite com baixo teor de lactose têm sido recomendados para pessoas com intolerância à lactose. Tal fato atribui-se à alta atividade da lactase presente nos microrganismos usados na produção do iogurte (principalmente *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*) quando comparados com outras bactérias produtoras de ácido láctico (SHAH; FEDORAK; JELEN, 1992; SWAGERTY; WALLING; KLEIN, 2002).

O Brasil ainda possui um mercado pouco voltado para produtos específicos aos consumidores intolerantes à lactose, com exceção dos leites UAT (ultra alta temperatura – esterilizado) (ABLV, 2005).

A utilização da lactase para hidrolisar a lactose pode ser uma boa opção aos consumidores intolerantes à lactose.

Existe um crescente interesse em pesquisar usos potenciais da lactase na hidrólise da lactose em produtos lácteos (MANAN; KARIM e KIT, 1999).

O presente trabalho teve por objetivo produzir iogurte probiótico adicionado de óleo de linhaça e com teor reduzido de lactose utilizando para isso a enzima lactase. Assim contribui-se para o conhecimento científico e o aprimoramento de técnicas para que a indústria alimentícia possa atender melhor os consumidores intolerantes à lactose, proporcionando-lhes assim produtos que atendam as suas necessidades especiais.

Além disso, também foram avaliados os aspectos microbiológicos e físico-químicos. Nessa perspectiva os objetivos específicos foram:

- Determinar a redução no teor de lactose dos iogurtes tratados com a enzima lactase;
- Determinar o número e proporção entre as bactérias lácticas dos iogurtes tratados com a enzima lactase e o óleo de linhaça;
- Avaliar o comportamento das culturas utilizadas nos iogurtes adicionados de lactase e óleo de linhaça;
- Caracterizar físico-quimicamente, quanto aos teores de pH, acidez, proteína, gordura, umidade, cinzas, extrato seco total, extrato seco desengordurado e lactose, o iogurte produzido a partir de leite com baixo teor de lactose e óleo de linhaça.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Iogurte

Segundo Rasic e Kurmann (1978) o iogurte foi originalmente produzido na Ásia, no século VIII. O iogurte é um alimento e bebida tradicional nos Bálcãs e na Ásia Mediterrânea a palavra “iogurte” é derivada da palavra turca “jugurt”, sendo conhecida por uma variedade de nomes em diferentes países (TAMIME e DEETH, 1980).

O uso de produtos fermentados na alimentação humana data de vários séculos. Galeno, célebre médico grego do século II a.C. descreveu as virtudes deste alimento, realçando a sua maior digestibilidade comparativamente ao leite e o seu efeito benéfico e purificador no excesso de bÍlis e nos problemas estomacais (GONZÁLEZ, 1997).

Em Damasco, no século VIII, surgiu um livro de medicina intitulado “Grande explicação do Poder dos Elementos da Medicina”. Nesta obra, sucessivamente complementada e atualizada por diversos médicos eruditos gregos, árabes e hindus, recomendava-se unanimemente o consumo de iogurte como calmante, refrescante e regulador intestinal (GAVA, 1984).

A fermentação do leite através das culturas lácticas resulta vários tipos de produtos, todos com vida de prateleira mais extensa do que o leite fresco devido à formação de componentes metabólicos como ácido láctico, ácido propiônico, diacetil e substâncias antagonísticas que exercem efeito inibitório nas bactérias gram-negativas responsáveis pela deterioração do produto (MARTINS et al., 1988; VEDAMUTHU, 1991; VOSNIAKOS et al., 1991). Além de aumentar a vida de prateleira do leite *in natura*, o processo fermentativo em si torna o produto mais seguro e nutritivo. Os principais tipos de leites fermentados são: iogurte, kefir e leite acidófilo, sendo o iogurte o mais popular (RAPACCI, 1999).

Durante a fermentação, a proteína, a gordura e a lactose do leite sofrem hidrólise parcial, tornando o produto facilmente digerível, sendo considerado agente regulador das funções digestivas (ÇON et al. 1996; MANZANARES, 1996).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) iogurte é o produto cuja fermentação se realiza com cultivos protosimbióticos de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* aos quais podem ser acompanhados, de forma complementar, de outras bactérias ácido-lácticas que, por sua atividade contribuem para a determinação das características do produto final.

De acordo com Brandão (1995), o iogurte fornece uma melhor assimilação, pelo organismo, de certos componentes, principalmente a lactose e proteínas.

É considerado um “produto vivo”, contendo até cinco bilhões de células por grama (BEHMER, 1991; OLIVEIRA e CARUSO, 1996).

O pH e a temperatura ótima para o desenvolvimento do *Streptococcus* estão em torno de 6,8 e 38°C, enquanto que o *Lactobacillus* estão compreendidos em 6,0 e 43°C. O primeiro chega até 90° Dornic de acidez, enquanto que o segundo vai até 140° Dornic (BEHMER, 1976).

Entretanto, a cultura (start) do iogurte deve conter uma percentagem igual das duas bactérias, do contrário não se obterá a consistência e a característica desejável do odor no produto industrializado (BEHMER, 1999).

Durante a fermentação do iogurte o *S. thermophilus* é o primeiro a desenvolver-se e, preparando assim condições propícias ao desenvolvimento do *Lactobacillus* (produção de ácido fórmico e pirúvico, começo da acidificação: abaixamento do potencial oxiredutor).

Além de prosseguir a fermentação láctica, o *Lactobacillus* hidrolisa certas proteínas que fornecerão ao *Streptococcus* os peptídeos e os aminoácidos essenciais à continuação do seu desenvolvimento. O *Lactobacillus* é o principal produtor de compostos responsáveis pelo sabor e o aroma característico do iogurte (acetaldeído, diacetil, etc.) (FERREIRA, 1996).

Durante a preparação do iogurte as duas bactérias fermentam a lactose, conforme quadro 1.



Quadro 1 – Fermentação da lactose

A refrigeração do iogurte interrompe o crescimento das bactérias lácticas, que mantém, no entanto, certa atividade metabólica (FERREIRA, 1996).

É por isso que a acidez do produto tem tendência a aumentar durante o armazenamento enquanto sua viscosidade diminui.

O iogurte fabricado em boas condições de higiene e mantido no frio pode permanecer comestível durante aproximadamente 30 dias (LAÇASSE BEHMER, 1999).

O consumo de iogurte está relacionado à imagem positiva de alimento saudável e nutritivo, associado às suas propriedades sensoriais (TEIXEIRA *et al*, 2000). Este produto é uma rica fonte de proteínas, cálcio, fósforo, vitaminas e carboidratos.

No Brasil, o aumento do consumo de iogurte começou em 1970 e continuou com uma taxa excepcional de crescimento devido aos mais variados produtos disponíveis comercialmente, tais como iogurte congelado (*frozen*), o líquido e em forma de bebidas (BRANDÃO, 1987).

O crescente consumo do iogurte pode ser atribuído também aos benefícios que o mesmo traz ao organismo, como: facilitar a ação das proteínas e enzimas digestivas no organismo humano, facilitar a absorção de cálcio, fósforo e ferro e ser fonte de galactose – importante na síntese de tecidos nervosos e cerebrosídeos em crianças, bem como ser uma forma indireta de se consumir leite (FERREIRA *et al*, 2000).

Os iogurtes podem ser classificados de acordo com o processo de elaboração, adição de ingredientes, composição, consistência e textura. São eles (BRANDÃO, 1987; TAMIME DEETH, 1980):

- logurte tradicional (*set yogurt*): no qual o processo de fermentação ocorre dentro da própria embalagem, não sofre homogeneização e o resultado é um produto firme, mais ou menos consistente;
- logurte batido (*stirred yogurt*): o processo de fermentação ocorre em fermentadeiras ou incubadoras com posterior quebra do coágulo;
- logurte líquido (*fluid yogurt*): o processo de fermentação é realizado em tanques, é comercializado em embalagens plásticas tipo garrafa ou do tipo cartonadas.

Hoje, os laticínios estão mais centrados no iogurte batido, pois este permite aos produtores adicionar estabilizantes para prevenir a sinérese durante a vida de prateleira (LUCEY SINGH, 1998).

A figura 1 mostra o diagrama da produção do iogurte tradicional, batido e líquido.

O iogurte líquido difere do iogurte batido principalmente do ponto de vista sensorial, pela menor viscosidade e menos textura (OLIVEIRA, 1997). O iogurte natural ou tradicional deve ser fermentado dentro da embalagem na qual é comercializado. A legislação determina que sua consistência deva ser firme, pastosa ou semi-sólida, de cor branca, odor e sabor característicos. Deve ainda apresentar como requisitos físico-químicos 3,0g a 5,9g de gordura/ 100g e acidez na faixa de 0,6g a 1,5g de ácido láctico/ 100g (BRASIL, 2000).

2.2 Probióticos

De origem grega o termo probiótico significa 'para a vida'. Ao longo dos anos e de muitos estudos inúmeras definições surgiram para estabelecer o termo probióticos.

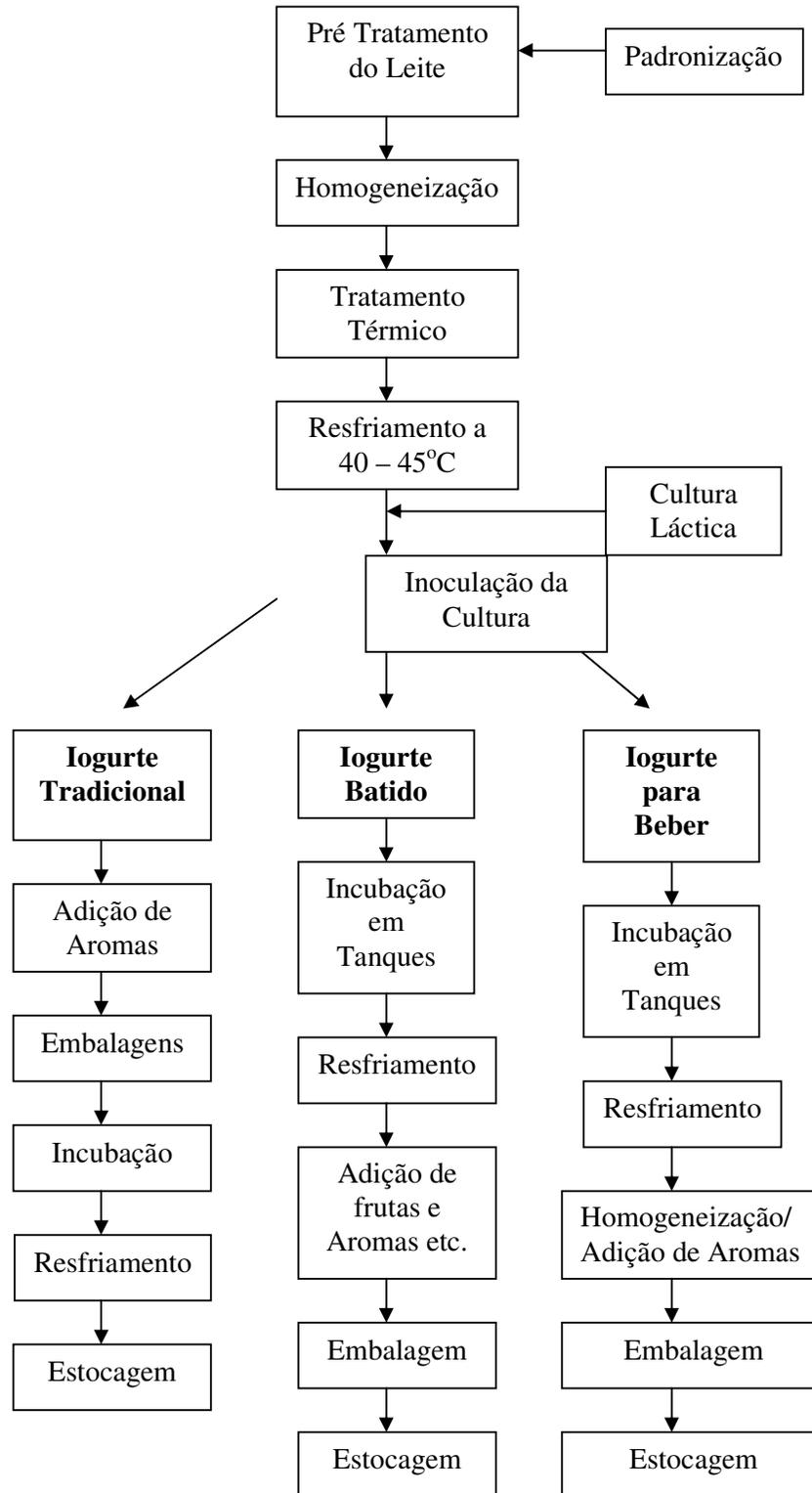


Figura 1 - Diagrama da produção de iogurte

Inicialmente foi proposto por Lilly e Stillwell (1965) como sendo compostos ou extratos de tecidos capazes de estimular o crescimento microbiano, posteriormente Parker (1974) definiu probiótico como relativo a organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal. Já para Fuller (1989) probióticos eram suplementos alimentares à base de microrganismos vivos, que afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o balanço de sua microbiota intestinal.

Entretanto, atualmente a definição aceita internacionalmente é: probióticos são microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

Os probióticos assim como os prebióticos enquadram-se no conceito de alimentos funcionais. O conceito diz que alimento funcional é aquele que além de fornecer a nutrição básica, promove a saúde. Tais alimentos possuem potencial para promover a saúde através de mecanismos não previstos através da nutrição convencional, devendo ser salientado que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura de doenças (SANDERS, 1998).

Os benefícios dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana são: efeitos antagônicos e a competição contra microrganismos indesejáveis e os efeitos imunológicos (PUUPPONEN-PIMIÄ *et al.*, 2002).

Normalmente estão presentes no intestino milhares de espécies de bactérias. Essas bactérias têm grande influência sobre as reações bioquímicas do hospedeiro. Assim, quando em equilíbrio, essa microbiota impede que microrganismos patogênicos presentes na mesma exerçam seus efeitos patogênicos.

Consequentemente, estando em desequilíbrio há a proliferação dos patógenos decorrendo em uma infecção bacteriana (ZIEMER E GIBSON, 1998). Os probióticos competem com as bactérias indesejáveis pelos nutrientes disponíveis no nicho ecológico.

O hospedeiro fornece as quantidades de nutrientes que as bactérias intestinais necessitam e estas indicam ativamente as suas necessidades, chama-se esta de relação simbiótica. Esta relação impede uma produção excessiva de nutrientes, a qual favorece o estabelecimento de competidores microbianos com potencial patogênico ao hospedeiro.

Segundo Koop-Hoolihan (2001), Calder Kew (2002), Guarner, Malagelada (2003) os probióticos podem impedir a multiplicação de seus competidores através de compostos antimicrobianos, principalmente as bacteriocinas.

O conhecimento da microbiota intestinal e suas interações levaram ao desenvolvimento de estratégias alimentares, objetivando a manutenção e o estímulo das bactérias normais ali presentes (GIBSON e FULLER, 2000).

É possível aumentar o número de microrganismos promotores da saúde no trato gastrointestinal (TGI), através da introdução de probióticos pela alimentação ou com o consumo de suplemento alimentar prebiótico, o qual irá modificar seletivamente a composição da microbiota, fornecendo ao probiótico vantagem competitiva sobre outras bactérias do ecossistema (CRITTENDEN, 1999).

2.2.1 Principais Bactérias Probióticas

Os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são os mais utilizados como probióticos, em menor escala está o *Enterococcus faecium*. Essas são as bactérias mais empregadas como suplementos probióticos para alimentos uma vez que elas têm sido isoladas de todas as porções do trato gastrointestinal do humano saudável. Segundo Charteris et al. (1998) e Bielecka et al. (2002) o íleo e o cólon parecem ser os locais de preferência para a colonização intestinal dos *Lactobacillus* e *Bifidobacterias*.

No entanto o efeito de uma bactéria é específico para cada cepa, não podendo ser extrapolado, inclusive para outras cepas da mesma espécie (GUARNER e MALAGELADA, 2003).

Até algum tempo atrás os probióticos eram consumidos principalmente em produtos lácteos. Porém, atualmente, a inclusão dos probióticos está em vários ramos da indústria alimentícia, como na dos vegetais fermentados e carnes (ROBERFROID, 2000).

2.2.2 Gênero *Bifidobacterium*

As bifidobacterias em geral são caracterizadas por serem Gram-positivas, da ordem actinomicetas. Não formam esporos, são desprovidas de flagelos, catalase negativas e anaeróbias (SGORBATI *et al.*, 1995). Foram isoladas pela primeira vez no final do século XIX por Tissier. Quanto à morfologia podem ser: bacilos com forma de bengala, bifurcados, curtos ou curvados.

O gênero *Bifidobacterium* inclui trinta espécies, das quais dez são de origem humana, dezessete de origem animal, duas de águas residuais e uma de leite fermentado, esta apresentando boa tolerância ao oxigênio. São caracterizadas por um conteúdo elevado de guanina e citosina que varia em termos molares de 54 a 67%.

São heterofermentativas, produzem ácido acético e láctico na proporção molar de 3:2 a partir de dois moles de hexose, sem a produção de CO₂, exceto durante a degradação do gluconato. A enzima chave desta via metabólica fermentativa é a frutose-6-fosfato fosfoacetolase, a qual pode por isso ser usada como marcador taxonômico na identificação do gênero, mas que não permite a diferenciação entre as espécies.

Além da glicose, todas as bifidobactérias de origem humana são capazes de utilizar a galactose, a lactose e a frutose como fontes de carbono. Crociani *et al.* (1994) apontou a possibilidade de algumas espécies serem capazes de fermentar hidratos de carbono complexos.

Os substratos fermentados pela maior parte das espécies foram D-galactosamina, D-glucosamina, amilose e amilopectina. A *Bifidobacterium infantis* foi a única espécie capaz de fermentar o ácido D-glucurônico, enquanto que estirpes de *Bifidobacterium longum* fermentaram a arabinogalactana, bem como as gomas arábica, ghatti e tragacantha.

O crescimento ótimo das bifidobacterias ocorre entre 37 e 41°C, ocorrendo máximos e mínimos de crescimento a 43-45°C e 25-28°C, respectivamente. O pH ótimo encontra-se entre 6 e 7, com ausência de crescimento em pHs muito alcalinos ou ácidos.

As bifidobacterias são de extrema importância no complexo ecossistema ativo no trato gastrointestinal humano como também de outros mamíferos (SGORBATI *et al.*, 1995).

Elas também dominam a microflora indígena dos recém-nascidos, sendo estimuladas pelos componentes glicoproteicos da κ -caseína. Sua proporção diminui com a idade, estabilizando-se como terceiro gênero mais abundante, ou seja, 25% da flora intestinal total (FINEGOLD *et al.*, 1983). O *Bifidobacterium longum* é uma espécie que perdura por toda a vida do hospedeiro, por esse fato é a espécie mais procurada para integrar alimentos funcionais (MITSUOKA, 1990).

Em relação aos fatores de crescimento os derivados do leite bovino e humano são considerados potenciais candidatos para assegurar um eficaz crescimento *in vitro* das bifidobacterias. Os hidrolisados preparados a partir da caseína (PROULX *et al.*, 1994) ou a partir do próprio leite (GOMES *et al.*, 1998) são bons exemplos, pois representam uma flexível fonte aminoácidos livres e peptídeos de diversos pesos moleculares.

As bifidobacterias sintetizam vitaminas do complexo B, elevando seu teor no produto fermentado, e o teor de lactose é diminuído em aproximadamente 20 a 25% devido à sua utilização pelos microorganismos. As bifidobacterias assim como o *Lactobacillus casei* produzem ácido láctico L(+), que é de mais fácil digestão para crianças de até um ano de idade, enquanto outros microorganismos produzem a forma D(-) ou DL(+/-) (HOLT *et al.*, 1994; TAMINE, MARSHALL, ROBINSON, 1995; FERREIRA, 1997).

2.2.3 Gênero *Lactobacillus*

Foi isolado pela primeira vez por Moro (1900), a partir das fezes de lactentes amamentados com leite materno.

Moro por sua vez atribuiu-lhes o nome de *Bacillus acidophilus*, designação genérica dos lactobacilos intestinais (GOMES e MALCATA, 1999).

Estes microrganismos são gram-positivos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, possuem forma de bacilo ou cocobacilo e podem ser anaeróbios ou aerotolerantes. As condições ótimas para sua multiplicação são temperaturas de 35-40°C e pH de 5,5-6,0.

As espécies mais utilizadas são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus casei*. Grande parte dos *L. acidophilus* degradam amigdalina, celobiose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, manose, sucrose e esculina (NAHAISI, 1986).

Dados apontam para uma melhor utilização da sucrose do que da lactose por parte do *Lactobacillus acidophilus*, fato atribuído a diferença nas atividades da β -galactosidase e da β -frutofuranosidase. Enquanto que a β -galactosidase é uma enzima construtiva do *Lactobacillus acidophilus* a β -frutofuranosidase pode ser induzida (GILLILAND et al., 2002).

Microrganismo heterofermentativo produz quase que exclusivamente ácido láctico a partir da degradação da glicose, embora possa também produzir algum acetaldeído, uma vez que o *L. acidophilus* exibe uma elevada atividade de treonina adolase (MARSHALL e COLE, 1983).

2.2.4 Mecanismos de Atuação dos Probióticos

O efeito dos probióticos pode ser dividido em efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos (FULLER, 1989).

- Supressão do número de células viáveis através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão.
- Alteração do metabolismo microbiano, através do aumento ou da diminuição da atividade enzimática.
- Estímulo da imunidade do hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos.

O desenvolvimento de probióticos eficazes aumenta a resistência contra patógenos. Puupponen-Pimiä *et al.* (2002) dizem que o emprego de culturas probióticas exclui microorganismos potencialmente patogênicos e reforça os mecanismos naturais de defesa do organismo.

Os probióticos auxiliam a recompor a microbiota intestinal, através da adesão e colonização da mucosa intestinal, esta ação impede a adesão e subsequente produção de toxinas ou invasão das células epiteliais por bactérias patogênicas.

2.2.5 Benefícios dos Probióticos

Tissier no início do século XX defendia que as bifidobacterias eram importantes para a nutrição e saúde das crianças e recém-nascidos afetados por diarreias. Ele atribuía às bifidobacterias a propriedade de remover bactérias putrefativas responsáveis pelas desordens gastrointestinais e de restabelecerem ecologicamente os microrganismos intestinais dominantes (GOMES e MALCATA, 1999). Tempo depois Metchnikoff alegava que o consumo de grandes quantidades de iogurte contendo *Lactobacillus acidophilus* resultava em um grande controle de infecções por patógenos entéricos (GOMES e MALCATA, 1999).

Os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas que mais se destacam são: controle da microbiota intestinal, estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos, promoção da resistência gastrintestinal à colonização por patógenos, diminuição da população de patógenos através da produção de ácido acético, ácido láctico e bacteriocinas, promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose, estimulação do sistema imune, alívio da constipação, aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas.

Ainda não totalmente elucidados estão: diminuição do risco de câncer de cólon (ROBERFROID, 2002) e de doença cardiovascular, diminuição das concentrações plasmáticas de colesterol, efeitos anti-hipertensivos, redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori*, controle da colite induzida por rotavírus e por *Clostridium difficile*, prevenção de infecções urogenitais, além de efeitos inibitórios sobre a mutagenicidade (SHAH, LANKAPUTHRA, 1997; CHARTERIS *et*

al., 1998; JELEN, LUTZ, 1998; KLAENHAMMER, 2001; KAUR, CHOPRA, SAINI, 2002; TUOHY *et al.*, 2003).

Outros benefícios atribuídos aos probióticos são a modulação de funções fisiológicas chaves, como a absorção de cálcio e, possivelmente, o metabolismo lipídico. Estudos mostraram a aplicação da inulina e da oligofrutose como fatores bifidogênicos.

Assim, há um estímulo do sistema imunológico do hospedeiro, conseqüentemente, redução nos níveis de bactérias patogênicas no intestino, alívio da constipação, diminuição do risco de osteoporose, resultante da absorção diminuída de minerais particularmente o cálcio.

Adicionalmente haveria uma redução do risco de arteriosclerose, através da diminuição na síntese de triglicérides e ácidos graxos no fígado e diminuição do nível desses compostos no sangue (KAUR, GUPTA, 2002).

2.2.6 Viabilidade Probiótica

Um fator importante é o controle da viabilidade das estirpes de probióticos no alimento que serve como veículo no momento do consumo, para que seja assegurado o efeito benéfico. Os produtos probióticos devem conter no mínimo 10^6 UFC/mL (BRASIL, 1997), sendo a dose diária recomendada de 10^8 - 10^9 células viáveis, realizável através da ingestão de 100g de produto fermentado contendo 10^6 - 10^7 células viáveis/mL (RASIC e KURMANN, 1983).

Segundo Kurmann e Rasic (1991), são múltiplos os fatores que afetam a viabilidade dos probióticos: pH, presença de microrganismos competitivos, temperatura de armazenagem e presença de inibidores bacterianos na matriz alimentar, como cloreto de sódio e peróxido de hidrogênio.

Na tentativa de melhorar a viabilidade a longo prazo das estirpes probióticas, foram realizados vários estudos sobre a substituição do vetor alimentar (DINAKAR e MISTRY, 1994; GOMES E MALCATA, 1998) como também da proteção de estirpes sensíveis ao ácido por microencapsulação com acetatoftalato de celulose (RAO *et al.*, 1989) ou com alginato de cálcio (KIM *et al.*, 1996).

2.2.7 Probióticos e laticínios

Os principais veículos de probióticos existentes hoje integram três grupos: alimentos infantis, leites fermentados e outros produtos lácteos e preparações farmacêuticas (RASIC e KURMANN, 1983).

Os laticínios fermentados por bactérias probióticas, principalmente lactobacilos e bifidobacterias, são alvos de muitos estudos. Tais produtos possuem elevado teor de nutrientes, que variam com o tipo de leite utilizado, de microorganismo adicionado e processo de fabricação.

De maneira geral o aumento da digestibilidade das proteínas e gorduras, a redução do conteúdo em lactose, a absorção acrescida de cálcio e ferro, o equilíbrio de conteúdo em várias vitaminas e a presença de alguns metabólitos secundários, acoplados à presença de células probióticas viáveis, fazem dos leites fermentados um dos alimentos naturais mais valiosos recomendados para o consumo humano (RASIC e KURMANN, 1983).

2.2.8 Probióticos e Intolerância à lactose

A alteração do metabolismo microbiano pelos probióticos ocorre por meio do aumento ou diminuição da atividade enzimática. Uma função vital das bactérias lácticas na microbiota intestinal é produzir a enzima β -D-galactosidase, auxiliando a quebra da lactose no intestino.

Essa ação é fundamental, particularmente no caso de indivíduos com intolerância à lactose, os quais são incapazes de digeri-la adequadamente, o que resulta em desconforto abdominal em grau variável (LOURENS-HATTINGH, VILJOEN, 2002).

Diversas evidências têm demonstrado que o consumo de quantidades adequadas, de cepas apropriadas de bactérias lácticas (incluindo bactérias lácticas não-probióticas como *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) é capaz de aliviar os sintomas de intolerância à lactose.

Assim, consegue-se incorporar produtos lácteos e os nutrientes importantes que fazem parte desses produtos de volta à dieta de indivíduos intolerantes à lactose, anteriormente privados da ingestão desses produtos. Estudos também provam que os probióticos diminuem a incidência e a duração das diarréias por rotavirus em lactentes (SAAVEDRA *et al.*; 1994).

Outros efeitos descritos foram a redução ou supressão da atividade de enzimas fecais, como a β -glicuronidase, a nitroreductase e a azorredutase (LEE *et al.*, 1999; KOPP-HOOLIHAN, 2001).

2.3 Lactose

A lactose (4-O- β -D-galactopiranosil-D-glicose) (LACTOSE, 1996) é um dissacarídeo sintetizado nas células alveolares da glândula mamária a partir de glicose sangüínea produzida essencialmente no fígado a partir do ácido propiônico proveniente da fermentação ruminal (GOURSAUD, 1985).

Físico-quimicamente a lactose está presente no leite, em média 5% no estado molecular em solução verdadeira, com partículas de diâmetros inferiores a 1 μ m (GOURSAUD, 1985; AMIOT, 1991; MANAN; KARIM; KIT, 1999). É formada por dois monossacarídeos, uma molécula de D-glicose e uma de molécula de β -D-galactose. O grupo no carbono anomérico da porção glicose não está envolvido na ligação glicosídica, ficando livre para reagir com agentes oxidantes, sendo considerada assim um açúcar redutor (CAMPBELL, 2000). Podemos observar a estrutura química da lactose na figura 2.

A lactose é cerca de dez vezes menos solúvel que a sacarose (VALSECHI, 2001). Tal característica pode causar cristalização e, conseqüentemente, problemas tecnológicos durante o processamento de alguns produtos.

A lactose também apresenta baixo poder adoçante. Sua hidrólise possibilita a obtenção de um xarope mais doce contendo glicose e galactose (SANTOS; LADERO; GARCÍA-OCHOA, 1998).

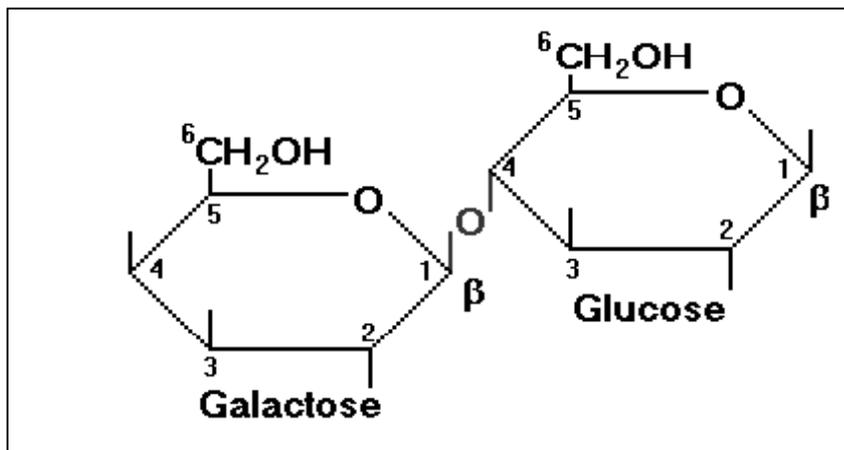


Figura 2 – Estrutura Química da Lactose

Fonte: MACEDO, 2003.

Segundo Carminatti (2001) a molécula de lactose contém um número de sítios ativos que a torna sensível a modificações enzimáticas e/ou químicas. Usada em produtos assados promove reação de Maillard, melhorando a coloração do alimento.

A lactose prolonga a ação da vitamina D, no caso de redução da radiação solar, colabora na prevenção do raquitismo e da osteomalácia (KOCIÁN, 1988).

2.3.1 Utilização da lactose pelas bactérias lácticas

A lactose, açúcar fermentescível mais importante no leite, não é usada diretamente nos processos fermentativos pelas bactérias lácticas (*Lactobacillus* e *Streptococcus*), mas indiretamente através da glicose e da galactose produzidas pela hidrólise de sua molécula através da beta-D-galactosidase com produção final de ácido láctico. Na figura 3 pode ser visualizada a fermentação da lactose.

Geralmente a produção de ácido láctico é detida em conseqüência de uma auto-inibição dos microrganismos pela acidez adquirida.

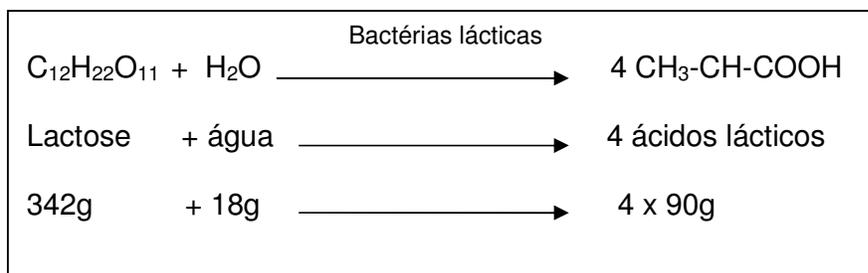


Figura 3 – Reação de Fermentação Láctica da Lactose

Fonte: GOURSAUD, 1985

Em uma fermentação mista, formada por *Lactobacillus* e *Streptococcus*, existe inibição ao se atingir pH 4,3 (GOURSAUD, 1985; FERREIRA, 1996).

Pela ação das bactérias lácticas, uma molécula de lactose dá origem a quatro moléculas de ácido láctico.

Uma vez que a lactase é uma endoenzima, precisa entrar na célula bacteriana para ser degradada posteriormente.

As bactérias homofermentativas produzem essencialmente ácido láctico, enquanto que as heterofermentativas produzem outros tipos de compostos, tais como ácido acético, propiônico, butírico e gás carbônico (VALESCHI, 2001).

Devido à ação metabólica das bactérias sobre os componentes do leite, estes são transformados em substâncias mais simples, permitindo o consumo por pessoas que, por deficiência da enzima lactase no organismo, não toleram a lactose (SALADO ANDRADE, 1989).

2.3.2 Hidrólise da Lactose

Segundo Silva e Cardoso (2007), a redução do teor de lactose no leite e seus derivados é de grande importância nutricional e comercial já que o consumo desses alimentos beneficiaria as pessoas intolerantes à lactose.

Além de modificar a solubilidade da lactose a hidrólise dessa molécula é cada vez mais importante na alimentação, pois se torna digerível aos consumidores intolerantes ao carboidrato (SCHLIMME e BUCHHEIM, 2002).

A hidrólise da lactose oferece certas vantagens tecnológicas, como a diminuição dos riscos de cristalização em derivados lácteos e o aumento do poder adoçante (SCRIBAN, 1985).

Dois métodos podem ser citados como principais na hidrólise da lactose. São eles: método químico e método enzimático.

- Método Químico: faz uso de altas temperaturas, que podem variar de 90° C a 150°C, e alta acidez (pH aproximadamente de 1,5). Nesse caso podem ocorrer problemas tecnológicos, como a desnaturação das proteínas do leite e a coloração e odor inaceitáveis pelo consumidor.
- Método Enzimático: pode ser aplicado no leite ou no soro sem tratamentos prévios. Nesse método a hidrólise é catalisada pela enzima lactase (β -galactosidase). A vantagem do método é de que a reação se processa em temperatura relativamente baixa (variando de 4° C a 40°C) o que resulta em economia energética e a não formação de produtos colaterais (SANTOS; LADERO; GARCÍA-OCHOA, 1998; VITOLO, 2001).

A hidrólise enzimática através da enzima β -galactosidase é um dos métodos mais interessantes para a redução dos teores de lactose no leite e seus derivados (MATIOLI *et al.*, 1994).

Além dos dois métodos apresentados existe também o método de hidrólise da lactose do leite a nível industrial, onde a lactose é eliminada através de ultrafiltração ou do uso de resinas catalíticas por enzimas livres ou imobilizadas em reator enzimático de membranas (MAHAUT *et al.*, 2004).

As enzimas utilizadas podem ser de origem fúngica ou microbiana (MAHAUT *et al.*, 2004) e sua estabilidade e atividade depende da sua procedência. Geralmente a β -galactosidase é extraída das leveduras alimentares *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis* (GACESA e HUBBLE, 1990).

2.3.3 Intolerância à Lactose

A lactose ingerida no iogurte é mais efetivamente digerida que a lactose do leite, ainda que o iogurte tenha quantidade equivalente em lactose. Este fato deve-se à hidrólise intestinal, pela ação da β -galactosidase microbiana dos organismos presentes no iogurte, durante a passagem no trato gastrointestinal (LIN, SAVIANO e HARLANDER, 1991).

A lactose presente no iogurte é mais facilmente digerível, pois cerca de 50% de sua concentração original já foi hidrolisada durante a fermentação, e as células bacterianas, durante o processo de metabolismo do organismo humano, sob condições gástricas, sofrem “lise”, liberando a lactase (BRANDÃO, 1995).

A lactase age sobre a lactose presente no leite, quebrando suas ligações e produzindo D-glicose e D-galactose, que são açúcares mais solúveis e de mais rápida absorção.

Deve-se ter atenção na hidrólise da lactose, pois a mesma sofre influência da temperatura, pH, tempo de reação e concentração da enzima fatores estes que influem na velocidade de reação (EVANGELISTA, 1998; GIST-BROCADES, 2004; PROZYN, 2004).

Nos casos de intolerância, a lactose passa ao cólon sem ser hidrolisada e é fermentada pelas bactérias aí presentes, produzindo ácido láctico, ácido butírico e outros ácidos voláteis que reduzem o pH das fezes para menos de 6,0.

Como resultados aparecem sintomas de desconforto em virtude da excessiva produção de gases dentro do intestino seguida de desordens intestinais como cólicas e diarreias (AGGETT et al., 2003). O excesso de lactose também exerce um efeito hiperosmótico, aumentando o volume de fluídos no intestino.

Por esses sintomas desagradáveis, as pessoas deficientes em lactase privam-se do consumo de leite e com isto de seus benefícios nutritivos (GOURSAUD, 1985; KOCIÁN, 1988; FERREIRA, 1997).

Intolerância à lactose é um termo usado para descrever a incapacidade de digerir a lactose devido à deficiência do sistema digestivo (KOCIÁN, 1988; MANAN; KARIM; KIT, 1999; TÉO, 2002).

A intolerância pode ser classificada em três grupos: intolerância genética, intolerância adquirida e intolerância transitória.

- Intolerância genética: é aquela congênita, manifestada em recém-nascidos e é uma condição permanente, a forma congênita é muito rara;
- Intolerância adquirida: manifesta-se após uma inflamação ou algum dano permanente na mucosa intestinal, geralmente ocorre em adultos e é muito comum;
- Intolerância transitória: usualmente é uma condição temporária, causada por dano na mucosa intestinal. Depois que o dano é reparado a mucosa regenera-se e passa a produzir lactase novamente (KOCIÁN, 1988; TÉO, 2002).

Conforme Auricchio et al., (2000), mais de 50% da população mundial apresentam condição de deficiência de lactase, sendo esta uma das mais comuns desordens genéticas. No entanto a lactose age como um promotor na absorção e na retenção de cálcio no intestino e na absorção de magnésio e manganês (MANAN; KARIM; KIT, 1999).

Segundo Moriwaki e Matioli (2002), a redução ou eliminação do leite e seus derivados da dieta de crianças intolerantes à lactose pode comprometer a absorção de proteínas e riboflavina, além do cálcio.

Portanto é recomendada a adição de cálcio nos produtos lácteos sem lactose ou com teor reduzido de lactose porque a absorção desse mineral no intestino é baixa sem a presença da lactose (KOCIÁN, 1988).

2.4 Lactase

A β -D-galactosidase galactohidrolase comumente chamada de lactase é uma hidrolase capaz de hidrolisar a lactose (CARMINATTI, 2001; OLIVEIRA, 2005; LONGO, 2006).

Ela pode ser encontrada em plantas (pêssegos e amêndoas), organismos animais (pele, intestinos e cérebro) bactérias (*Escherichia coli* e *Lactobacillus bulgaricus*), leveduras (*Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis*) e fungos (*Aspergillus foetidus* e *Aspergillus niger*) (CARMINATTI, 2001).

A legislação brasileira através da RDC nº 348/2003, diz que a enzima lactase utilizada na indústria alimentícia deve ser de origem microbiana, proveniente da levedura *Kluyveromyces lactis* (BRASIL, 2003).

A lactase hidrolisa a lactose em dois monossacarídeos D-glicose e D-galactose, mais facilmente absorvíveis e com maior solubilidade. A velocidade de reação da enzima depende de alguns fatores importantes como: pH, temperatura, tempo de reação e concentração da enzima (EVANGELISTA, 1998; GIST-BROCADES, 2004).

Normalmente a atividade enzimática aumenta com o aumento da temperatura, até atingir um potencial ótimo, aumentando assim a formação do complexo enzimático. Se o aumento da temperatura persistir a enzima será desnaturada e inativada pela ação do calor (RICHARD, 1985).

As enzimas possuem um pH ótimo onde sua atividade é máxima. A maioria das enzimas tem seu pH ótimo entre 4,5 e 8,0 (RICHARD, 1985).

Segundo Gist-Brocades (2004) a hidrólise enzimática da lactose estimula o crescimento das culturas lácticas *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* apesar das mesmas serem selecionadas pela sua habilidade em fermentar a lactose.

2.5 Óleo de Linhaça

A utilização da linhaça existe há séculos em países como África, Ásia e Europa, mais recentemente na América do Norte. O óleo de linhaça é extraído das sementes do linho ou sementes da linhaça (*Linum usitatissimum*). Para o consumo humano o óleo é extraído com prensagem à frio.

O maior produtor mundial de linhaça é o Canadá. Já na América do Sul a Argentina lidera a produção. O Brasil apresenta uma baixa produção, cerca de 21 toneladas/ano (GÓMEZ, 2003).

A linhaça é uma oleaginosa rica em ácido α -linolênico, entre 51-55% de ácido α -linolênico e 15-18% de ácido linoléico, ácidos graxos da família ômega-3 e ômega-6 respectivamente (PRASAD, 1998; VISENTAINER et.al., 2003).

O óleo de linhaça é classificado como alimento funcional por ser a mais rica fonte de ácidos graxos ômega-3 (PRASAD, 1997). Os óleos fornecem a maior fonte de energia, são fonte de ácidos graxos essenciais, contribuem para a sensação de saciedade e aumentam a palatabilidade (INSTITUTE OF SHORTENING AND EDIBLE, 1999). Também desempenham um papel fundamental como veículo para as vitaminas lipossolúveis como A, D, E e K (CASTRO, MENDES e SANTOS, 2004).

2.5.1 Ácido Linolênico

A classe de alimentos funcionais caracterizada por possuir propriedades específicas benéficas à saúde humana, além de fornecer nutrientes para o metabolismo (CORL et.al., 2001; ALBERTAZZI e COUPLAND, 2002) vem sendo objeto de grande interesse pela pesquisa. Os ácidos graxos poliinsaturados, como os da série ômega 3 e o ácido linoléico conjugado (CLA), estão relacionados à redução na incidência de doenças cardiovasculares, prevenção e tratamento de tumores (TAPIERO et.al., 2002) e prevenção da osteoporose (ALBERTAZZI e COUPLAND, 2002).

Diferentemente dos ácidos graxos monoinsaturados, os ácidos graxos poliinsaturados das famílias ômega-3 e ômega-6, chamados de ácidos graxos essenciais não podem ser produzidos endogenamente pelos seres humanos, sendo oriundos apenas da dieta (DUARTE, 2003; JONES, 2002; WAITZBERG, 2002), devido à falta das enzimas dessaturases delta 12 e delta 15 (JONES, 2002).

Alguns estudos sugerem que o consumo de ômega-3 reduz a taxa de colesterol no sangue, aumenta as lipoproteínas de alta densidade (HDL), reduz o teor de triglicérides, previne o câncer de próstata (LEE e LIP, 2003), ajuda no tratamento de acne, eczema, psoríase e artrite reumática (VISENTAINER et.al., 2003; METCALF et.al., 2003) reduz a ocorrência de arritmias e atua como antitrombótico (SHAHIDI e FINLEY, 2001).

Breslow (2005) diz que os possíveis mecanismos que promovem a redução do risco cardiovascular estejam relacionados a propriedades anti-arrítmicas, anti-hipertensivas, redutoras dos níveis de triglicédeos, estimuladoras da função endotelial, redutoras da agregabilidade plaquetária e dos mecanismos pró-inflamatórios.

2.6 Farinha de Arroz

O arroz é um alimento amplamente consumido pela população em geral. O Brasil encontra-se entre os dez maiores produtores mundiais, a produção nacional de arroz na safra 2007/2008 foi de 12,11 milhões de toneladas, superior em 7,0% à colheita na safra anterior (CONAB, 2008).

A região sul participa da produção nacional com 70,6%, tendo como principal estado produtor o Rio Grande do Sul com uma produção de 7,36 milhões de toneladas (CONAB, 2008).

O aproveitamento do arroz é de fundamental importância visto que no seu beneficiamento são gerados aproximadamente 14% de grãos quebrados conhecidos como quirera (CASTRO et.al., 1999), apresentando assim um menor valor comercial em relação aos grãos inteiros (LOPES, 1989).

O aproveitamento do subproduto do arroz pode ser através da utilização do mesmo como ingrediente em rações animais, vinícolas e cervejarias (SHIH et.al., 1999). Também tem sido usado na produção de cereais produtos hipoalergênicos, fórmulas infantis e alimentos com baixa caloria (LUNDUBWONG e SEIB, 2000). Segundo WANG et.al. (1994) o arroz vem sendo amplamente utilizado em produtos manufaturados como em grãos inflados e pudins.

A farinha de arroz possui características de grande valor para a alimentação: não é alergênica (existem variedades com ampla faixa de teor de amilose), pode ser usada por portadores de doença celíaca (substituindo o glúten), possui um grânulo pequeno apresentando textura suave e sabor brando frente ao cozimento (POLANCO et.al., 1995), contém baixos níveis de sódio e alta proporção de amidos facilmente digeríveis (TORRES et.al., 1999).

3 ARTIGO 1

Submetido a Revista Alimentos e Nutrição
(Configuração conforme normas da revista – Anexo 1)

ESTUDO DA VIABILIDADE DE BACTÉRIAS LÁCTICAS E BÍFIDAS EM IOGURTES COM BAIXO TEOR DE LACTOSE ACRESCIDOS DE ÓLEO DE LINHAÇA

Larissa Vargas BECKER**

RESUMO: Mais de 50% da população mundial sofre com a incapacidade de digerir a lactose. Os sintomas associados são normalmente caracterizados por dores e desconforto abdominais seguidas de desordens intestinais como cólicas e diarréias. Diversas evidências têm demonstrado que o consumo de quantidades adequadas de cepas apropriadas de bactérias lácticas (incluindo bactérias lácticas não-probióticas como *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) são capazes de aliviar os sintomas de intolerância à lactose. A presente pesquisa teve como objetivo elaborar iogurtes com baixo teor de lactose, acrescidos de farinha de arroz e óleo de linhaça e estudar a viabilidade dos microrganismos probióticos nos produtos desenvolvidos. O menor valor de pH foi de 4,26 e o maior de acidez foi de 0,94% ácido láctico. A lactose foi hidrolisada em mais de 70% para os tratamentos com adição de enzima lactase. As contagens de microrganismos se mantiveram dentro do exigido pela legislação brasileira até o final da vida-de-prateleira.

PALAVRAS CHAVE: *bactérias lácticas e bífidas, iogurte, lactose, óleo de linhaça.*

**Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, s/n, CEP 97105-900 – Santa Maria – RS – Brasil. Email para correspondência: laribecker@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

A busca da população por alimentos que tragam algum benefício à saúde é cada vez maior. Como também é crescente entre consumidores com necessidades específicas a procura por produtos que supram suas carências.

A deficiência da enzima lactase é uma das desordens genéticas mais comuns entre a população. A intolerância à lactose é um termo usado para descrever a incapacidade de digerir a lactose devido à deficiência do sistema digestivo^{27,34,54}.

Mais de 50% da população mundial sofre com essa incapacidade de digerir a lactose⁴. Nesses casos a lactose passa ao cólon sem ser fermentada pelas bactérias aí presentes produzindo ácido láctico, ácido butírico entre outros ácidos voláteis fazendo com que o pH das fezes diminua para um valor inferior a 6,0.

Os sintomas associados variam de indivíduo para indivíduo, mas são normalmente caracterizados por dores e desconforto abdominais seguidas de desordens intestinais como cólicas e diarreias³. Além disso, a lactose fica em excesso no trato gastrointestinal exercendo um efeito hiperosmótico aumentando os fluídos no intestino, provocando gases e inchaços. Por esses sintomas o intolerante à lactose priva-se do consumo de leite e seus derivados bem como dos seus benefícios¹⁶.

Diversas evidências têm demonstrado que o consumo de quantidades adequadas de cepas apropriadas de bactérias lácticas (incluindo bactérias lácticas não-probióticas como *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) são capazes de aliviar os sintomas de intolerância à lactose. Assim, consegue-se incorporar produtos lácteos e os nutrientes importantes que fazem parte desses produtos de volta à dieta de indivíduos intolerantes à lactose, anteriormente privados da ingestão desses produtos.

A alteração do metabolismo microbiano pelos probióticos ocorre por meio do aumento ou diminuição da atividade enzimática. Uma função vital das bactérias lácticas na microbiota intestinal é produzir a enzima β -D-Galactosidase, auxiliando a quebra da lactose no intestino³².

Probióticos são microrganismos vivos que administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro^{18,46}, sendo que os principais benefícios dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana são: efeitos antagônicos e a competição contra microrganismos indesejáveis e os efeitos imunológicos⁴².

Já os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas que mais se destacam são: controle da microbiota intestinal, estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos, promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos, diminuição da população de patógenos através da produção de ácido acético, ácido láctico e bacteriocinas, promoção da digestão da lactose, estimulação do sistema imune, alívio da constipação, aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas.

Ainda não totalmente elucidados estão: diminuição do risco de câncer de cólon⁴³ e de doença cardiovascular, diminuição das concentrações plasmáticas de colesterol, efeitos anti-hipertensivos, redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori*, controle da colite induzida por rotavirus e por *Clostridium difficile*, prevenção de infecções urogenitais, além de efeitos inibitórios sobre a mutagenicidade^{49,11,26,25}.

Quando em equilíbrio a microbiota do hospedeiro impede que microrganismos patogênicos presentes na mesma exerçam seus efeitos patogênicos. Consequentemente estando em desequilíbrio há a proliferação dos patógenos decorrendo em uma infecção bacteriana⁴².

Os probióticos competem com as bactérias indesejáveis pelos nutrientes disponíveis no nicho ecológico. O hospedeiro fornece as quantidades de nutrientes que as bactérias intestinais necessitam e estas indicam ativamente as suas necessidades, chama-se esta de relação simbiótica. Esta relação impede uma produção excessiva de nutrientes, a qual favorece o estabelecimento de competidores microbianos com potencial patogênico ao hospedeiro.

Segundo Koop-Hoolihan²⁸, Calder Kew¹⁰, Guarner, Malagelada²¹ os probióticos podem impedir a multiplicação de seus competidores através de compostos antimicrobianos, principalmente as bacteriocinas.

O conhecimento da microbiota intestinal e suas interações levaram ao desenvolvimento de estratégias alimentares, objetivando a manutenção e o estímulo das bactérias normais ali presentes²⁰.

É possível aumentar o número de microrganismos promotores da saúde no trato gastrointestinal (TGI), através da introdução de probióticos pela alimentação ou com o consumo de suplemento alimentar prebiótico, o qual irá modificar seletivamente a composição da microbiota, fornecendo ao probiótico vantagem competitiva sobre outras bactérias do ecossistema¹³.

Alia-se aos benefícios dos probióticos a utilização de óleo de linhaça, que contém grandes quantidades de ácido α -linolênico (51 a 55%) e ácido linoléico (15 e 18%), ácidos graxos da família ômega-3 e ômega-6 respectivamente^{40,59}. O óleo de linhaça é considerado um alimento funcional por ser a mais rica fonte de ácidos graxos ômega-3³⁹, contribuindo para a sensação de saciedade e palatabilidade.

Os ácidos graxos poliinsaturados, como das famílias ômega-3 e ômega-6, são chamados de essenciais, pois não podem ser produzidos endogenamente pelos seres humanos sendo oriundos apenas da dieta^{15,24,60}.

Alguns estudos sugerem que o consumo de ácidos graxos poliinsaturados reduzem as taxas de colesterol no sangue, aumentam as lipoproteínas de alta densidade (HDL), reduz o teor de triglicérides, previne o câncer de próstata bem como reduz a ocorrência de arritmias^{30,50}.

Sendo assim, torna-se de grande interesse aos consumidores com intolerância à lactose, a produção de um alimento que proporcione uma melhora na qualidade de vida. Aliando as características especiais que os mesmos necessitam em relação ao baixo teor de lactose e os benefícios à saúde através das bactérias probióticas e do óleo de linhaça.

Assim torna-se oportuna a produção de um iogurte probiótico adicionado de óleo de linhaça com teor de lactose reduzido.

Objetivou-se com esse trabalho elaborar iogurtes com baixo teor de lactose, acrescidos de farinha de arroz e óleo de linhaça e estudar a viabilidade das bactérias lácticas e bífidas nos produtos desenvolvidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os produtos, análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas nos laboratórios do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos (DTCA) do Centro de Ciências Rurais (CCR) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Os iogurtes, num total de sete tratamentos, foram analisados no 1º, 7º, 14º, 21º e 28º dias de estocagem, quanto ao valor pH, acidez expressa em ácido láctico, teor de lactose e contagem de bactérias lácticas e bífidas. A análise físico-química foi realizada em triplicata⁸ e as microbiológicas em duplicata⁵⁶.

Materiais

Para o preparo dos iogurtes utilizou-se as seguintes matérias-primas:

Leite UHT desnatado;

Açúcar refinado especial;

Óleo de Linhaça Cisbraoleos (óleo bruto extraído por prensagem a frio);

Farinha de Arroz Favarin e Cia Ltda (F100 e F300), como substituto do leite em pó (Apêndice 4).

A enzima para a hidrólise da lactose utilizada foi:

Enzima β -Galactosidase Lactozym® 3000L HPG (Novozymes).

Culturas lácticas utilizadas:

Cultura tradicional: fermento láctico Rich®, contendo culturas superconcentradas de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (Chr. Hansen Ind. e Com. Ltda).

Cultura probiótica: fermento láctico probiótico Bio Rich®, contendo culturas superconcentradas de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus thermophilus* (Chr. Hansen Ind. e Com. Ltda.).

Tratamentos

Foram realizados os seguintes tratamentos:

- T1 - iogurte com adição de 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;
- T2 - iogurte com adição de 0,2% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;
- T3 - iogurte com adição de 0,5% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;
- T4 - iogurte com adição de 0,8% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;
- T5 - iogurte com adição 0,5% de Óleo de Linhaça;
- T6 - iogurte com adição de 1,5% de Farinha de Arroz;
- T7 - iogurte controle, sem adições de enzima, Óleo de Linhaça e Farinha de Arroz.

Preparação do leite adicionado de enzima lactase

Foram utilizados para cada tratamento, seis litros de leite UHT desnatado, divididos em alíquotas de dois litros, ou seja três repetições para cada tratamento, em frascos separados autoclavados com 2 litros de capacidade cada um. A seguir, acrescentaram-se quantidades diferentes de enzima lactase nos leites dos tratamentos T2, T3 e T4. Cada frasco foi assim denominado e rotulado: T2 (0,2% de enzima lactase), T3 (0,5% de enzima lactase), T4 (0,8% de enzima lactase). Todos os frascos foram então levados para temperatura controlada, 8°C por 12 horas, para sofrerem hidrólise da lactose.

Após esse período o leite passou pelo processo de aquecimento (92°C por 3 minutos) para inativação da enzima lactase.

Preparação da Cultura

As culturas utilizadas foram: Rich pacote com 1 grama contendo *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* e Bio Rich pacote com 1 grama contendo *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus thermophilus*.

Os dois pacotes foram diluídos e homogeneizados asépticamente em leite UHT integral previamente esterilizado. A porcentagem de cultura utilizada foi de 1% (V:V) para cada litro de leite para todos os tratamentos. O tempo zero foi considerado o momento de término da fermentação, para o tempo um foi considerado o pH após vinte e quatro horas após o término da fermentação.

Preparação do iogurte

Foram preparados 21 frascos com dois litros de leite UHT desnatado cada um, para a preparação dos iogurtes (três para cada tratamento). Cada frasco foi rotulado com um dos sete tratamentos (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7). Os tratamentos T2, T3 e T4 após a hidrólise da lactose e a inativação da enzima lactase seguiram o mesmo processo dos demais tratamentos.

Todos os frascos foram adicionados de: 8% de açúcar refinado e 0,1% de sorbato de potássio para cada litro de leite. Aos frascos T1, T2, T3, T4 e T6 foram adicionados 1,5% de farinha de arroz para cada litro de leite. Os tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5 receberam adição de 0,5% de óleo de linhaça para cada litro de leite.

Todos os tratamentos sofreram pasteurização à 92°C por 3 min., sendo que os que continham óleo de linhaça foram pasteurizados antes da sua adição. Seguiram então para resfriamento até 41°C para posterior fermentação.

Houve então a inoculação asséptica de 1% da cultura láctica para cada litro de leite preparada previamente.

Fermentação do Iogurte

Os tratamentos foram homogeneizados e fermentados em banho termostático à 41°C.

Durante o período de incubação foram feitas verificações de pH e acidez dos iogurtes a cada 30 minutos a partir da terceira hora de fermentação até que os mesmos atingissem pH de 4,6. Foram então resfriados e armazenados à temperatura constante de 8°C.

Análises Físico-Químicas dos Iogurtes

Realizou-se a seguinte caracterização físico-química dos iogurtes⁸.

- Valor de pH: pHmetro digital Micronal Modelo 320, com eletrodo de vidro combinado;
- Acidez expressa em ácido láctico;
- Determinação da lactose: foi determinada a glicose para então fazer-se a estequiometria da reação, considerando que para cada molécula de lactose degradada são formadas uma molécula de glicose e uma molécula de galactose.

Utilizou-se Kit Glicose Monoreagente K082 Bioclin, a leitura foi determinada por meio de espectrofotômetro modelo 600, marca FEMTO. A leitura da absorbância foi a 505 nm, e as amostras foram colocadas em banho-maria a 37°C por 15 minutos.

Análises Microbiológicas dos Iogurtes

Realizou-se a determinação de células viáveis de *Bifidobacterium sp.*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* e *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*.

Contagem de *Bifidobacterium sp.* – utilizou-se meio De Man, Rogosa e Sharp MRS-IM com glicose adicionado de dicloxacilina, cloreto de lítio e cloridrato de cisteína. A inoculação realizada foi por profundidade, após as placas foram invertidas e incubadas em jarras contendo gerador de anaerobiose Anaerobac (Probac) a 37°C por 72 horas¹².

Contagem de *Lactobacillus acidophilus* – utilizou-se meio De Man, Rogosa e Sharp MRS-IM com maltose. Foi realizada inoculação por profundidade, após as placas foram invertidas e incubadas em jarras com gerador de anaerobiose Anaerobac (Probac) a 37°C por 72 horas²³.

Contagem de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* – utilizou-se meio MRS ágar glicose acidificado. Foi realizada inoculação por profundidade em seguida as placas foram invertidas e incubadas em jarras contendo gerador de anaerobiose Anaerobac (Probac) a 37°C por 72 horas²².

Contagem de *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* – utilizou-se meio Ágar M 17 adicionado de lactose a 10%. A inoculação realizou-se em profundidade, logo após as placas foram invertidas e incubadas em aerobiose a 37°C por 48 horas²².

Análise Estatística

Os dados de lactose foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si através do teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os resultados foram analisados através do programa Statistic 7.0, utilizando o delineamento de blocos inteiramente casualizados⁵¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verifica-se que proporcionalmente ao aumento da acidez ocorre a queda do pH dos tratamentos durante os 28 dias de estocagem (Gráfico 1), relação conhecida como pós-acidificação³⁸. Esse fato se deve as bactérias lácticas continuarem suas atividades metabólicas mesmo depois da fermentação (Apêndice 2).

O aumento da acidez foi semelhante para os tratamentos, variando de 0,71 a 0,78% de ácido láctico para o primeiro dia de armazenagem até 0,85 a 0,94% de ácido láctico para o último dia de análise. Os resultados de acidez estão conforme a legislação vigente que estabelece um mínimo de 0,6g de ácido láctico/100g de iogurte e máximo de 1,5g de ácido láctico/100g de iogurte⁷.

Para os tratamentos T4, T2 e T3 obtiveram-se os menores valores de acidez, variando de 0,71 a 0,85%, 0,75 a 0,89% e 0,77 a 0,91% de ácido láctico respectivamente.

A fermentação cessou em pH variando entre 4,35 e 4,50. O pH apresentou queda durante a primeira semana de estocagem para todos os tratamentos, variando de 4,35 a 4,49 no primeiro dia até 4,29 a 4,44 no 28º dia.

Percebe-se que a queda de pH foi menos acentuada para os tratamentos adicionados de lactase em comparação com os demais, sendo que entre eles T4 (0,8% de lactase) apresentou os maiores valores de pH seguido por T2 (0,2% de lactase) e T3 (0,5% de lactase). Os valores encontrados foram de 4,42 a 4,39, 4,46 a 4,35 e 4,49 a 4,44 para T2, T3 e T4 respectivamente. As maiores quedas de pH foram notadas nos tratamentos T1 (4,29) e T7 (4,30) demonstrando assim uma maior pós-acidificação em comparação com os outros tratamentos.

Longo³¹ em seus estudos com leite pasteurizado adicionado de lactase observou que o pH variou de 4,27 a 4,48 e a acidez de 0,77 a 0,88% de ácido láctico para 12 dias de estocagem, estando estes valores semelhantes aos observados nesta pesquisa. Scherner⁴⁴ relata que alguns autores mencionam que o pH final do iogurte deve estar compreendido entre 3,8 e 4,2 para atingir as características sensoriais e de textura desejáveis.

Em pesquisa realizada por Malta et al.³³ com iogurtes comerciais os valores de pH encontrados foram inferiores a 4,5, importante para impedir o crescimento de bactérias contaminantes.

Todos os tratamentos foram preparados com leite desnatado UHT, com valor de lactose de 4,69%. Segundo Tronco⁵⁵, a lactose apresenta-se no leite numa proporção de aproximadamente 4,8%. Portugal et al.⁴¹ encontrou concentração de lactose média de 4,6%, variando de 3,8 a 5,3%.

É sabido que essas variações ocorrem porque a composição do leite sofre muitas influências, como alimentação, raça e estação do ano³⁴.

Como mostra a tabela 1 para os mesmos dias de análise verifica-se que as amostras adicionadas de enzima lactase (T2, T3 e T4) diferiram estatisticamente entre si e as demais amostras.

Os teores de lactose para T2 e T3 variaram de 1,32 a 1,15% e 1,09 a 0,82% respectivamente, o tratamento T4 foi totalmente hidrolisado a partir do primeiro dia de análise.

Durante o armazenamento todos os tratamentos diminuíram suas quantidades de lactose. As reduções dos teores de lactose nos iogurtes sem adição de lactase foram de 7,68% para T1, 3,84% para T5, 8,53% para T6 e 14,7% para T7. Entre os tratamentos adicionados de lactase houve diferença estatística sendo que a hidrólise da lactose foi de 75% para T2, 82,5% para T3 e 100% para T4 (Apêndice 3, Figura 5).

Segundo a literatura o consumo de lactose durante a fermentação e armazenamento de iogurtes varia entre 10 e 30%¹⁹, fato este observado nesta pesquisa.

Estudos realizados por Silva⁵² demonstraram uma diminuição nos teores de lactose de 12 a 20% em iogurtes probióticos com prebióticos. Pereira³⁸ observou redução no teor de lactose durante as etapas de fermentação e resfriamento de iogurtes que variaram de 21 a 24%.

Longo³¹ utilizando uma concentração de 0,8g/L de enzima lactase diretamente no leite a 40°C por 4h obteve hidrólise de 88,07%. Utilizando esse leite na preparação de iogurtes encontrou 85 a 86% de hidrólise da lactose.

Barrantes et al.⁶ encontraram menores valores de lactose em iogurtes frescos (34%) do que naqueles armazenados (40%), mostrando a hidrólise da lactose durante a estocagem refrigerada.

Ferronato et al.¹⁷ avaliaram os teores de lactose em iogurtes e leites fermentados comerciais como subsídio para orientação nutricional de pacientes com intolerância à lactose e constataram que esses produtos apresentam em média 30% menos lactose que o leite. Com isso eles indicaram que iogurtes e leites fermentados podem ser tolerados por pessoas que possuem má absorção de lactose, mas não pelos intolerantes à lactose.

Segundo Manan, Karim e Kit³⁴, os sintomas da intolerância podem ser eliminados quando a lactose é reduzida em 70%, valor calculado em aproximadamente 1,23% de lactose em um consumo de 220 mL de produto lácteo.

Os valores de lactose dos iogurtes tratados previamente com enzima lactase são considerados baixos, podendo ser utilizados tanto para pessoas que possuem má absorção de lactose quanto pelos intolerantes à lactose. Os demais iogurtes apresentaram redução nos seus teores de lactose, porém essa diminuição não elimina os sintomas desagradáveis da intolerância à lactose.

Na tabela 2 (Apêndice 3) apresentam-se as contagens de *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*. Todos os tratamentos tiveram suas contagens crescentes durante o armazenamento. Entre os tratamentos adicionados de enzima lactase a amostra T4 foi a que apresentou menores contagens iniciais do microrganismo (10,77 a 20,42 log₁₀ UFC/mL).

Durante a estocagem o tratamento T7 apresentou contagens de *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* (13,40 a 21,40 log₁₀ UFC/mL). Não houve diferença significativa para os iogurtes adicionados de lactase em comparação com os demais. Os tratamentos T2, T3 e T4 apresentaram as mesmas contagens a partir do 7º dia de armazenamento.

Zacarchenco et al.⁶¹ encontraram contagens de *S. thermophilus* em leite fermentado de 9 log₁₀ UFC/mL valores estes inferiores aos encontrados na presente pesquisa.

Em estudos com nutracêuticos (ômega-3, isoflavonas e fitosteróis) e probióticos em leites fermentados Robinson et al.⁴⁴ encontraram contagens de *S. thermophilus* de 8 log₁₀ UFC/mL até o décimo dia de armazenagem.

Oliveira et al.³⁷ relataram que *Streptococcus* predominaram sobre as demais culturas em todos os produtos onde estava presente. Essa característica pode justificar o elevado crescimento dos *Streptococcus* no presente estudo.

As menores contagens de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (tabela 3), foram para o tratamento T1, 8,47 a 8,64 log₁₀ UFC/mL. Já para T6 e T7 obtiveram-se os maiores resultados encontrados (Apêndice 3). Os tratamentos adicionados de lactase não diferiram significativamente dos demais.

Houve um decréscimo nas contagens durante o período de armazenamento para todos os tratamentos. Observa-se uma queda de aproximadamente 2, 1 e 2 ciclos logarítmicos para os tratamentos T2, T5 e T7 respectivamente.

Os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de leites fermentados, Resolução nº 5, de 13 de novembro de 2000⁷, estabelece um limite mínimo para bactérias lácticas de 7 log₁₀ UFC/mL, determinando que esses microrganismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final e durante seu prazo de validade.

Sabe-se que o iogurte deve conter proporções aproximadamente iguais de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*. Arnott, Duitschaever e Bullock³ relacionam o pH e o desenvolvimento de microrganismos em seus estudos e concluíram que deve ser encontrada no final da fermentação do leite uma proporção de 1 lactobacilo para 1 streptococo (1:1), quando o valor de pH está em torno de 4,2 – 4,5.

Os resultados encontrados nesta pesquisa vão ao encontro da bibliografia citada em relação à presença mínima de bactérias lácticas nos iogurtes produzidos, observando-se que a menor contagem determinada foi de 8 log₁₀ UFC/mL. Já em relação à proporção existente entre *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* verificou-se para todos os tratamentos uma relação de 1 lactobacilo para 2 estreptococos, talvez favorecida pela temperatura de inoculação ou pelo pH que foi de no mínimo 4,24.

Moreira et al.³⁶ encontraram em iogurtes comercializados em Lavras – MG uma proporção de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* entre 1:2,3 e 1:3, diferença provavelmente ligada à temperatura de inoculação mais baixa, favorecendo os *Streptococcus* já que os mesmos são menos resistentes as temperaturas elevadas.

Rybka e Kailasapathi⁴⁵ detectaram um maior número de células viáveis de *S. thermophilus* nos iogurtes inoculados com culturas probióticas, variando de 9 – 7 log₁₀ UFC/mL durante armazenagem.

O valor de pH implica na atividade metabólica das bactérias, podendo favorecer um determinado grupo em detrimento de outro.

No iogurte as bactérias do gênero *Lactobacillus* crescem e toleram valores de pH mais baixos que o gênero *Streptococcus*⁵³.

Segundo Vinderola *et al.*⁵⁸ os *S. thermophilus* apresentam-se em maior quantidade que os *L. bulgaricus* em iogurtes contendo bactérias probióticas.

Segundo Dave e Shah¹⁴, a presença em menor quantidade de *L. bulgaricus* no produto final favorece a diminuição da pós-acidificação durante a vida-de-prateleira, importante para garantir ao produto final sabor suave e evitar efeitos adversos do pH baixo sobre as bactérias probióticas.

A tabela 4 apresenta os valores das contagens de *Bifidobacterium sp.* durante a estocagem (Apêndice 3). O tratamento T1 chegou a um aumento de aproximadamente dois ciclos logarítmicos.

O tratamento T7 foi a única que manteve-se com valores de 10^8 UFC/mL pelo período de armazenamento. O tratamento T6 apresentou aumento de aproximadamente um ciclo logarítmico até o 28º dia, (8 a $9 \log_{10}$ UFC/mL).

Os tratamentos T2 e T3 apresentaram as mesmas contagens durante a estocagem. Os outros tratamentos variaram suas contagens de 7 a $9 \log_{10}$ UFC/mL durante o período de armazenagem.

Pode-se verificar a influência da adição de enzima lactase no tratamento T4, pois foi o que apresentou queda no número de microrganismos ao fim da vida-de-prateleira.

Os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de leites fermentados, Resolução nº 5, de 13 de novembro de 2000⁷ preconizam um valor mínimo de *Bifidobacterium* de 10^6 UFC/mL, assim percebe-se que todos os tratamentos estão de acordo com a legislação.

Martin e Chou³⁵ observaram que a viabilidade de *Bifidobacterium spp.* depende de suas diferentes espécies e linhagens. Similarmente Dave e Shah¹⁴ reportaram que a espécie de bifidobactéria usada na produção de iogurtes afeta sua viabilidade. Estudos de Shah *et al.*⁴⁸ mostram que o pH final do iogurte afeta a viabilidade de *Bifidobacterium*.

Segundo Vinderola *et al.*⁵⁸ iogurtes armazenados a 5°C com valores de pH em torno de 4,5 seriam arriscados para a viabilidade de microrganismos probióticos. De acordo com Shah e Lankaputhra⁴⁹ bifidobactérias são menos resistentes a baixos valores de pH, sendo seu crescimento retardado abaixo de 5,0.

Segundo Adams e Moss¹ a combinação de baixo pH e acréscimo da acidez poderiam resultar em aumento de ácido não dissociado, o qual é mais danoso aos microrganismos e é claramente um fator no rápido decréscimo da população de bifidobactérias durante a vida-de-prateleira do produto.

Em estudos de Awaisheh *et al.*⁵ com leites fermentados adicionados de ômega-3 e *Bifidobacterium infantis* observou-se um número de células viáveis variando de 10^8 a 10^9 UFC/mL, indo ao encontro dos resultados encontrados nesse estudo.

Silva⁵² em estudo com iogurte probiótico adicionado de diferentes concentrações de culturas lácteas encontrou contagens que variaram de 6 e 7 \log_{10} UFC/mL para *Bifidobacterium sp.*

Rybka e Kailasapathy⁴⁵ e Dave e Shah¹⁴ observaram contagens de *Bifidobacterium sp.* diminuindo em dois ciclos logarítmicos (7 a 5 \log_{10} UFC/mL) em iogurtes.

Observa-se que a redução do pH e aumento da acidez no presente estudo não afetaram a viabilidade das bifidobactérias, inclusive notou-se um pequeno crescimento de células viáveis, exceto para o tratamento T4.

No caso de T4 não foi evidenciada a relação entre maior valor de pH e melhor viabilidade celular como descrito anteriormente, já que este tratamento apresentou o valor de pH mais elevado (4,44).

Na tabela 5 verifica-se que o tratamento T7 manteve o número de microrganismos em 11 \log_{10} UFC/mL pelo período de armazenamento (Apêndice 3). Apenas T4 (0,80% de lactase) apresentou contagens crescentes até o fim da estocagem 9 a 11 \log_{10} UFC/mL.

Para os tratamentos T2 e T3 (0,2 e 0,5% de lactase) observou-se um comportamento semelhante com contagens de células viáveis praticamente iguais, variando de 9 a 11 \log_{10} UFC/mL. Os tratamentos T5 e T6 apresentaram um breve crescimento seguido de um decréscimo no número de microrganismos, havendo diminuição de 2 ciclos logarítmicos para T5 e 1 ciclo logarítmico para T6 durante a vida-de-prateleira.

Segundo Zacarchenco *et al.*⁶¹, as contagens de células viáveis de *L. acidophilus* em leites fermentados por *Streptococcus thermophilus* e *Bifidobacterium longum* apresentaram uma redução de 8 \log_{10} UFC/mL para 10^7 UFC/mL após 21 dias de estocagem.

Oliveira *et al.*³⁷ relataram a redução de dois ciclos logarítmicos nas contagens de *L. acidophilus* após 28 dias de estocagem a 4°C na presença de *S. thermophilus*.

Já Bozanic, Rogeli e Tratnik⁹ observaram contagens de *L. acidophilus* superiores a 6 \log_{10} UFC/mL em leites fermentados.

Segundo Vinderola *et al.*⁵⁷ *L. acidophilus* é mais sensível que *Bifidobacterium* nos meios ácidos estudados (iogurtes e leites fermentados com ácido láctico) na faixa de pH de 3,5 a 4,5.

Em estudo realizado por Dave e Shah¹⁴ com iogurte probiótico suplementado com cisteína, proteína concentrada, caseína e triptona verificou-se um aumento de dois ciclos logarítmicos (6 a 8 log₁₀ UFC/mL) em todos os tratamentos testados.

Robinson *et al.*⁴⁴ encontraram contagens de *L. gasseri* de 8 log₁₀ UFC/mL em iogurte adicionado de ômega-3, o qual se manteve até 15 dias de armazenamento.

Nesse estudo constatou-se que o crescimento de *Lactobacillus acidophilus* foi maior que o de *Bifidobacterium sp.* corroborando com os resultados encontrados por Dave e Shah¹⁴. Tanto o pH quanto a enzima lactase não afetaram o crescimento do *L. acidophilus* neste estudo.

CONCLUSÃO

Pode-se inferir com o presente estudo que a enzima lactase utilizada nos iogurtes com 0,2%, 0,5% e 0,8% de lactase reduziu o teor de lactose dos tratamentos. As reduções foram maiores que 70%, portanto pode-se dizer que os iogurtes formulados com a enzima lactase podem ser consumidos por pessoas intolerantes à lactose.

As contagens de *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* foram superiores às encontradas na bibliografia. Houve a relação de 2:1 na proporção *S. thermophilus/ L. bulgaricus*, o que pode favorecer a diminuição da pós-acidificação durante a vida de prateleira.

A queda de pH e o aumento da acidez não reduziram as contagens de lactobacilos e das bifidobactérias.

O número de células viáveis do *L. acidophilus* foi maior que a das *Bifidobacterium*, mantendo-se em número superior até o fim da vida-de-prateleira. Tanto o número de células viáveis dos microrganismos probióticos como das bactérias lácticas ficaram dentro do preconizado pela legislação vigente.

Não foi possível inferir a relação entre a lactose hidrolisada e o maior crescimento microbiano nos iogurtes estudados. Também a relação com a adição de ômega-3 não foi visualizada entre os tratamentos

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Senhor Eduardo Favarin pela doação da farinha de arroz e a Empresa Cisbraoleos pela doação do óleo de linhaça utilizado nesta pesquisa.

BECKER, L.V.; ALVES, L.L.; MATTANNA, P.; RICHARDS, N.S.P.S. Viability study of lactic and bifid bacteria in yogurt with low lactose with flaxseed oil.

ABSTRACT

Over 50% of the world population undergoes the incapacity of digesting lactose. The associated symptoms are usually characterized by abdominal aches and discomfort followed by intestinal disorders such as colic and diarrhea. Several evidences have demonstrated that the intake of adequate quantities of the adequate strains of lactic bacteria (including non-probiotic lactic bacteria such as *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*) are able to relieve the lactosis intolerance symptoms. This research aimed at elaborate low lactose yogurts, added with rice flour and flaxseed oil and study the viability of the probiotic microorganisms in the developed products. The lower pH value was 4,26 and the higher acidity value was 0,94 of lactic acid.

The lactose was hydrolyzed in more than 70% for the treatments with adding of the lactase enzyme. The microorganisms counts were in the range allowed by Brazilian legislation until the end of the shelf life.

KEYWORDS: lactic and bifid bacteria, yogurt, lactose, flaxseed oil

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. **Food microbiology**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2000. 494p.
2. AGGETT, P.J.; AGOSTINI, C.; AXELSSON, I. et al. Nondigestible carbohydrates in the diets of infants and young children: a commentary by the ESPGHAN Committee on nutrition. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.** 2003; 36:329-337.
3. ARNOTT, D.R.; DUITSCHAEVER, C.L.; BULLOCK, D.H. Microbiological evaluation of yogurt produced commercially in Ontário. **Journal Milk, Food Technology**. Ames. V. 37, n. 1, p. 11-13, Aug, 1974.
4. AURICCHIO, S.; TRONCONE, R. Genetically determined disaccharidase deficiencies. In: Walker, W.A.; Durie, P.; Hamilton, J.R.; Walker-smith, J.A.; Watkins, J.B., editors. **Pediatric Gastrointestinal Disease**. Ontário: BC Decker Inc; 2000. p. 677-700.
5. AWAISHEH, S.S.; HADDADIN, M.S.Y.; ROBINSON, R.K. Incorporation of selected nutraceuticals and probiotic bacteria into a fermented milk. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1184-1190. 2004.
6. BARRANTES, E.; TAMIME, A.Y.; SWORD, A.M.; MUIR, D.D.; KALÁB, M. The manufacture of set-type natural yoghurt containing different oils – 1. compositional quality, microbiological evaluation and sensory properties. **Int. Dairy Journal**, v. 6, p. 811-826, 1996.
7. BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. DEPARTAMENTO DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL. **Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados**, Resolução nº 5 de 13 de novembro de 2000. Disponível em: www.agricultura.gov.br/sislegis. Acesso em: 26/12/2008.
8. BRASIL. Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Métodos Analíticos Oficiais, Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos**. Aprovado pela Instrução Normativa nº68 de 12 de dezembro de 2006. Brasília-DF, 2006.
9. BOZANIC, R.; ROGELI, I.; TRATNIK, L.J. Fermented acidophilus goat's milk supplemented with inulin: comparison with cow's milk. **Milchwissenschaft**. V. 56, n. 11, p. 618-622, 2001.

10. CALDER, P.C.; KEW, S. The immune system: a target for functional foods? **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.88, supl.1, p.S165-S176, 2002.
11. CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Selective detection, enumeration, and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 1-27, 1998.
12. CHRISTIAN HANSEN. **Method for counting probiotic bacteria.** *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* in milk products made with nutritive cultures. 1999. 5p. [Procedimento Analítico].
13. CRITTENDEN, R.G.; Prebiotics. In: TANNOCK, G.W., ed. **Probiotics: a critical review**. Norfolk: Horizon Scientific Press, 1999. p.141-156.
14. DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Effect of cysteine on the viability of yogurt and probiotic bacteria in yogurt made with commercial starter cultures. **International Dairy Journal**. V. 7, n. 8, p. 537-545, 1997.
15. DUARTE, A.C. Nutrição Imunomoduladora. In: **Semiologia Imunológica Nutricional**. Rio de Janeiro: Axcel Books, p.138-144, 2003.
16. FERREIRA, C.L.L.F.; **Produtos lácteos fermentados (Aspectos Bioquímicos e Tecnológicos)**. 1. ed. Viçosa: Imprensa Universitária, 1997. p. 4-6.
17. FERRONATO, D.D.Z.; FARINÃ, L.O.; JORGE, A.S.; COSTA, M.C.D. Avaliação dos teores de lactose em iogurtes e leites fermentados produzidos no Paraná como subsídio para orientação nutricional para pacientes com intolerância à lactose. In: XXI CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 2004, Juiz de Fora. Anais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 50, n. 339, p. 156-159, jul/ago. 2004.
18. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: www.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf. Acesso em: 30 de set. de 2008.
19. GALVÃO, L.C.; FERNANDES, M.I.M.; SAWAMURA, R. Conteúdo de lactose e atividade de β -Galactosidase em iogurtes, queijos e coalhadas produzidas no Brasil. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 32, n. 1, p. 8-14, 1995.
20. GIBSON, G.R.; FULLER, R. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, p.391S-394S, 2000.

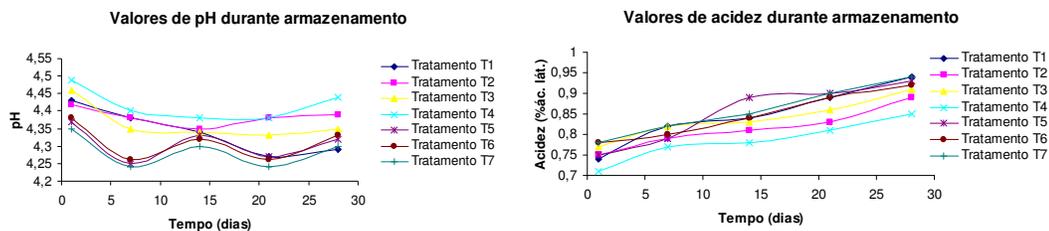
21. GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. **Gut flora in health and disease**. Lancet, London, v.360, p.521-518, 2003.
22. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Yogurt: enumeration of characteristic microorganisms**. IDF/ISO Standard, 1997, 5p.
23. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus***. Bulletin of the IDF, n. 306, p. 23-33, 1999.
24. JONES, P.J.H., KUBOW, S. Lipídios esteróis e seus metabólitos. In: **Tratado de Nutrição Moderna na saúde e na doença**. 9^a ed. São Paulo, 1: 1243-48, 2002.
25. KAUR,I.P.;CHOPRA,K.; SAINI,A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v.15, p.1-9, 2002.
26. KLAENHAMMER, T.R. Probiotics and prebiotics. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. 2.ed. Washington: ASM, 2001.p.797-811.
27. KOCIÁN, J. Lactose Intolerance – Minireview. **International Journal Biochemistry**, v.20, n.1, p.1-5, 1988.
28. KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 101, p. 229-236, 2001.
29. LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, N.P.; BRITZ, M.L. Survival of bifidobacteria during refrigerated storage in the presence of acid and hydrogen peroxide. **Milchwissenschaft**, v. 51, p. 65-70, 1996.
30. LEE, K.W.; LIP, G.Y.H. The role of omega-3 fatty acid in the secondary prevention of cardiovascular disease. **Q.J. Med.**, v.96, p.465-480, 2003.
31. LONGO, G. **Influência da adição de lactase na produção de iogurtes**. 2006. 109p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR.
32. LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 1-2, p. 1-17, 2002.
33. MALTA, H.L.; LEITE, M. de O.; ANDRADE, N.S. de.; CERQUEIRA, M.R. de.; FONSECA, L.M. da.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Verificação da qualidade físico-química e microbiológica de alguns iogurtes vendidos na região de Viçosa, MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Anais do XVIII Congresso Nacional de Laticínios, n. 321, v. 56, p. 152-158, jul/ago. 2001.

34. MANAN, D.M.A.; KARIM, A.A.; KIT, W.K. Lactose content of modified enzyme-treated 'dadih'. **Food Chemistry**, n. 65, p. 430-443, 1999.
35. MARTIN, J.H.; CHOU, K.M. Selection of Bifidobacterium spp. for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods. Tolerance to pH of yoghurt. **Cultured Dairy Products Journal**, v. 27, n. 21, p. 23-26, 1992.
36. MOREIRA, S.R.; SCHWAN, R.S.; CARVALHO, E.P.; FERREIRA, C. Análise microbiológica de iogurtes comercializados em Lavras – MG. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, vol. 19, nº 1, p. 147-152, jan 1999.
37. OLIVEIRA, M.N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; TISSIER, J.P.; CORRIEU, G. Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures. **Journal of Science**. V. 67. n. 6. p. 2336-2341. 2002.
38. PEREIRA, M.A.G. **Efeito do teor de lactose e do tipo de cultura na acidificação e pós acidificação de iogurtes**. 2002. 86p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP.
39. PRASAD, K. Dietary flax seed in prevention of hipercholesterolemic atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v.132, p.69-76, 1997.
40. PRASAD, K.; MANTHA, S.V.; MUIR, A.D.; WESTCOTT, N.D. Reduction of hipercholesterolemic atherosclerosis by CDC-flaxseed with very low alpha-linolenic acid. **Atherosclerosis**, v.136, p.367-375, 1998.
41. PORTUGAL, J.A.B; PAIVA e BRITO, M.A.V de.; DRUMOND e CASTRO, M.C. A qualidade do leite e os resíduos de antibióticos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora – MG, n.319, v.56, p. 9-14. Mar/Abr 2001.
42. PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMAN-CALDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.13, p. 3-11, 2002.
43. ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Dig. Liver Dis.**, Rome, v.34, suppl.2, p.S105-S110, 2002.
44. ROBINSON, R.K.; AWAISHEH, S.S.; HADDADIN, M.S.Y. Incorporation os selected nutraceuticals and probiotic bacteria into a fermented milk. **International Dairy Journal**. V. 15, p. 1184-1190, 2005.

45. RYBKA, S.; KAILASAPATHI, K. The survival of culture bactéria in fresh and freeze-dried AB cultures. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 50, n. 1, p. 51-57, 1995.
46. SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bactéria. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.8, p341-347, 1998.
47. SCHERNER, M. **Estudos da influência de diferentes concentrações de extrato seco total sobre a fermentação do iogurte**. Monografia. 2004. 21-25.
48. SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V. BRITZ, M.; KYLE, W.S.A. Survival os *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. **International Dairy Journal**, v. 5, p. 515-521, 1995.
49. SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium ssp.* in yogurt. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 349-356, 1997.
50. SHAHIDI, F.; FINLEY, J.W. **Omega-3 fatty acids: chemistry, nutrition, and health effects**, 1.ed., American Chemical Society, Washington, 2001.
51. **SPSS for Windows Release 8.00**, SPSS Inc, 22 dez. 1997.
52. SILVA, S.V. da.; **Desenvolvimento de iogurte probiótico com prebiótico**. 2007. 107p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS.
53. TAMIME, A.Y.; ROBINSON, R.K. **Yogurt: ciência y tecnologia**. Zaragoza: Acribia, 1991. 368p.
54. TÉO, C.R.P. A intolerância à lactose: uma breve revisão para o cuidado nutricional. **Arq. Cienc. Saúde Unipar**, v. 6, n. 3, p. 135-140, set./dez. 2002.
55. TRONCO, V.M. **Manual para a inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2003. 192p.
56. VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. editors. **Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods**. 3 ed. Washington: Edwards Brothers, Ann Arbor, 1992.
57. VINDEROLA C.G.; REINHEIMER, J.A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yogurt bactéria. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 8, p. 497-505. 1999.
58. VINDEROLA, C.G.; BAILO, N.; REINHEIMER, J.A. Survival of probiotic microflora in Argentinean yogurts during refrigerated storage. **Food Research International**, v. 33, p. 97-102, 2000.

59. VISEITANER, J.V.; GOMES, S.T.M.; HAYASHI, C.; SANTOS-JUNIOR, O.O.; SILVA, A.B.M.; JUSTI, K.C.; SOUZA, N.E.; MATSUSHITA, M. Efeito do tempo de fornecimento de ração suplementada com óleo de linhaça sobre a composição físico-química e de ácidos graxos em cabeças de tilápias do Nilo. **Ciênc. Technol. Aliment.**, Campinas, 23(3), 478-484, 2003.
60. WAITZBERG, D.L., BORGES, V.C. Gorduras. In: **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 3^a ed. São Paulo: Atheneu, p.59-64, 2002.
61. ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial e de pós-acidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 24, p. 674-679, out/dez. 2004.

Gráfico 1 - Valores de pH e acidez (expressa em ácido láctico) dos tratamentos durante os 28 dias de armazenamento.



T1 iogurte com adição de 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T2 Iogurte com adição de 0,2% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T3 iogurte com adição de 0,5% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T4 iogurte com adição de 0,8% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T5 iogurte com adição 0,5% de Óleo de Linhaça;

T6 iogurte com adição de 1,5% de Farinha de Arroz;

T7 iogurte controle, sem adições.

Tabela 1 – Valores de lactose dos iogurtes probióticos durante armazenamento de 28 dias*

Tratamentos	1º dia	7º dia	14º dia	21º dia	28º dia
T1	4,52 ^{Ba}	4,51 ^{Ba}	4,43 ^{Ab}	4,51 ^{Ba}	4,33 ^{Bc}
T2	1,32 ^{Ca}	1,30 ^{Ca}	1,23 ^{Bb}	1,15 ^{Dc}	1,15 ^{Ec}
T3	1,09 ^{Da}	0,97 ^{Db}	0,95 ^{Cb}	0,90 ^{Ec}	0,82 ^{Fd}
T4	ND ^{Ea}	ND ^{Ea}	ND ^{Da}	ND ^{Fa}	ND ^{Ga}
T5	4,62 ^{Aa}	4,56 ^{Ab}	4,55 ^{Ab}	4,55 ^{Ab}	4,51 ^{Ac}
T6	4,60 ^{Aa}	4,55 ^{Ab}	4,54 ^{Ab}	4,53 ^{ABb}	4,29 ^{Cc}
T7	4,53 ^{Ba}	4,50 ^{Bb}	4,45 ^{Ac}	4,25 ^{Cd}	4,00 ^{De}

* Valores de lactose expressos em porcentagem. ND – valor não determinado.

Valores com letras iguais (minúsculas) na mesma linha não diferiram estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância.

Valores com letras iguais (maiúsculas) na mesma coluna não diferiram estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância.

T1 iogurte com adição de 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T2 Iogurte com adição de 0,2% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T3 iogurte com adição de 0,5% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T4 iogurte com adição de 0,8% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T5 iogurte com adição 0,5% de Óleo de Linhaça;

T6 iogurte com adição de 1,5% de Farinha de Arroz;

T7 iogurte controle, sem adições.

Tabela 2 – Contagens de *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* durante armazenamento de 28 dias dos iogurtes probióticos*

Tratamentos	1º dia	7º dia	14º dia	21º dia	28º dia
T1	12,94	14,22	19,40	20,89	ND
T2	12,03	17,24	19,40	20,69	ND
T3	13,40	17,27	19,65	20,75	ND
T4	10,77	17,16	19,23	20,42	ND
T5	13,40	17,36	19,65	21,04	ND
T6	13,40	17,40	18,94	21,36	ND
T7	13,40	17,40	19,40	21,40	ND

*Valores em \log_{10} UFC/mL.

ND – valor não determinado.

T1 iogurte com adição de 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T2 Iogurte com adição de 0,2% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T3 iogurte com adição de 0,5% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T4 iogurte com adição de 0,8% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T5 iogurte com adição 0,5% de Óleo de Linhaça;

T6 iogurte com adição de 1,5% de Farinha de Arroz;

T7 iogurte controle, sem adições.

Tabela 3 – Contagens de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* durante armazenamento de 28 dias dos iogurtes probióticos*

Tratamentos	1ºdia	7ºdia	14 ºdia	21ºdia	28ºdia
T1	8,47	8,61	9,63	9,60	8,64
T2	10,65	9,46	10,69	10,64	8,63
T3	9,40	11,59	10,44	10,57	9,52
T4	8,85	10,47	10,57	8,57	8,05
T5	10,99	12,03	9,77	9,45	9,59
T6	10,72	11,93	10,30	10,41	10,03
T7	11,41	12,02	9,96	10,85	8,97

*Valores em \log_{10} UFC/mL

T1 iogurte com adição de 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T2 Iogurte com adição de 0,2%de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T3 iogurte com adição de 0,5% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T4 iogurte com adição de 0,8% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T5 iogurte com adição 0,5% de Óleo de Linhaça;

T6 iogurte com adição de 1,5% de Farinha de Arroz;

T7 iogurte controle, sem adições.

Tabela 4 – Contagens de *Bifidobacterium sp.* durante armazenamento de 28 dias dos iogurtes probióticos*

Tratamentos	1ºdia	7ºdia	14ºdia	21ºdia	28ºdia
T1	ND	6,54	7,70	7,65	8,93
T2	ND	8,47	7,50	8,69	8,66
T3	8,72	8,58	7,82	8,68	8,79
T4	8,00	8,12	7,57	7,50	7,75
T5	ND	8,47	9,66	8,91	8,78
T6	ND	8,54	8,89	8,89	9,23
T7	8,15	8,76	8,66	8,97	8,96

*Valores em \log_{10} UFC/mL

ND – valor não determinado

T1 iogurte com adição de 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T2 Iogurte com adição de 0,2% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T3 iogurte com adição de 0,5% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T4 iogurte com adição de 0,8% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T5 iogurte com adição 0,5% de Óleo de Linhaça;

T6 iogurte com adição de 1,5% de Farinha de Arroz;

T7 iogurte controle, sem adições.

Tabela 5 – Contagens de *Lactobacillus acidophilus* durante armazenamento de 28 dias dos iogurtes probióticos*

Tratamentos	1ºdia	7ºdia	14ºdia	21ºdia	28º dia
T1	10,58	10,23	10,38	11,70	ND
T2	9,90	11,37	10,45	11,71	ND
T3	9,30	11,64	10,31	11,72	ND
T4	9,32	10,52	10,51	11,63	ND
T5	9,30	12,00	11,52	9,50	ND
T6	10,73	11,94	10,54	9,46	ND
T7	11,40	11,85	11,63	11,69	ND

*Valores em \log_{10} UFC/mL

ND – valor não determinado

T1 iogurte com adição de 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T2 Iogurte com adição de 0,2%de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T3 iogurte com adição de 0,5% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T4 iogurte com adição de 0,8% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T5 iogurte com adição 0,5% de Óleo de Linhaça;

T6 iogurte com adição de 1,5% de Farinha de Arroz;

T7 iogurte controle, sem adições.

4 ARTIGO 2

Submetido a Revista Alimentos e Nutrição
(Configuração conforme normas da revista – Anexo 1)

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE IOGURTE PROBIÓTICO COM TEOR REDUZIDO DE LACTOSE

Larissa Vargas BECKER**

RESUMO: Sabe-se que no Brasil 58 milhões de pessoas apresentam dificuldades em digerir a lactose pela deficiência da enzima lactase no intestino. As reações a esses fatores são sintomas de desconforto pela produção excessiva de gases dentro do intestino e distúrbios intestinais como cólicas e diarreias. A lactose ingerida no iogurte é mais efetivamente digerida que a lactose do leite. Este fato deve-se à hidrólise intestinal, pela ação da lactase microbiana dos organismos presentes no iogurte, durante a passagem no trato gastrointestinal. A β -galactosidase hidrolisa a lactose em dois monossacarídeos, glicose e galactose, mais facilmente absorvidos pelo intestino. O objetivo deste trabalho foi o de elaborar e caracterizar iogurtes com culturas probióticas, baixo teor de lactose e adicionados de óleo de linhaça. Os iogurtes T6 e T7 foram classificados como desnatados e os demais como semi desnatados. A relação entre pH e acidez foi inversamente proporcional, ou seja, à medida que o pH decresceu a acidez aumentou em todos os tratamentos. A pós-acidificação foi mais evidenciada no iogurte T7.

**Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, s/n, CEP 97105-900 – Santa Maria – RS – Brasil. Email para correspondência: laribecker@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: *iogurte probiótico, lactose, físico-química.*

INTRODUÇÃO

O iogurte é reconhecidamente um alimento de alto valor nutritivo e adequado a qualquer dieta.

É obtido da coagulação do leite pela ação de dois microrganismos, *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, e fornece uma melhor assimilação, pelo organismo, de certos componentes, principalmente a lactose e proteínas⁵. De maneira geral o aumento da digestibilidade das proteínas e gorduras, a redução do conteúdo de lactose, a absorção acrescida de cálcio e ferro, o equilíbrio de conteúdo em várias vitaminas e a presença de alguns metabólitos secundários, acoplados à presença de células probióticas viáveis, fazem dos leites fermentados um dos alimentos naturais mais valiosos recomendados para o consumo humano³³.

Os probióticos enquadram-se no conceito de alimentos funcionais, que é definido como, o produto (alimento) que além de fornecer a nutrição básica, promove a saúde. Tais alimentos possuem potencial para promover a saúde através de mecanismos não previstos na nutrição convencional, devendo ser salientado que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura de doenças³⁵.

A alteração do metabolismo microbiano pelos probióticos ocorre por meio do aumento ou diminuição da atividade enzimática. Uma função vital das bactérias lácticas na microbiota intestinal é produzir a enzima β -D-Galactosidase, mais conhecida como lactase, auxiliando a quebra da lactose no intestino. Puupponen-Pimiä *et al.*³² dizem que o emprego de culturas probióticas exclui microrganismos potencialmente patogênicos e reforça os mecanismos naturais de defesa do organismo. Os probióticos auxiliam a recompor a microbiota intestinal, através da adesão e colonização na mucosa intestinal, sendo que esta ação impede a adesão e subsequente produção de toxinas ou invasão das células epiteliais por bactérias patogênicas.

A lactose ingerida no iogurte é mais efetivamente digerida que a lactose do leite. Este fato deve-se à hidrólise intestinal, pela ação da lactase microbiana dos organismos presentes no iogurte, durante a passagem no trato gastrointestinal²³. A β -galactosidase hidrolisa a lactose em dois monossacarídeos, glicose e galactose, mais facilmente absorvidos pelo intestino⁴⁰. Tal hidrólise facilita a absorção dos açúcares por pessoas intolerantes à lactose.

Intolerância a lactose é um termo usado para descrever a incapacidade de digerir a lactose devido à deficiência do sistema digestivo^{21,26,42}. A intolerância a lactose é uma desordem genética muito comum. Mais de 50% da população mundial apresenta condições de deficiência de lactase, sendo esta a desordem genética mais comum².

No Brasil, 58 milhões de pessoas apresentam alguma dificuldade em digerir a lactose pela deficiência da enzima lactase no intestino⁴. Nesses casos a lactose passa pelo cólon sem ser hidrolisada e é fermentada pelas bactérias aí presentes, produzindo ácido láctico, ácido butírico e ácidos voláteis que reduzem o pH das fezes para valores inferiores a 6,0.

As reações a esses fatores são sintomas de desconforto pela produção excessiva de gases dentro do intestino e desordens intestinais como cólicas e diarreias¹.

A redução ou eliminação do leite e seus derivados na alimentação de crianças intolerantes a lactose pode comprometer a absorção de cálcio, proteínas e riboflavina²⁷.

Produtos fermentados têm sido recomendados para pessoas com intolerância a lactose. Este fato é atribuído à alta atividade da lactase presente nos microrganismos usados na produção do iogurte (normalmente *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*) comparados com outras bactérias produtoras de ácido láctico^{37,41}.

Juntamente aos benefícios dos probióticos a utilização do óleo de linhaça é de grande valia no que diz respeito à promoção da saúde.

A linhaça é considerada um alimento funcional por ser a mais rica fonte de ácidos graxos ômega-3³⁰, contribuindo para a sensação de saciedade e palatabilidade.

O óleo de linhaça contém grandes quantidades de ácido α -linolênico (51 a 55%) e ácido linoléico (15 e 18%), ácidos graxos da família ômega-3 e ômega-6 respectivamente^{31,46}.

Os ácidos graxos poliinsaturados, como das famílias ômega-3 e ômega-6, são chamados de essenciais, pois não podem ser produzidos endogenamente pelos seres humanos sendo oriundos apenas da dieta^{15,20,47}.

Alguns estudos sugerem que o consumo de ácidos graxos poliinsaturados reduz as taxas de colesterol no sangue, aumentam as lipoproteínas de alta densidade (HDL), reduz o teor de triglicérides, previne o câncer de próstata bem como reduz a ocorrência de arritmias²².

Nesse contexto, torna-se pertinente o desenvolvimento de um iogurte produzido com teor de lactose reduzido adicionado de ingredientes funcionais, proporcionando a melhoria na qualidade de vida de pessoas com necessidades específicas. Isto contribui também com a indústria laticinista para o desenvolvimento de novos produtos para um mercado ainda pouco explorado.

O presente trabalho propôs produzir um iogurte probiótico com teor reduzido de lactose através do uso da enzima β -D-Galactosidase, adicionado de óleo de linhaça, e verificar suas características físico-químicas, tais como acidez, pH, umidade, cinzas, proteína, gordura, extrato seco total, extrato seco desengordurado e lactose.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os produtos, análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas nos laboratórios do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos (DTCA) do Centro de Ciências Rurais (CCR) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Os iogurtes foram analisados no 1º, 7º, 14º, 21º e 28º dia de estocagem, quanto ao valor de pH, acidez expressa em ácido láctico, teor de lactose, proteína, gordura, umidade, cinzas, extrato seco total e extrato seco desengordurado. As análises físico-químicas foram realizadas em triplicata⁹.

Materiais

Para o preparo dos iogurtes utilizou-se as seguintes matérias-primas:

- Leite UHT desnatado;
- Açúcar refinado especial;
- Óleo de Linhaça Cisbraoleos (óleo bruto extraído por prensagem a frio);
- Farinha de Arroz Favarin e Cia Ltda (F100 e F300), como substituto do leite em pó (Apêndice 4).

A enzima para a hidrólise da lactose utilizada foi:

- Enzima β -Galactosidase Lactozym® 3000L HPG (Novozymes).

Culturas lácticas utilizadas:

- Cultura tradicional: fermento láctico Rich®, contendo culturas superconcentradas de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (Chr. Hansen Ind. e Com. Ltda).
- Cultura probiótica: fermento láctico probiótico Bio Rich®, contendo culturas superconcentradas de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus thermophilus* (Chr. Hansen Ind. e Com. Ltda.).

Tratamentos

Foram realizados os seguintes tratamentos:

- T1 iogurte com adição de 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

- T2 Iogurte com adição de 0,2% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;
- T3 Iogurte com adição de 0,5% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;
- T4 Iogurte com adição de 0,8% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;
- T5 Iogurte com adição 0,5% de Óleo de Linhaça;
- T6 Iogurte com adição de 1,5% de Farinha de Arroz;
- T7 Iogurte controle, sem adições.

Preparação do leite adicionado de enzima lactase

Foram utilizados para cada tratamento seis litros de leite UHT desnatado dividido em alíquotas de dois litros, ou seja, três repetições para cada tratamento, em frascos separados autoclavados com 2 litros de capacidade cada um. A seguir, acrescentaram-se quantidades diferentes de enzima lactase nos leites dos tratamentos T2, T3 e T4. Cada frasco foi assim denominado e rotulado: T2 (0,2% de enzima lactase), T3 (0,5% de enzima lactase), T4 (0,8% de enzima lactase).

Todos os frascos foram então levados para temperatura controlada, 8°C por 12 horas, para sofrerem hidrólise da lactose. Após esse período o leite passou pelo processo de aquecimento (92°C por 3 minutos) para inativação da enzima lactase.

Preparação da Cultura

As culturas utilizadas foram: Rich pacote com 1 grama contendo *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* e Bio Rich pacote com 1 grama contendo *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus thermophilus*.

Os dois pacotes foram diluídos e homogeneizados asépticamente em leite previamente esterilizado. A porcentagem de cultura utilizada foi de 1% para cada litro de leite para todos os tratamentos.

Preparação do iogurte

Foram preparados 21 frascos com dois litros de leite UHT desnatado cada um, para a preparação dos iogurtes (três para cada tratamento), cada frasco foi rotulado com um dos sete tratamentos (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7).

Os tratamentos T2, T3 e T4 após a hidrólise e a inativação da enzima lactase seguiram o mesmo processo dos demais tratamentos.

Todos os frascos foram adicionados de: 8% de Açúcar Refinado e 0,1% de sorbato de potássio para cada litro de leite.

Aos frascos T1, T2, T3, T4 e T6 foram adicionados 1,5% de farinha de arroz para cada litro de leite. Os tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5 receberam adição de 0,5% de óleo de linhaça para cada litro de leite.

Todos os tratamentos sofreram pasteurização 92°C por 3 min., sendo que os que continham óleo de linhaça foram pasteurizados antes da sua adição. Seguiram então para resfriamento até 41°C para posterior fermentação.

Houve então a inoculação asséptica de 1% da cultura láctica para cada litro de leite preparada previamente.

Fermentação do Iogurte

Os tratamentos foram homogeneizados e fermentados em banho termostático à 41°C. Durante o período de incubação foram feitas verificações de pH e acidez dos iogurtes a cada 30 minutos a partir da terceira hora de fermentação até que os mesmos atingissem pH de 4,6. Foram então resfriados e armazenados à temperatura constante de 8°C.

Análises Físico-Químicas dos Iogurtes

Realizou-se a seguinte caracterização físico-química dos iogurtes⁹.

- Valor de pH em pHmetro digital Micronal Modelo 320, com eletrodo de vidro combinado;
- Acidez, expressa em ácido láctico;
- Teor de proteínas: método de Micro-Kjeldahl;
- Teor de gordura: determinada no aparelho Milko-Tester MK III F 3140, Foss Electric;

- Teor de umidade: método de secagem em estufa à 105°C ;
- Teor de cinzas: incineração em mufla à 550°C;
- Extrato seco total (EST): método de secagem em estufa à 105°C;
- Extrato seco desengordurado (ESD): calculado por diferença.
- Determinação da lactose: foi determinada a glicose para então fazer-se a estequiometria da reação, considerando que para cada molécula de lactose degradada são formadas uma molécula de glicose e uma molécula de galactose.
- Utilizou-se Kit Glicose Monoreagente K082 Bioclin, a leitura foi determinada por meio de espectrofotômetro modelo 600, marca FEMTO. A leitura da absorbância foi a 505 nm, e as amostras foram colocadas em banho-maria a 37°C por 15 minutos.

Análise Estatística

Os dados de lactose foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si através do teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os resultados foram analisados através do programa Statistic 7.0, utilizando o delineamento de blocos inteiramente casualizados³⁹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados dos valores médios dos teores de umidade, cinzas, extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), proteína e gordura dos iogurtes preparados.

A legislação brasileira não faz referência aos teores de lactose, pH, umidade, cinzas, extrato seco total e extrato seco desengordurado, apresentando somente os valores de gordura (g/100g), proteína (g/100g) e acidez (g de ácido láctico/100g) para o produto iogurte.

Não observou-se diferença estatística nos teores de umidade nos tratamentos estudados ($p > 0,05$), apesar de apresentarem diferentes formulações.

Em relação aos valores de cinzas encontrados nota-se que T4 apresentou o maior valor, 0,74%, enquanto que o tratamento T6 obteve o menor percentual, 0,64%.

Observou-se que T1, T2, T4 e T5 não diferiram estatisticamente entre si. Silva³⁸ em estudo com iogurte probiótico acrescido de prebiótico encontrou valores médios de umidade e cinzas de 78% e 0,79% respectivamente, estando estes valores semelhantes ao desta pesquisa.

O extrato seco total variou de 15,72 a 13,31% para os tratamentos T3 e T5 respectivamente. Nota-se que apenas T1 e T2 não tiveram diferença estatística entre si, os demais tratamentos diferiram estatisticamente.

Segundo Fernandes¹⁶ estudando iogurtes com leite contendo diferentes níveis de células somáticas os teores de EST encontrados variaram em torno de 13%. Wolfschoon-Pombo, Granzinoli e Fernandes⁴⁸ observaram iogurtes com diferentes teores de sólidos e relataram que quanto maior esse valor maior também será a acidez do produto.

Essa característica não foi evidenciada no trabalho de Thamer e Penna⁴³ com bebidas lácteas funcionais, onde é relatado que a acidez está relacionada com o tipo de sólido adicionado, lácteo ou não, e com a atividade da cultura responsável pela fermentação. O resultado obtido pelo estudo foi de 15,68 a 18,97% de EST. No presente trabalho também não se relacionou o aumento da acidez com os maiores valores de EST encontrados.

Já em relação ao extrato seco desengordurado todos os tratamentos diferiram estatisticamente entre si, com valores que variaram de 14,81% de ESD para T3 e 12,60% de ESD para T5. Silva³⁸ encontrou teores de ESD variando de 18,67 a 19,10%. Yabu et al.,⁴⁹ relataram que na elaboração de iogurte de leite de vaca sempre é adicionado leite em pó, tendo como objetivo aumentar o teor de sólidos totais para melhorar a consistência e textura do iogurte. Pode-se dizer que nos iogurtes elaborados os baixos teores de extrato seco total encontrados foram influenciados pela utilização da farinha de arroz como substituinte do leite em pó. Nota-se também que o extrato seco desengordurado obteve menores valores em função do EST e dos diferentes níveis de gordura.

Todos os iogurtes foram preparados com leite UHT desnatado contendo 0,3% de gordura. Os tratamentos T6 e T7 apresentaram os menores valores de gordura por não conterem adição de óleo de linhaça na sua formulação.

Notou-se que a adição da farinha de arroz aumenta a quantidade de gordura nos iogurtes que a contém, uma vez que a farinha utilizada continha 0,72 g% de gordura. Os iogurtes T1, T2, T3, e T4 apresentaram os maiores teores de gordura já que foram adicionados de óleo de linhaça e farinha de arroz concomitantemente. Apenas os tratamentos T3 e T4 não diferiram estatisticamente entre si.

Segundo a legislação brasileira podemos classificar os iogurtes T1, T2, T3, T4 e T5 como sendo semi desnatados onde se admite de 0,60 até 2,9% de gordura. Os iogurtes T6 e T7 são classificados como desnatados, pois apresentaram teores de gordura menores que 0,5%⁸.

Cezar¹¹ relatou em seu trabalho com iogurte para pacientes intolerantes à lactose um valor de gordura de 3,00 a 3,31% pois utilizou leite integral para as formulações.

Rodas et al.,³⁴ relatam um teor de gordura de 1,60 a 2,73% em iogurtes comerciais adicionados de frutas. Silva³⁸ usando leite integral na preparação de iogurtes encontrou valores entre 3,12 e 3,15% de gordura. Awaisheh et al.,³ encontraram maiores contagens de *L. gasseri* nos leites fermentados adicionados de 0,1% de ômega-3.

Sabe-se que durante a hidrólise da lactose, para que ocorra a formação de glicose e galactose, é necessário que esta reaja com a água diminuindo a quantidade de água livre no leite. Tal fato pode ocasionar um ligeiro aumento do teor de gordura. Essa característica também pode ter influenciado os teores mais acentuados de gordura nos tratamentos adicionados de 0,5 e 0,8% de lactase.

Para os tratamentos T1, T2 e T7 os valores de proteína foram os mesmos e os menores encontrados (2,81%). O tratamento T3 apresentou maior teor de proteína (2,93%), conseqüentemente também obteve maior teor de EST (15,72%).

A legislação brasileira estabelece um mínimo de 2,9% de proteínas lácteas em iogurtes⁸. Assim, apenas o tratamento T3 está de acordo com a legislação, sendo que os demais tratamentos apresentaram teores de 2,8% de proteínas, aproximando-se do mínimo estabelecido pela legislação. Cezar et al.,¹¹ encontraram valores de proteína que variaram de 3,15 a 3,25% em iogurte desenvolvido com lactose reduzida.

Dave e Shah¹³ afirmaram que o *Lactobacillus acidophilus* apresenta atividade proteolítica, degradando a caseína em peptídeos ou aminoácidos livres beneficiando assim o crescimento de *Bifidobacterium* em produtos fermentados, fato que pode ter influenciado no presente trabalho.

Silva³⁸ obteve valores de proteína variando de 4,84 a 5,21% em iogurtes probióticos. O iogurte é normalmente adicionado de leite em pó para aumentar seu teor de sólidos, o que permite também um maior teor protéico agregado¹⁴.

Pode-se inferir que a substituição do leite em pó pela farinha de arroz neste trabalho não agregou um teor de proteínas apropriado aos iogurtes segundo a legislação.

Na Figura 1 podemos observar os valores de pH dos iogurtes durante o período de armazenamento de 28 dias (Apêndice 2). Percebe-se que em geral todos os tratamentos no tempo zero (final da fermentação e início da vida-de-prateleira) partiram de valores aproximados, entre 4,35 e 4,50, e a partir daí tiveram uma queda na primeira semana de estocagem, seguida de uma diminuição lenta e gradual nas semanas seguintes.

Não houve diferença estatística em relação ao pH na primeira semana de armazenagem entre os tratamentos.

Entretanto, nota-se que os iogurtes que receberam tratamento enzimático prévio apresentaram um decréscimo no pH menos acentuado que os demais. O tratamento T4 apresentou o pH mais elevado entre todos os tratamentos (4,49 a 4,44), seguido pelos tratamentos T3 (4,46 a 4,35) e T2 (4,42 a 4,39) respectivamente. O tratamento T7 diferenciou-se estatisticamente dos demais pelos menores valores de pH durante os 21 primeiros dias de estocagem (4,35 a 4,30).

A legislação brasileira não estabelece limites em relação ao pH dos iogurtes⁸. Segundo a tecnologia de fabricação, o pH do iogurte depende do tipo de cultura utilizada para a fermentação e pode variar de 4,5 a 4,8 em produtos recém elaborados¹².

Observa-se na Figura 2 os resultados de acidez dos iogurtes durante o armazenamento. Percebe-se que proporcionalmente ao decréscimo do pH ocorreu o aumento da acidez, sendo os menores valores encontrados para T4 (0,71 a 0,85% de ácido láctico) e T2 (0,75 a 0,89% de ácido láctico) respectivamente. Os maiores valores de acidez foram verificados no tratamento T7 (0,78 a 0,94% de ácido láctico) (Apêndice 2).

Os valores de acidez expressa em ácido láctico estabelecidos pela legislação são de no mínimo 0,6g de ácido láctico/100g de produto e no máximo de 1,5g de ácido láctico/100 g de produto⁸. Portanto, todos os iogurtes estão de acordo com os padrões exigidos.

Os resultados encontrados de pH e acidez expressam uma menor pós-acidificação nos iogurtes tratados previamente com a enzima lactase em comparação aos demais.

Iogurtes com baixa acidez ($\text{pH} > 4,6$) favorecem a separação do soro porque o gel não foi suficientemente formado. Em contra partida, $\text{pH} < 4,0$ reduz a hidratação das proteínas fazendo com que haja contração do coágulo e conseqüente dessoramento⁵.

Scherner³⁶ relata que alguns autores mencionam que o pH final do iogurte deve se encontrar entre 3,8 e 4,2 para atingir as características sensoriais e de textura desejáveis. Em pesquisa realizada por Malta et al.,²⁵ com iogurtes comerciais os valores de pH encontrados foram inferiores a 4,5, importante para impedir o crescimento de bactérias contaminantes.

Essa característica dos iogurtes de diminuir significativamente seu pH e aumentar a acidez proporcionalmente é chamada de pós-acidificação²⁸, fato decorrente da contínua atividade metabólica das bactérias lácticas mesmo após a fermentação. Percebe-se que a pós-acidificação do tratamento T7 (controle) foi maior que os demais, já nos tratamentos adicionados de lactase a pós-acidificação foi a menor verificada, característica também encontrada por Longo²⁴.

A tabela 2 apresenta os teores de lactose durante o armazenamento dos iogurtes (Apêndice 3).

Todos os tratamentos foram preparados com leite desnatado UHT, com valor de lactose de 4,69%. Segundo Tronco⁴⁵ a lactose apresenta-se no leite numa proporção de aproximadamente 4,8%. Portugal et al.,²⁹ encontrou concentração de lactose média de 4,6%, variando de 3,8 a 5,3%.

É sabido que essas variações ocorrem porque a composição do leite sofre muitas influências, como alimentação, raça e estação do ano²⁶.

Como mostra a tabela 2 para os mesmos dias de análise verifica-se que as amostras adicionadas de enzima lactase (T2, T3 e T4) diferiram estatisticamente entre as demais e entre si.

Os teores de lactose para T2 e T3 variaram de 1,32 a 1,15% e 1,09 a 0,82% respectivamente enquanto que o tratamento T4 foi totalmente hidrolisado a partir do primeiro dia de análise. Durante o armazenamento todos os tratamentos diminuíram suas quantidades de lactose. As reduções dos teores de lactose nos iogurtes sem adição de lactase foram de 7,68% para T1, 3,84% para T5, 8,53% para T6 e 14,7% para T7.

Entre os tratamentos adicionados de lactase houve diferença estatística sendo que a hidrólise da lactose foi de 75% para T2, 82,5% para T3 e 100% para T4.

Alimentos para dietas com restrição a alguns monossacarídeos e/ou dissacarídeos, especialmente formulados para atender às necessidades de portadores de intolerância à sua ingestão e/ou portadores de erros inatos do metabolismo de carboidratos, podem conter no máximo 0,5g do nutriente em referência por 100g ou 100mL do produto final a ser consumido⁷. Assim pode-se dizer que o iogurte elaborado com leite hidrolisado com 0,8% de lactase (tratamento T4) pode ser utilizado por pessoas intolerantes à lactose.

Segundo a literatura o consumo de lactose durante a fermentação e armazenamento de iogurtes varia entre 10 e 30%¹⁹.

De acordo com Trevisan⁴⁴ utilizando duas enzimas, (0,8%), diferentes obteve-se reduções de 72,3 e 88,6% em leites pasteurizados. Ainda em seus estudos foi constatado pela metodologia de superfície de resposta que em determinadas temperaturas e concentrações de enzimas atingiu-se quase 100% de hidrólise da lactose.

Segundo Carminatti¹⁰ em avaliação da hidrólise enzimática da lactose em reator de membrana utilizando *Kluyveromyces lactis*, o grau de hidrólise foi de aproximadamente 100% a uma temperatura de 30°C, pH 6,0 e concentração de enzima de 1250 mg/L.

Longo²⁴ utilizando uma concentração de 0,8g/L de enzima lactase diretamente no leite a 40°C por 4h obteve hidrólise de 88,07%. Utilizando esse leite na preparação de iogurtes encontrou 85 a 86% de hidrólise da lactose.

Barrantes et al.,⁶ encontraram menores valores de lactose em iogurtes frescos (34%) do que naqueles armazenados (40%), mostrando a hidrólise da lactose durante a estocagem refrigerada.

Ferronato et al.,¹⁸ avaliaram os teores de lactose em iogurtes e leites fermentados comerciais como subsídio para orientação nutricional de pacientes com intolerância à lactose e constataram que esses produtos apresentam em média 30% menos lactose que o leite.

Com isso eles indicaram que iogurtes e leites fermentados podem ser tolerados por pessoas que possuem má absorção de lactose, mas não pelos intolerantes à lactose.

Segundo Manan, Karim e Kit²⁶, os sintomas da intolerância podem ser eliminados quando a lactose é reduzida em 70%, valor calculado em aproximadamente 1,23% de lactose em um consumo de 220mL de produto lácteo.

Os teores de lactose dos iogurtes com leite tratado previamente com enzima lactase são considerados baixos podendo ser utilizados tanto para pessoas que possuem má absorção de lactose quanto pelos intolerantes à lactose.

Os demais iogurtes apresentaram redução nos seus teores de lactose, porém essa diminuição não elimina os sintomas desagradáveis da intolerância à lactose.

Segundo Ferreira¹⁷, quanto menor for o valor de pH, maior é a acidez e menor é a quantidade de lactose do iogurte. Para os iogurtes adicionados de lactase essa característica não é evidenciada. Pode-se perceber essa informação no tratamento T7 (controle).

CONCLUSÕES

Os teores de umidade, cinzas, extrato seco total, extrato seco desengordurado não são referenciados na legislação, contudo os resultados encontrados nesse trabalho são coerentes com a bibliografia encontrada.

Os teores de gordura foram mais altos para os tratamentos adicionados de óleo de linhaça e farinha de arroz (T1, T2, T3 e T4). Quanto aos teores de proteína encontrados apenas o iogurte T3 está de acordo com a legislação brasileira, sendo que os demais iogurtes apresentaram valores inferiores aos recomendados.

Todos os iogurtes tiveram seus teores de lactose reduzidos. Pode-se dizer que o uso de enzima lactase na matéria-prima do iogurte hidrolisou eficientemente a lactose presente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Senhor Eduardo Favarin pela doação da farinha de arroz e a Empresa Cisbraoleos pela doação do óleo de linhaça utilizado nesta pesquisa.

BECKER, L.V.; ALVES, L.L.; MATTANNA, P.; RICHARDS, N.S.P.S. Physicochemical composition of probiotic yogurt with reduced lactose content.

ABSTRACT

It is known that in Brazil 58 million people show difficulty in digesting lactose due to deficiency of lactase enzyme in the intestine. The reactions to these factors are symptoms of discomfort due to the excessive production of gas in the intestine and intestinal disorders such as colic and diarrhea. The lactose ingested in the yogurt is more efficiently digested than milk lactose. This is because of intestinal hydrolysis, by the action of the microbial lactase of organisms in the yogurt, during its way through the gastrointestinal tract. The β -galactosidase hydrolyzes the lactose in two monosaccharides, glucose and galactose, which are more efficiently absorbed by the intestine, these hydrolysis ease the sugar absorption by people who are lactose intolerant. This work aimed at elaborate and characterize yogurts with probiotic cultures. Low lactose content and flaxseed oil. The yogurts T6 and T7 were classified as skim milk and the others as semi-skimmed. The pH acidity relation was inversely proportional, thus, as the pH decreased the acidity increased in all treatments. The post acidification was more evident in the T7 yogurt. The contents of lactose decreased in all treatments, the most impressive decreases were observed in the lactase added yogurts.

KEYWORDS: Probiotic yogurt, lactase, physicochemical.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGGETT, P.J.; AGOSTINI, C.; AXELSSON, I. et al. Nondigestible carbohydrates in the diets of infants and young children: a commentary by the ESPGHAN Committee on nutrition. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.** 2003; 36:329-337.
2. AURICCHIO, S.; TRONCONE, R. Genetically determined disaccharidase deficiencies. In: Walker, W.A.; Durie, P.; Hamilton, J.R.; Walker-smith, J.A.; Watkins, J.B., editors. **Pediatric Gastrointestinal Disease**. Ontário: BC Decker Inc; 2000. p. 677-700.
3. AWAISHEH, S.S.; HADDADIN, M.S.Y.; ROBINSON, R.K. Incorporation of selected nutraceuticals and probiotic bacteria into a fermented milk. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1184-1190. 2004.
4. BATAVO. **Leite Batavo Sensy baixa lactose**. 2004. 2p. Publicidade.
5. BRANDÃO, S.C.C. Tecnologia da produção industrial de iogurte. **Leite e Derivados**, v. 5, n. 25, p. 24-38, 1995.
6. BARRANTES, E.; TAMIME, A.Y.; SWORD, A.M.; MUIR, D.D.; KALÁB, M. The manufacture of set-type natural yoghurt containing different oils – 1. compositional quality, microbiological evaluation and sensory properties. **Int. Dairy Journal**, v. 6, p. 811-826, 1996.
7. BRASIL. Ministério da Saúde. Regulamento Técnico Referente a Alimentos para Fins **Especiais**. Aprovado pela Portaria nº29 de 13 de janeiro de 1998. Brasília-DF, 1998.
8. BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. DEPARTAMENTO DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL. **Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados**, Resolução nº 5 de 13 de novembro de 2000. Disponível em: www.agricultura.gov.br/sislegis. Acesso em: 26/12/2008.
9. BRASIL. Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Métodos Analíticos Oficiais, Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos**. Aprovado pela Instrução Normativa nº68 de 12 de dezembro de 2006. Brasília-DF, 2006.
10. CARMINATTI, C.A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis***. 2001, 66p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

11. CEZAR, F.M.; FARIÑA, L.O.; DRUNKLER, D.A.; DALLA COSTA, M.C. Desenvolvimento de iogurte com lactose reduzida para pacientes intolerantes por meio de fermentação e adição de lactase. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, v. , p. 29-38, 2007.
12. CHR HANSEN. **Boletim HÁ-LA Biotec**, n. 76 julho/agosto, 2003. 5p.
13. DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Ingredient supplementation effects on viability probiotic bactéria in yogurt. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 11, 1998.
14. DEETH, C.L.I.F.; TAMIME, A.Y. Yogurt: Nutritive and therapeutic aspect. **Journal of Food Protection**, v. 44, n. 1, p. 78, 1981.
15. DUARTE, A.C. Nutrição Imunomoduladora. In: **Semiologia Imunológica Nutricional**. Rio de Janeiro: Axcel Books, p.138-144, 2003.
16. FERNANDES, A.M. **Avaliação do iogurte produzido com leite contendo diferentes níveis de células somáticas**. 2003. 99p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade de São Paulo, Pirassununga - SP.
17. FERREIRA, C.L.L.F. **Produtos lácteos fermentados (Aspectos Bioquímicos e Tecnológicos)**. 1. ed. Viçosa: Imprensa Universitária, 1997. p. 4-6.
18. FERRONATO, D.D.Z.; FARINÃ, L.O.; JORGE, A.S.; COSTA, M.C.D. Avaliação dos teores de lactose em iogurtes e leites fermentados produzidos no Paraná como subsídio para orientação nutricional para pacientes com intolerância à lactose. In: XXI CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 2004, Juiz de Fora. Anais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 50, n. 339, p. 156-159, jul/ago. 2004.
19. GALVÃO, L.C.; FERNANDES, M.I.M.; SAWAMURA, R. Conteúdo de lactose e atividade de β -Galactosidase em iogurtes, queijos e coalhadas produzidas no Brasil. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 32, n. 1, p. 8-14, 1995.
20. JONES, P.J.H., KUBOW, S. Lipídios esteróis e seus metabólitos. In: **Tratado de Nutrição Moderna na saúde e na doença**. 9^a ed. São Paulo, 1: 1243-48, 2002.
21. KOCIÁN, J. Lactose Intolerance – Minireview. **International Journal Biochemistry**, v.20, n.1, p.1-5, 1988.
22. LEE, K.W.; LIP, G.Y.H. The role of omega-3 fatty acid in the secondary prevention of cardiovascular disease. **Q.J. Med.**, v.96, p.465-480, 2003.
23. LIN, M.; SAVIANO, D.; HARLANDER, Influence of nonfermented dairy products containing bacterial starter cultures on lactose maldigestion in humans. **Jurnal of Dairy Science**, v. 74, p. 87-95, 1991.

24. LONGO, G. **Influência da adição de lactase na produção de iogurtes**. 2006. 109p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR.
25. MALTA, H.L.; LEITE, M. de O.; ANDRADE, N.S. de.; CERQUEIRA, M.R. de.; FONSECA, L.M. da.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Verificação da qualidade físico-química e microbiológica de alguns iogurtes vendidos na região de Viçosa, MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Anais do XVIII Congresso Nacional de Laticínios, n. 321, v. 56, p. 152-158, jul/ago. 2001.
26. MANAN, D.M.A.; KARIM, A.A.; KIT, W.K. Lactose content of modified enzyme-treated ‘dadih’. **Food Chemistry**, n. 65, p. 430-443, 1999.
27. MORIWAKI, C.; MATIOLI, G. Influência de β -galactosidase na tecnologia do leite e na má digestão da lactose. **Arq. Cienc. Saúde Unipar**, v. 4, n. 3, p. 283-290, set./dez. 2002.
28. PEREIRA, M.A.G. **Efeito do teor de lactose e do tipo de cultura na acidificação e pós acidificação de iogurtes**. 2002. 86p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP.
29. PORTUGAL, J.A.B; PAIVA e BRITO, M.A.V de.; DRUMOND e CASTRO, M.C. A qualidade do leite e os resíduos de antibióticos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora – MG, n.319, v.56, p. 9-14. Mar/Abr 2001.
30. PRASAD, K. Dietary flax seed in prevention of hipercholesterolemic atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v.132, p.69-76, 1997.
31. PRASAD, K.; MANTHA, S.V.; MUIR, A.D.; WESTCOTT, N.D. Reduction of hipercholesterolemic atherosclerosis by CDC-flaxseed with very low alpha-linolenic acid. **Atherosclerosis**, v.136, p.367-375, 1998.
32. PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMAN-CALDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.13, p. 3-11, 2002.
33. RASIC, J.L.; KURMANN, J.A. **Bifidobacteria and their role**. Birkhäuser, Basileia, Suíça, 1983.
34. RODAS, M.A.B.; RODRIGUES, R.M.M.S.; SAKUMA, H.; TAVARES, L.Z.; SGARBI, C.R.; LOPES, W.C.C. Caracterização físico-química, histológica e viabilidade de bactérias lácticas em iogurtes com frutas. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 304-309, set-dez. 2001.

35. SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *Int. Dairy J.*, Amsterdam, v.8, p341-347, 1998.
36. SCHERNER, M. **Estudos da influência de diferentes concentrações de extrato seco total sobre a fermentação do iogurte**. Monografia. 2004. 21-25.
37. SHAH, N.P.; FEDORAK, R.N.; JELEN, P.J Food consistency effects of quarg in lactose malabsorption. *International Dairy Journal*, n. 2, p. 257-269, 1992.
38. SILVA, S.V. da.; **Desenvolvimento de iogurte probiótico com prebiótico**. 2007. 107p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS.
39. **SPSS** for Windows Release 8.00, SPSS Inc, 22 dez. 1997.
40. SUENAGA, C.I. et al. **Intolerância à lactose**. UNIFESP: Escola Paulista de Medicina. 2003. Disponível em: <<http://www.virtual.epm.br/material/tis/curr-bio/trab2001/grupo1/intolerancia.htm>>. Acesso em: 04 mar. 2008.
41. SWAGERTY, D.L.; WALLING, A.D.; KLEIN, R.M. lactose intolerance. *American Family Physician*, v. 65, n. 9, p. 1845-1849, May 2002.
42. TÉO, C.R.P. A intolerância à lactose: uma breve revisão para o cuidado nutricional. **Arq. Cienc. Saúde Unipar**, v. 6, n. 3, p. 135-140, set./dez. 2002.
43. THAMER, K.G.; PENNA, A.L.B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26(3): 589-595, jul.-set., 2006.
44. TREVISAN, A.P. **Influência de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturas sobre a hidrólise da lactose em leite pasteurizado**. 2008. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria – RS.
45. TRONCO, V.M. **Manual para a inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2003. 192p.
46. VISEITANER, J.V.; GOMES, S.T.M.; HAYASHI, C.; SANTOS-JUNIOR, O.O.; SILVA, A.B.M.; JUSTI, K.C.; SOUZA, N.E.; MATSUSHITA, M. Efeito do tempo de fornecimento de ração suplementada com óleo de linhaça sobre a composição físico-química e de ácidos graxos em cabeças de tilápias do Nilo. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 23(3), 478-484, 2003.
47. WAITZBERG, D.L., BORGES, V.C. Gorduras. In: **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, p.59-64, 2002.

48. WOLFSCHOON-POMBO, A.F.; GRANZINOLLI, G.G.M.; FERNANDES, R.M. Sólidos totais do leite, acidez, pH e viscosidade do iogurte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.227, n. 37, p. 19-24, 1983.

49. YABU, M.C.; SCHOLZ, M.B.S.; RAPACCI, M.; ANTUNES, L.A.F. Características físico-químicas e sensoriais de iogurte produzido de misturas de leite bovino e bubalino. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 43, n. 258, p. 35-37, 1988.

Tabela 1 – Caracterização físico-química dos iogurtes probióticos adicionados de óleo de linhaça. Análise realizada no 15º dia de armazenamento.

Análises	Iog T1	Iog T2	Iog T3	Iog T4	Iog T5	Iog T6	Iog T7
Umidade (%)	85,26 ^A	85,24 ^A	84,28 ^A	84,66 ^A	86,69 ^A	86,66 ^A	85,89 ^A
Cinzas (%)	0,72 ^{AB}	0,72 ^{AB}	0,68 ^C	0,74 ^A	0,72 ^{AB}	0,64 ^D	0,71 ^B
EST (%)	14,74 ^C	14,76 ^C	15,72 ^A	15,34 ^B	13,31 ^F	13,34 ^E	14,11 ^D
ESD (%)	13,85 ^D	13,88 ^C	14,81 ^A	14,43 ^B	12,60 ^G	12,93 ^F	13,81 ^E
Proteína (%)	2,81 ^D	2,81 ^D	2,93 ^A	2,85 ^C	2,85 ^C	2,88 ^B	2,81 ^D
Gordura (%)	0,89 ^{AB}	0,88 ^B	0,91 ^A	0,91 ^A	0,71 ^C	0,41 ^D	0,30 ^E

Valores com letras iguais na mesma linha não diferiram estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância.

T1 iogurte com adição de 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T2 Iogurte com adição de 0,2% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T3 iogurte com adição de 0,5% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

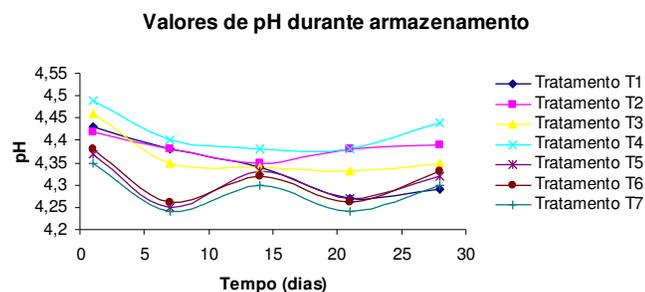
T4 iogurte com adição de 0,8% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T5 iogurte com adição 0,5% de Óleo de Linhaça;

T6 iogurte com adição de 1,5% de Farinha de Arroz;

T7 iogurte controle, sem adições.

Figura 1 – Valores de pH durante o armazenamento de 28 dias dos iogurtes probióticos



T1 iogurte com adição de 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T2 Iogurte com adição de 0,2% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T3 iogurte com adição de 0,5% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

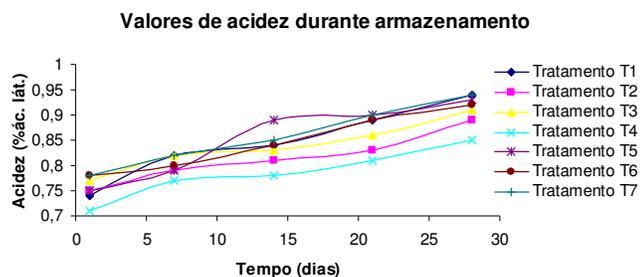
T4 iogurte com adição de 0,8% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T5 iogurte com adição 0,5% de Óleo de Linhaça;

T6 iogurte com adição de 1,5% de Farinha de Arroz;

T7 iogurte controle, sem adições.

Figura 2 – Valores de acidez em % de ácido láctico durante o armazenamento de 28 dias dos iogurtes probióticos



T1 iogurte com adição de 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T2 Iogurte com adição de 0,2% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T3 iogurte com adição de 0,5% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T4 iogurte com adição de 0,8% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T5 iogurte com adição 0,5% de Óleo de Linhaça;

T6 iogurte com adição de 1,5% de Farinha de Arroz;

T7 iogurte controle, sem adições.

Tabela 2 – Teores de lactose dos iogurtes probióticos durante armazenamento de 28 dias*

<i>Tratamentos</i>	<i>1º dia</i>	<i>7º dia</i>	<i>14º dia</i>	<i>21º dia</i>	<i>28º dia</i>
T1	4,52 ^{Ba}	4,51 ^{Ba}	4,43 ^{Ab}	4,51 ^{Ba}	4,33 ^{Bc}
T2	1,32 ^{Ca}	1,30 ^{Ca}	1,23 ^{Bb}	1,15 ^{Dc}	1,15 ^{Ec}
T3	1,09 ^{Da}	0,97 ^{Db}	0,95 ^{Cb}	0,90 ^{Ec}	0,82 ^{Fd}
T4	ND ^{Ea}	ND ^{Ea}	ND ^{Da}	ND ^{Fa}	ND ^{Ga}
T5	4,62 ^{Aa}	4,56 ^{Ab}	4,55 ^{Ab}	4,55 ^{Ab}	4,51 ^{Ac}
T6	4,60 ^{Aa}	4,55 ^{Ab}	4,54 ^{Ab}	4,53 ^{ABb}	4,29 ^{Cc}
T7	4,53 ^{Ba}	4,50 ^{Bb}	4,45 ^{Ac}	4,25 ^{Cd}	4,00 ^{De}

* Valores de lactose expressos em porcentagem. ND – valor não determinado

Valores com letras iguais (minúsculas) na mesma linha não diferiram estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância.

Valores com letras iguais (maiúsculas) na mesma coluna não diferiram estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância.

T1 iogurte com adição de 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T2 Iogurte com adição de 0,2% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T3 iogurte com adição de 0,5% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T4 iogurte com adição de 0,8% de enzima lactase, 0,5% de Óleo de Linhaça e 1,5% de Farinha de Arroz;

T5 iogurte com adição 0,5% de Óleo de Linhaça;

T6 iogurte com adição de 1,5% de Farinha de Arroz;

T7 iogurte controle, sem adições.

5 DISCUSSÃO

Quando existe a deficiência da enzima lactase o processo de hidrólise da lactose não ocorre. Assim, não há dissociação da lactose nos seus dois monossacarídeos: glicose e galactose. Com isso, esses produtos não serão absorvidos por transporte ativo dependente de sódio e mediado por carreador. A lactose passa ao cólon sem ser hidrolisada e é fermentada pelas bactérias aí presentes, produzindo ácido láctico, ácido butírico e outros ácidos voláteis que reduzem o pH das fezes para um valor inferior a 6,0. Esse mecanismo é chamado de intolerância à lactose e tem como sintomas diarreia, dor e distensão abdominal ou flatulência (AGGETT et al., 2003).

A deficiência da enzima beta-galactosidase (lactase) no organismo é considerada uma desordem genética muito comum entre a população mundial. Na maioria da população, após o desmame, há um declínio gradual da atividade da lactase. A diminuição dos níveis de lactase é progressivo durante a infância e a adolescência, havendo um aumento nas taxas de má absorção de acordo com a idade (MANAN; KARIM; KIT, 1999).

As pessoas com intolerância à lactose dependem de uma dieta diferenciada para não sofrerem dos sintomas descritos anteriormente. Juntamente a esse fato está a busca cada vez maior por produtos que tragam algum benefício à saúde.

A utilização dos iogurtes nas dietas vem de milhares de anos atrás e cresce a cada ano. A fermentação favorece a diminuição dos níveis de lactose em função dos microrganismos presentes que degradam esse açúcar. Os produtos fermentados estão sendo muito indicados para pessoas intolerantes à lactose, porém, dependendo do consumidor, os sintomas desagradáveis não são totalmente eliminados.

Os microrganismos probióticos são considerados alimentos funcionais, pois, além de fornecerem a nutrição básica promovem a saúde. Os probióticos colonizam o intestino humano competindo com microrganismos patogênicos além de promover a digestão da lactose em indivíduos intolerantes à mesma, tudo isso aliado à estimulação do sistema imune entre outros benefícios.

Assim como os probióticos, os óleos ricos em ômega-3 também são considerados funcionais. O óleo de linhaça é fonte de ácidos graxos essenciais, contribuem para a sensação de saciedade e aumentam a palatabilidade.

Com base nos relatos acima, ressalta-se a importância da produção de um iogurte, naturalmente com menor teor de lactose, adicionado de enzima lactase, probióticos e óleo de linhaça. Desta forma, os resultados obtidos na presente pesquisa demonstram a eficiente hidrólise da lactose nos iogurtes adicionados de enzima beta-galactosidase. A utilização da enzima lactase no leite, matéria-prima do iogurte, durante doze horas à 8°C foi eficaz na hidrólise da lactose. Houve coerência nos resultados encontrados em relação aos diferentes teores de lactase utilizados, ou seja, nas mesmas condições de tempo e temperatura, quanto maior a concentração da enzima utilizada, maior foi a hidrólise obtida. Os tratamentos adicionados de lactase apresentaram baixos teores de lactose estando de acordo com os padrões regulamentados pela legislação de alimentos para fins especiais, podendo assim, ser utilizados por intolerantes à lactose.

Em relação aos valores de pH e acidez expressa em ácido láctico, houve uma relação inversa, enquanto ocorria o decréscimo do pH havia um aumento da acidez durante o período de 28 dias de armazenagem. Essa relação conhecida como pós-acidificação acontece em virtude da contínua atividade metabólica das bactérias lácticas mesmo após a fermentação. Verificou-se menor pós-acidificação nos tratamentos com teor de lactose reduzidos e, maior pós-acidificação no tratamento controle, no qual não houve adição de lactase e óleo de linhaça. O decréscimo do pH é importante para que não haja a proliferação de patógenos.

O número de células viáveis de *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* apresentou-se elevado em relação à bibliografia encontrada, porém, manteve a proporção de 2:1 em relação ao *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, o que pode ter sido favorecido pela temperatura de inoculação ou pelo pH final de 4,24. A presença em menor quantidade de *Lactobacillus bulgaricus* no produto final pode favorecer a diminuição da pós-acidificação durante a vida-de-prateleira, esse fator é importante para garantir sabor suave ao produto final e evitar efeitos adversos do pH baixo sobre as bactérias probióticas.

Em relação às bifidobactérias, houve crescimento microbiano na maioria dos tratamentos. Contudo, pode-se notar que a utilização da maior concentração de lactase e/ou o maior valor de pH, influenciou negativamente o referido tratamento, fazendo com que a contagem decrescesse em um ciclo logarítmico ao fim da armazenagem. O pH não afetou negativamente o crescimento das bifidobactérias dos demais tratamentos. Todas as contagens estão de acordo com o que estabelece a legislação brasileira.

Em contra partida, o número de *Lactobacillus acidophilus* foi crescente até o fim da vida-de-prateleira no tratamento adicionado da maior concentração da enzima lactase. O tratamento controle apresentou contagens de *L. acidophilus* de 10^{11} UFC/mL durante todo o período de armazenamento. Constatou-se que o crescimento de *Lactobacillus acidophilus* foi maior que o de *Bifidobacterium sp.* corroborando com os resultados encontrados na literatura. Tanto o pH quanto a enzima lactase não afetaram o crescimento dos microrganismos. As contagens de *L. acidophilus* apresentaram-se conforme preconiza a legislação.

A legislação brasileira não faz referência aos teores de lactose, valor de pH, umidade, cinzas, extrato seco total e extrato seco desengordurado. Assim, fez-se comparação dos resultados encontrados com a bibliografia, sendo que estes estavam de acordo com o encontrado por outros autores.

É estabelecido pela legislação brasileira um mínimo de 2,9% de proteínas nos iogurtes. O presente trabalho apresentou apenas um tratamento conforme o preconizado. Observou-se que a proporção de proteína nos iogurtes variou de 2,81 a 2,93, uma variação pequena, podendo-se inferir que a lactase, as bactérias probióticas e o óleo de linhaça não influenciaram o teor de proteínas. Contudo, a substituição do leite em pó pela farinha de arroz pode ter influenciado no valor agregado de proteínas. Sabe-se também que o *Lactobacillus acidophilus* apresenta atividade proteolítica, degradando a caseína em peptídeos ou aminoácidos livres, o que pode ter afetado o teor de proteínas do iogurte estudado.

Os iogurtes adicionados de óleo de linhaça e farinha de arroz obtiveram os maiores valores de gordura, ou seja, foram classificados como semi-desnatados, pois, apresentaram valores entre 0,60 e 2,90% de proteínas. Já o iogurte contendo apenas farinha de arroz e o iogurte controle ficaram classificados como desnatados por conter teor de gordura inferior a 0,5%, segundo a legislação brasileira.

6 CONCLUSÃO

Pode-se inferir com o presente estudo que a enzima lactase utilizada na matéria-prima dos iogurtes reduziu eficientemente o teor de lactose dos tratamentos. As reduções foram maiores que 70%, portanto pode-se dizer que os iogurtes formulados podem ser consumidos por pessoas intolerantes à lactose. Contudo, apenas o iogurte adicionado da maior concentração de lactase (0,8%) está conforme a legislação de produtos para fins especiais.

As contagens de *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* foram superiores às encontradas na bibliografia. Houve a relação de 2:1 na proporção *Streptococcus thermophilus/ Lactobacillus bulgaricus*. O número de células viáveis do *Lactobacillus acidophilus* foi maior que a das *Bifidobacterium*, mantendo-se em número superior até o fim da vida-de-prateleira. Tanto o número de células viáveis dos microrganismos probióticos como das bactérias lácticas ficaram dentro do preconizado pela legislação vigente.

Verificou-se menor pós-acidificação nos tratamentos com teor de lactose reduzidos e maior pós-acidificação no tratamento controle.

Os teores de umidade, cinzas, extrato seco total, extrato seco desengordurado não são referenciados na legislação, contudo os resultados encontrados nesse trabalho são coerentes com a bibliografia encontrada. Os teores de gordura foram mais altos para os tratamentos adicionados de óleo de linhaça e farinha de arroz. Quanto aos teores de proteína encontrados apenas iogurte T3 (0,5% de lactase, 0,5% de óleo de linhaça e 1,5% de farinha de arroz) está de acordo com a legislação brasileira, sendo que os demais iogurtes estão muito próximos dos valores estabelecidos.

O presente trabalho é muito importante tanto para a comunidade científica como para as pessoas intolerantes à lactose.

A continuação dessa pesquisa é de grande valia, pois vai avaliar, além das características aqui estudadas, outros fatores importantes como o perfil de ácidos graxos e a utilização de outros microrganismos, por exemplo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. **Food microbiology**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2000. 494p.

AGGETT, P.J.; AGOSTINI, C.; AXELSSON, I. et al. Nondigestible carbohydrates in the diets of infants and young children: a commentary by the ESPGHAN Committee on nutrition. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.** 2003; 36:329-337.

ALBERTAZZI, P., COUPLAND, K. Polyunsaturated fatty acids. Is there a role in postmenopausal osteoporosis prevention? **Maturitas**, v.42, n.1, p.13-22, 2002.

AMIOT, J. **Ciência y tecnología de la leche**: principios y aplicaciones. Zaragoza: Acribia, 1991. 547p.

ARNOTT, D.R.; DUISCHAEVER, C.L.; BULLOCK, D.H. Microbiological evaluation of yogurt produced commercially in Ontário. **Journal Milk, Food Technology**. Ames. V. 37, n. 1, p. 11-13, Aug, 1974.

AURICCHIO, S.; TRONCONE, R. Genetically determined disaccharidase deficiencies. In: Walker, W.A.; Durie, P.; Hamilton, J.R.; Walker-smith, J.A.; Watkins, J.B., editors. **Pediatric Gastrointestinal Disease**. Ontário: BC Decker Inc; 2000. p. 677-700.

AWAISHEH, S.S.; HADDADIN, M.S.Y.; ROBINSON, R.K. Incorporation of selected nutraceuticals and probiotic bacteria into a fermented milk. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1184-1190. 2004.

BARRANTES, E.; TAMIME, A.Y.; SWORD, A.M.; MUIR, D.D.; KALÁB, M. The manufacture of set-type natural yoghurt containing different oils – 1. compositional quality, microbiological evaluation and sensory properties. **Int. Dairy Journal**, v. 6, p. 811-826, 1996.

BATAVO. **Leite Batavo Sensy baixa lactose**. 2004. 2p. Publicidade.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v.35, n.2/3, p.125-131, 2002.

BEHMER, M.L.A. **Tecnologia do leite**. 2ª ed., cap.13, p.103-107, Livraria Nobel S.A., São Paulo, 1976.

BEHMER, M.L.A. **Tecnologia do leite: produção, industrialização e análise**. 15.ed. São Paulo: Nobel, 1991. 320p.

BOZANIC, R.; ROGELI, I.; TRATNIK, L.J. Fermented acidophilus goat's milk supplemented with inulin: comparison with cow's milk. **Milchwissenschaft**. V. 56, n. 11, p. 618-622, 2001.

BRANDÃO, S. C. C. Tecnologia da fabricação de iogurte. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, v. 42, n. 250, p. 3-8, 1987.

BRANDÃO, S. C. C. Tecnologia da produção industrial de iogurte. **Leite e Derivados**, v. 5, n. 25, p. 24-38, 1995.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados**, Resolução MERCOSUL/GMC/RES nº 47 de 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Regulamento Técnico Referente a Alimentos para Fins **Especiais**. Aprovado pela Portaria nº29 de 13 de janeiro de 1998. Brasília-DF, 1998.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados**, Resolução nº 5 de 13 de novembro de 2000. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sislegis>>. Acesso em: 26/12/2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº. 348. **Utilização de enzimas na indústria de alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, 02 dez. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Métodos Analíticos Oficiais, Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos**. Aprovado pela Instrução Normativa nº68 de 12 de dezembro de 2006. Brasília-DF, 2006.

BRESLOW, J. Ômega-3 fatty acids and cardiovascular disease. Presented at the ômega-3 fatty acids. **Recommendations for therapeutics and prevention symposium**. New York, 2005.

CALDER, P.C.; KEW, S. The immune system: a target for functional foods? **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.88, supl.1, p.S165-S176, 2002.

CAMPBELL, M.K. **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2000. 3a ed. 751p.

CARMINATTI, C.A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator de membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis***. 2001. 66f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

CASTRO, E.M., VIEIRA, N.R.A., RABELO, R.R., SILVA, S.A. Qualidade de grãos em arroz. Santo Antônio de Goiás: **Embrapa Arroz e Feijão**, 1999.

CASTRO, H.F; MENDES, A.A; SANTOS, J.C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v.27, n.01, p.146-156, 2004.

CEZAR, F.M.; FARIÑA, L.O.; DRUNKLER, D.A.; DALLA COSTA, M.C. Desenvolvimento de iogurte com lactose reduzida para pacientes intolerantes por meio de fermentação e adição de lactase. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, v. , p. 29-38, 2007.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **Int. J. Dairy Technol.**, Long Hanborough, v.51, n.4, p.123-136, 1998.

CHEN, Z.Y., RATNAYAKE, W.M.N., CUNNANE, S.C. Oxidative stability of flaxseed lipids during baking. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.71, n.6, p.629-632, 1994.

CHRISTIAN HANSEN. **Method for counting probiotic bacteria.** *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* in milk products made with nutraceutical cultures. 1999. 5p. [Procedimento Analítico].

CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento.** Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 01 de out. de 2008.

CORL, B.A., BAUMGARD, L.H., DWYER, D.A. The role of Δ^9 desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v.12, n.11, p.622-630, 2001.

CRITTENDEN, R.G.; Prebiotics. In: TANNOCK, G.W., ed. **Probiotics: a critical review.** Norfolk: Horizon Scientific Press, 1999. p.141-156.

CROCIANI, F., ALESSANDRINI, A., MUCCI, M.M. e Biavati, B. Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* ssp. **International Journal of Food Microbiology** 24, 199-210, 1994.

ÇON, A.H. et al. Effects of different fruits and storage periods on microbiological qualities of fruit-flavored yogurt produced in Turkey. **Journal of Food Protection**, v.59, n.4, p.402-406, 1996.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Effect of cysteine on the viability of yogurt and probiotic bacteria in yogurt made with commercial starter cultures. **International Dairy Journal**. V. 7, n. 8, p. 537-545, 1997.

DEETH, C.L.I.F.; TAMIME, A.Y. Yogurt: Nutritive and therapeutic aspect. **Journal of Food Protection**, v. 44, n. 1, p. 78, 1981.

DINAKAR, P.; MISTRY, V.V. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**. 77, 2854-2864, 1994

DUARTE, A.C. Nutrição Imunomoduladora. In: **Semiologia Imunológica Nutricional.** Rio de Janeiro: Axcel Books, p.138-144, 2003.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**, 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1998. 652p.

FERNANDES, A.M. **Avaliação do iogurte produzido com leite contendo diferentes níveis de células somáticas.** 2003. 99p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade de São Paulo, Pirassununga - SP.

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

FERREIRA, C.L.L.F. Valor nutricional e bioterapêutico de leites fermentados. **Leite & Derivados**, São Paulo, v.6, n.36, p.46-52, 1997.

FERREIRA, C. L. L.; TESHIMA, E. Prebióticos: Estratégia dietética para manutenção da microbiota colônica desejável. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n. 16, p. 22-25, 2000.

FERREIRA, C. L. L.F.; MALTA, H.L.; DIAS, A.S.; GUIMARÃES, A.; JACOB, F.E.; CUNHA, R.M.; CARELI, R.T.; PEREIRA,S.; FERREIRA, S.E.R. Verificação da qualidade físico-química e microbiológica de alguns iogurtes vendidos na região de Viçosa. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 56, n. 321, p. 152-158, 2001.

FERRONATO, D.D.Z.; FARINÃ, L.O.; JORGE, A.S.; COSTA, M.C.D. Avaliação dos teores de lactose em iogurtes e leites fermentados produzidos no Paraná como subsídio para orientação nutricional para pacientes com intolerância à lactose. In: XXI CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 2004, Juiz de Fora. Anais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 50, n. 339, p. 156-159, jul/ago. 2004.

FINEGOLD, S.M.; SUTTER, V.L.; MATHISEN, G.E. Normal indigenous intestinal flora. Em **Hetges, D.J., Human Intestinal Microflora in Health and Disease**, p.3-31, Academic Press, New York, 1983.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: <http://www.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>. Acesso em: 30 de set. de 2008.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.66, p.365-378, 1989.

GACESA, P.; HUBBLE, J. **Tecnologia de las enzimas**. Zaragoza: Acribia S.A., 1990. 206p.

GALVÃO, L.C.; FERNANDES, M.I.M.; SAWAMURA, R. Conteúdo de lactose e atividade de β -Galactosidase em iogurtes, queijos e coalhadas produzidas no Brasil. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 32, n. 1, p. 8-14, 1995.

GAVA, J.A. **Princípios de tecnologia de alimentos**. 7ª ed. São Paulo: Nobel, 1984.

GIBSON, G.R.; FULLER, R. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **J. Nutr., Bethesda**, v.130, p.391S-394S, 2000.

GILLILAND, S.E.; REILLY, S.S.; KIM, G.B.; KIM, H.S. Viability during storage of selected probiotic lactobacilli and bifidobactérias in a yogurt-like product. **Food Microbiology and Safety**, v. 67, n. 8, p. 3091-3095, 2002.

GIST-BROCADES. Dairy Ingredients Group. Maxilact: the dairy yeast lactase. In: **Biotechnology contributing to food, health and the environment**. The Netherlands. Gist-Brocades BSD B.V., 2004. 12p.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. Development of a probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. **Journal of Dairy Science**, 81, 1492, 1998.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Biotecnologia Alimentar**, n. 64, p. 12-22, 1999.

GONZÁLEZ, S. Alimentos lácticos probióticos. In: LERAYER, A.L.S.; SALVA, T.J.G. **Leites fermentados e bebidas lácteas: tecnologia e Mercado**. Campinas: ITAL, 1997, cap. 10, p. 1-6.

GOURSAUD, J. O leite de vaca: composição e propriedades físico-químicas. In: LUQUET, F.M. **O leite: do úbere à fabrica de laticínios**. Portugal: Publicações Europa-America Lda, 1985, v. 1, parte 1, cap. 1, p. 31-56.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. **Gut flora in health and disease**. Lancet, London, v.360, p.521-518, 2003.

HOLT, J.G.; BERGEY, D.H.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9ed. Baltimore, 1994.

INSTITUTE OF SHORTENING AND EDIBLE. **Food Fats and Oils**, 8ed., Washington, 1999.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Yogurt: enumeration of characteristic microorganisms**. IDF/ISO Standard, 1997, 5p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus***. Bulletin of the IDF, n. 306, p. 23-33, 1999.

JELEN, P., LUTZ, S. Functional milk and dairy products. In: MAZZA, G., ed. **Functional foods: biochemical and processing aspects**. Lancaster: Technomic Publishing, 1998. p.357-381.

JONES, P.J.H., KUBOW, S. Lipídios esteróis e seus metabólitos. In: **Tratado de Nutrição Moderna na saúde e na doença**. 9ª ed. São Paulo, 1: 1243-48, 2002.

KAUR, I.P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v.15, p.1-9, 2002.

KAUR, N.; GUPTA, A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **J. Biosci.**, Bangalore, v.27, p.703-714, 2002.

KIM, K.I.; BAEK, Y.J.; YOON, Y.H. Effects of rehydration media and immobilization in Ca-alginate on the survival of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum*. **Korean Journal of Dairy Science**, 18, 193-198, 1996.

KLAENHAMMER, T.R. Probiotics and prebiotics. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. 2.ed. Washington: ASM, 2001.p.797-811.

KOCIÁN, J. Lactose Intolerance – Minireview. **International Journal Biochemistry**, v.20, n.1, p.1-5, 1988.

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. **J. Am. Diet. Assoc.**, Chicago, v.101, p.229-241, 2001.

KURMANN, J.A.; RASIC, J.L. The health potential of products containing bifidobacterias. Em Robinson, R.K. (ed), *Therapeutic properties of fermentes milks*, p. 117-157, **Elsevier Applied Science Publishers**, Londres, 1991.

LABORDE, F.L., MANDELL, I.B., TOSH, J.J., WILTON, J.W., BUCHANAN-SMITH, J.D. Breed effects on growth performance, carcass characteristics, fatty acid composition, and palability attributes in finishing steers. **J. Anim. Sci.**, 79: 355-365, 2001.

LACTOSE. In: BUDAVARI, S. (Ed.). **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**, 12 ed. Merck: Research Laboratories Division of MERCK & CO, 1996. P. 912.

LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, N.P.; BRITZ, M.L. Survival of bifidobacteria during refrigerated storage in the presence of acid and hydrogen peroxide. **Milchwissenschaft**, v. 51, p. 65-70, 1996.

LEE, K.W.; LIP, G.Y.H. The role of omega-3 fatty acid in the secondary prevention of cardiovascular disease. **Q.J. Med.**, v.96, p.465-480, 2003.

LEE, Y.K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. **Handbook of probiotics**, New York: wiley, p.211, 1999.

LILLY, D. M. E STILLWELL, R. H. 1965. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. **Science** 147, 747-748.

LIN, M.; SAVIANO, D.; HARLANDER, Influence of nonfermented dairy products containing bacterial starter cultures on lactose maldigestion in humans. **Jurnal of Dairy Science**, v. 74, p. 87-95, 1991.

LONGO, G. **Influência da adição de lactase na produção de iogurtes**. 206. 89f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LOPES, C.C. **Estudo do mecanismo da quebra dos grãos de arroz**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) FEA/UNICAMP. Campinas, 1989.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.11, p.1-17, 2002.

LUCEY, J.A.; SINGH, H. Formation and physical properties of acid milk gels: a review. **Food Research International**. V. 30, n. 7, p. 529-539, 1998.

LUNDUBWONG, N., SEIB, P.A. Rice isolation by alkaline protease digestion of wet-millet rice flour. **Journal of Cereal Science**, v.31, p.63-74, 2000.

MACEDO, N.L.T. **Leites fermentados**: iogurtes e bebidas lácteas. Juiz de Fora: EPAMIG/CT/ILCT, 2003. 1 CD-ROM.

MAHAUT, M. et.al. **Productos lácteos industriales**. Zaragoza: Acribia, S.A., 2004. 177p.

MALTA, H.L.; LEITE, M. de O.; ANDRADE, N.S. de.; CERQUEIRA, M.R. de.; FONSECA, L.M. da.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Verificação da qualidade físico-química e microbiológica de alguns iogurtes vendidos na região de Viçosa, MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Anais do XVIII Congresso Nacional de Laticínios, n. 321, v. 56, p. 152-158, jul/ago. 2001.

MANAN, D.M.A.; KARIM, A.A.; KIT, W.K. Lactose content of modified enzyme-treated 'dadih'. **Food Chemistry**, n. 65, p. 430-443, 1999.

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

MARSHALL, V.M.; COLE, W.M. Threonine aldolase and alcohol dehydrogenase activities in *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* and their contribution to flavour production in fermented milks. **Journal of Dairy Research**, 50, 375-379, 1983.

MARTIN, J.H.; CHOU, K.M. Selection of Bifidobacterium spp. for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods. Tolerance to pH of yoghurt. **Cultured Dairy Products Journal**, v. 27, n. 21, p. 23-26, 1992.

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

MATIOLI, G.; ENDO, A.S.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Beta-galactosidase de *Kluyveromyces fragilis*: estabilidade operacional. In: **10º Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 1994. Anais... 1994. p.1308-1311.

METCALF, R.G.; JAMES, M.J.; MANTZIORIS, E.; CLELAND, L.G. A practical approach to increasing intakes of n-3 polyunsaturated fatty acids: use of novel foods enriched with n-3 fats. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.57, p.1605-1612, 2003.

MITSUOKA, T. Bifidobacteria and their role in human health. **Journal of Industrial Microbiology**, 6, 263-268, 1990.

MOREIRA, S.R.; SCHWAN, R.S.; CARVALHO, E.P.; FERREIRA, C. Análise microbiológica de iogurtes comercializados em Lavras – MG. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, vol. 19, nº 1, p. 147-152, jan 1999.

MORIWAKI, C.; MATIOLI, G. Influência de β -galactosidase na tecnologia do leite e na má digestão da lactose. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, v. 4, n. 3, p. 283-290, set./dez. 2000.

NAHAISI, M.H. *Lactobacillus acidophilus*, therapeutic properties, products and enumeration. Cap.6. Em Robinson, R.K., Developments in Food Microbiology, p.153-178. **Elsevier Applied Science Publishers**, Londres, 1986.

OLIVEIRA, A.J. Propriedades profiláticas e terapêuticas de leites fermentados: uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V. 31, n. 2, p. 176-185, 1997.

OLIVEIRA, C.C.M. de. **Produção de β -galactosidase por levedura recombinante – Desenvolvimento de um sistema de produção estável**. 2005. 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de Minho, Braga, 2005.

PARKER, R. B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotics story. **Animal Nutrition and Health**. 29, 4-8.

PETIT, H.V., Digestion, milk production, milk composition, and blood composition of dairy cows fed whole flaxseed. **J. Dairy Sci.**, 85:1482-1490, 2002.

PEREIRA, M.A.G. **Efeito do teor de lactose e do tipo de cultura na acidificação e pós acidificação de iogurtes**. 2002. 86p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP.

POLANCO, I., MOLINA, M., PIETRO, G., CARRACO, S., LAMA, R., Dieta y enfermedad celíaca. **Alimentaria**, v.33, n.264, p.91-93, 1995.

PONNAMPALAM, E.N.; SINCLAIR, A.J., EGAN, A.R., BLAKELEY, S.J., LI, D., LEURY, B.J. Effect of dietary modification of muscle long chain n-3 fatty acid on plasma insulin and lipid metabolites, carcass traits, and fat deposition in lambs. **J. Anim. Sci.**, 79: 895-903, 2001.

PORTUGAL, J.A.B; PAIVA e BRITO, M.A.V de.; DRUMOND e CASTRO, M.C. A qualidade do leite e os resíduos de antibióticos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora – MG, n.319, v.56, p. 9-14. Mar/Abr 2001.

PRASAD, K. Dietary flax seed in prevention of hipercholesterolemic atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v.132, p.69-76, 1997.

PRASAD, K.; MANTHA, S.V.; MUIR, A.D.; WESTCOTT, N.D. Reduction of hipercholesterolemic atherosclerosis by CDC-flaxseed with very low alpha-linolenic acid. **Atherosclerosis**, v.136, p.367-375, 1998.

PROULX, M.; WARD, P.; GAUTHIER, S.F.; ROY, D. Comparison of bifidobacterial growth-promoting activity of ultrafiltered casein hydrolyzate fractions, **Le Lait**. 74, 139-152, 1994.

PROZYN. **Prozyn Lactase**. São Paulo 2004. 4p. Informação técnica.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMAN-CALDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.13, p. 3-11, 2002.

RAO, A.V.; SHIWNARAIN, N.; MAHARAJ, I. Survival of microencapsulated Bifidobacterium pseudolongum in simulated gastric and intestinal juices. **Canadian Institute of Food science and Technology Journal**, 22, 345-349, 1989.

RAPACCI, M. Leites Fermentados. Curitiba: PUC-PR, Departamento de Engenharia de Alimentos, 1999. 29p. Apostila digitada.

RASIC, J.L.; KURMANN, J.A. Yogurt. 1 ed. Vol. 1. Technical Dairy Publishing House, 1978.

RASIC, J.L.; KURMANN, J.A. **Bifidobacteria and their role**. Birkhäuser, Basileia, Suíça, 1983.

RICHARD, H. Enzimologia e Biocatálise. In: SCRIBAN, R. (Coord.). **Biotecnologia**. São Paulo: Manole, 1985. Parte 3: Engenharia Enzimática, cap.1, p. 179-207.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics and Probiotics: are they functional foods? **Am. J. Clin. Nutr.** 2000; 1682S-1687S.

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

ROBINSON, R.K.; AWAISHEH, S.S.; HADDADIN, M.S.Y. Incorporation os selected nutraceuticals and probiotic bacteria into a fermented milk. **International Dairy Journal**. V. 15, p. 1184-1190, 2005.

RODAS, M.A.B.; RODRIGUES, R.M.M.S.; SAKUMA, H.; TAVARES, L.Z.; SGARBI, C.R.; LOPES, W.C.C. Caracterização físico-química, histológica e viabilidade de bactérias lácticas em iogurtes com frutas. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 304-309, set-dez. 2001.

RYBKA, S.; KAILASAPATHI, K. The survival of culture bactéria in fresh and freeze-dried AB cultures. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 50, n. 1, p. 51-57, 1995.

SAAVEDRA, J.M.; BAUMAN, N.A.; OUNG, I. **Feeding Bifidobacterium bifidum and Streptococcus thermophilus to infant in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus.** Lancet 344: 1046-9, 1994.

SALADO, G.A.; ANDRADE, M.O. Processamento e qualidade nutricional do iogurte. **Boletim Cultura**, v. 7, p. 1-35, 1989.

SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bactéria. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.8, p341-347, 1998.

SANTOS, A.; LADERO, M.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 558-567, 1998.

SCHERNER, M. **Estudos da influência de diferentes concentrações de extrato seco total sobre a fermentação do iogurte.** Monografia. 2004. 21-25.

SCHLIMME, E; BUCHHEIM, W. **La leche y sus componentes: Propiedades químicas y físicas.** Zaragoza: Acribia S.A., 2002. 121p.

SCRIBIAN, R. (Coord). **Biotecnologia.** São Paulo: Manole, 1985. 489p.

SGORBATI, B., BIAVATI, B. e PALENZONA, D. The genus Bifidobacterium. Em Wood, B.J. B. e Holzapfel, W.H. (eds), **The Lactic Acid Bactéria** Vol. 2. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**, capítulo 8, pp. 279-306, Blackie Academic, Londres, RU, 1995.

SHAH, N.P.; FEDORAK, R.N.; JELEN, P.J Food consistency effects of quarg in lactose malabsorption. **International Dairy Journal**, n. 2, p. 257-269, 1992.

SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V. BRITZ, M.; KYLE, W.S.A. Survival os Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium longum in commercial yoghurt during refrigerated storage. **International Dairy Journal**, v. 5, p. 515-521, 1995.

SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* ssp. In yogurt. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.7, p.349-356, 1997.

SHAHIDI, F.; FINLEY, J.W. Omega-3 fatty acids: chemistry, nutrition, and health effects, 1.ed., **American Chemical Society**, Washington, 2001.

SHIH, F.F., CHAMPAGNE, E.T., DAIGLE, K., ZARINS, Z. **Use of enzymes in the processing of protein products from rice bran and rice flour.** Nahrung, v.43, n.1, p.14-18, 1999.

SILVA, D.O.; CARDOSO, V.L. **Hidrólise da lactose do soro de queijo utilizando a enzima β -galactosidase.** 2007. Disponível em: <http://www.propp.ufu.br/revistaeletronica/edicao2004/exatas/hidrolise_da_lactose.PDF>. Acesso em: 30 de set. de 2008.

SILVA, S.V. da.; **Desenvolvimento de iogurte probiótico com prebiótico.** 2007. 107p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS.

SPSS for Windows Release 8.00, SPSS Inc, 22 dez. 1997.

SUENAGA, C.I. et al. **Intolerância à lactose.** UNIFESP: Escola Paulista de Medicina. 2003. Disponível em: <<http://www.virtual.epm.br/material/tis/currbio/trab2001/grupo1/intolerancia.htm>>. Acesso em: 04 mar. 2008.

SWAGERTY, D.L.; WALLING, A.D.; KLEIN, R.M. lactose intolerance. *American Family Physician*, v. 65, n. 9, p. 1845-1849, May 2002.

TAMIME, A.Y.; MARSHALL, V.M.E.; ROBINSON, R.K. Microbiological and technological aspects of milk fermented by Bifidobacteria. **Journal of Dairy Research**, London, v.62, p.151-187, 1995.

TAMIME, A.Y.; DEETH, H.C. Yogurt: technology and biochemistry. **Journal of Food Protection**, v. 43, n. 12, p. 939-977, 1980.

TAPIERO, H., NGUYEN, B., COUVREUR, P. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v.56, n.5, p.215-222, 2002.

TEIXEIRA, A.C.P.; MOURTHÉ, K.; ALEXANDRE, D.P.; SOUZA, M.R.; PENNA, C.F.A.M. Qualidade do iogurte comercializado em Belo Horizonte. **Leite e Derivados**. V. 1, n. 51, p. 32-39, 2000.

TÉO, C.R.P. A intolerância à lactose: uma breve revisão para o cuidado nutricional. **Arq. Cienc. Saúde Unipar**, v. 6, n. 3, p. 135-140, set./dez. 2002.

THAMER, K.G.; PENNA, A.L.B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26(3): 589-595, jul.-set., 2006.

TORRES, R.L., GONZÁLES, R.J., SÁNCHEZ, H.D., OSELLA, C.A., TORRES, M.A.G. Comportamiento de variedades de arroz en la elaboración de pan sin gluten. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.9, n.2, p.162-165, 1999.

TREVISAN, A.P. **Influência de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturas sobre a hidrólise da lactose em leite pasteurizado.** 2008. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria – RS.

TRONCO, V.M. **Manual para a inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2003. 192p.

TUOHY, K.M.; PROBERT, H.M.; SMEJKAL, C.W.; GIBSON, G.R. Using probiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today*, **Haywards Health**, v.8, n.15, p.692-700, 2003.

VALSECHI, O. **Tecnologia de produtos agrícolas de origem animal: o leite e seus derivados**. Araras – SP: UFSCar, Centro de Ciências Agrárias, 2001. 36p. Apostila digitada.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. editors. *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods*. 3 ed. Washington: Edwards Brothers, Ann Arbor, 1992.

VEDAMUTHU, E.R. The yogurt story – past, present and future. Part. VI. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.11, n.9, p.513-514, 1991.

VINDEROLA C.G.; REINHEIMER, J.A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yogurt bacteria. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 8, p. 497-505. 1999.

VINDEROLA, C.G.; BAILO, N.; REINHEIMER, J.A. Survival of probiotic microflora in Argentinean yogurts during refrigerated storage. **Food Research International**, v. 33, p. 97-102, 2000.

VISEITANER, J.V.; GOMES, S.T.M.; HAYASHI, C.; SANTOS-JUNIOR, O.O.; SILVA, A.B.M.; JUSTI, K.C.; SOUZA, N.E.; MATSUSHITA, M. Efeito do tempo de fornecimento de ração suplementada com óleo de linhaça sobre a composição físico-química e de ácidos graxos em cabeças de tilápias do Nilo. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 23(3), 478-484, 2003.

VOSNIAKOS, F. et.al. Effect of 1311 on lactic acid microflora of yogurt. **Dairy Food and Environmental Sanitation**, v.8, n.11, p.433-435, 1991.

WAITZBERG, D.L., BORGES, V.C. Gorduras. In: **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 3^a ed. São Paulo: Atheneu, p.59-64, 2002.

WANG, L.Z.; WHITE, P.J. Structure and properties of amylose, amylopectin and intermediate materials of oat starches. **Cereal Chem.**, v.71, n.1, p. 263-271, 1994.

WOLFSCHOON-POMBO, A.F.; GRANZINOLLI, G.G.M.; FERNANDES, R.M. Sólidos totais do leite, acidez, pH e viscosidade do iogurte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.227, n. 37, p. 19-24, 1983.

YABU, M.C.; SCHOLZ, M.B.S.; RAPACCI, M.; ANTUNES, L.A.F. Características físico-químicas e sensoriais de iogurte produzido de misturas de leite bovino e bubalino. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 43, n. 258, p. 35-37, 1988.

ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial e de pós-acidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 24, p. 674-679, out/dez. 2004.

ZIEMER, C.J.; GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and symbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. Int. **Dairy J.**, **Amsterdam**, v.8, p.473-479, 1998.

8 APÊNDICES

8.1 Apêndice 1

REVISTA ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

Informações gerais e escopo

A revista ALIMENTOS E NUTRIÇÃO/BRAZILIAN JOURNAL OF FOOD AND NUTRITION é um periódico trimestral, especializado e arbitrado, aberto à comunidade científica nacional e internacional, que publica artigos originais, notas prévias e trabalhos de revisão relativos às áreas de Alimentos (ciência e tecnologia) e Nutrição. Os manuscritos podem ser encaminhados em português, inglês ou espanhol e serão aceitos mediante aprovação de revisores. Os trabalhos de revisão devem representar uma análise crítica de assunto atual e relevante baseando-se, inclusive, em artigos do(s) próprio(s) autor(e)s e estarão condicionados à disponibilidade de publicação considerando que em cada fascículo são publicados, no máximo, dois trabalhos dessa natureza.

É vedada a reprodução dos trabalhos em outras publicações ou sua tradução para outro idioma sem a autorização da Comissão Editorial. Os originais deverão ser acompanhados de documento de transferência de direitos autorais, contendo a assinatura do(s) autor(es) e, também, de documento contendo os dados completos dos autores (nome, endereço, telefone, e-mail, área de atuação, titulação atual, local de trabalho, cargo ocupado). Lembrando que, toda mudança de endereço deverá ser comunicada imediatamente à revista.

Preparação dos originais

Apresentação.

Os trabalhos devem ser digitados em uma só face, fonte Times New Roman 12, em folha de papel branco, formato A4 (210x297mm), mantendo margens laterais de 3 cm e espaço duplo em todo o texto, empregando editor de texto MS Word versão 6.0 ou superior. Todas as páginas devem ser numeradas a partir da página de identificação. Cada trabalho deverá ser enviado, via correio, em **1 via impressa e uma em disquete ou CD**, ou em uma cópia eletrônica via e-mail.

Estrutura do trabalho.

Os trabalhos devem obedecer à seguinte seqüência: Título; Autor(es) (por extenso e apenas o sobrenome em maiúsculo); Filiação científica do(s) autor(es) (indicar em nota de rodapé: Departamento, Instituto ou Faculdade, Universidade-sigla, CEP, Cidade, Estado, País); Resumo (escrito no idioma do artigo, com máximo de 200 palavras); Palavras-chave (com até 7 palavras retiradas de **Thesaurus da área**, quando houver); Texto (INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODO(S), RESULTADO(S), DISCUSSÃO, CONCLUSÃO); Agradecimentos; Abstract (precedido da Referência Bibliográfica do próprio artigo, sendo o título em inglês) e Keywords; Referências bibliográficas (trabalhos citados no texto). Obs. Trabalhos escritos em inglês deverão ser acompanhados de resumo e palavras-chave em português, também precedidos da referência bibliográfica do próprio artigo e com o título em português, apresentados após os agradecimentos.

Referências bibliográficas.

Devem ser dispostas em ordem alfabética pelo sobrenome do primeiro autor e numeradas consecutivamente; seguir a **NBR 6023** (agosto 2002) da ABNT. **Os autores são responsáveis pela exatidão das referências bibliográficas.**

- Livros e outras monografias (até 3 autores colocar todos os nomes separados por “;”, quando tiver mais que 3 colocar o nome do 1º e usar et al.)
CERVO, A. L.; BERVIAN, P. A.; SILVA, A. S. **Metodologia científica**: para uso dos estudantes universitários. 2.ed. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1978. 144p.

- Capítulos de livros
BENAVIDES, H. et al. An exceptional bloom of *Alexandrium catenella* in the Beagle Channel, Argentina. In: LASSUS, P. et al. (Ed.) **Harmful marine algal blooms**. 2nd ed. Paris: Lavoisier tercept, 1995. p.113-119.

- Entidades
ASSOCIATION OF ANALYTICAL COMMUNITIES. **Official metohods of analysis**: method 959.08 paralytic shellfish poison – biological method. Washington, DC, 2000. cap. 49, p.49-51.

- Meio eletrônico
CERVO, A. L.; BERVIAN, P. A.; SILVA, A. S. **Metodologia científica**: para uso dos estudantes universitários. 2.ed. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1978. Disponível em: <http://www.cerbrasil.com.br>. Acesso em: 22 ago. 2007.

- Dissertações e teses
VEIGA NETO, E. R. **Aspectos anatômicos da glândula lacrimal e de sua inervação no macaco-prego (*Cebus apella*), (Linnaeus, 1758)**. 1988. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1988.

- Artigos de periódicos

Abreviaturas.

Os títulos de periódicos deverão ser abreviados conforme o Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Index Medicus, Current Contents. DELGADO, M.C. Potassium in hypertension. **Curr. Hypertens. Rep.**, v.6, p.31-35, 2004.

- Trabalho de congresso ou similar (publicado)
TRAINA JÚNIOR, C. GEO: um sistema de gerenciamento de base de dados orientado a objeto: estado atual de desenvolvimento e implementação. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BANCOS DE DADOS, 6, 1991, Manaus. **Anais...** Manaus: Imprensa Universitária da FUA, 1991. p.193-207.

- Legislação
BRASIL. Medida provisória nº 1.569-9, de 11 de dezembro de 1997. Estabelece multa em operações de importação, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 dez. 1997. Secção 1, p. 29514.

Citação no texto.

Utilizar sistema numérico. A citação de um autor no texto (quando necessária) deverá ser pelo sobrenome e o número da referência sobrescrito. Ex: ...entendido por Silva.³ No caso de dois autores, os sobrenomes devem ser separados por &. Ex: ... entendido por Silva & Rocha.³ Mais de dois autores, indicar apenas o sobrenome do primeiro seguido de et al. Ex: ...entendido por Silva et al.,³, ou ainda, apenas pelo número de referência sobrescrito. Ex: ...entendido pelos autores.^{2,3,4}

Notas

Devem ser reduzidas ao mínimo e colocadas no pé de página. As remissões para o rodapé devem ser feitas por asteriscos, na entrelinha superior.

Anexos e/ou Apêndices

Serão incluídos somente quando imprescindíveis à compreensão do texto.

Tabelas

Devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçadas pelo título.

Figuras

Desenhos, gráficos, mapas, esquemas, fórmulas, modelos (em papel vegetal e tinta nanquim, ou computador); fotografias (em papel brilhante); radiografias e cromos (em forma de fotografia). As figuras e suas legendas devem ser claramente legíveis após sua redução no texto impresso de 10x17 cm. Devem-se indicar, a lápis, no verso: autor, título abreviado e sentido da figura. Legenda das ilustrações nos locais em que aparecerão as figuras, numeradas consecutivamente em algarismos arábicos e iniciadas pelo termo FIGURA.

Unidades de medida e símbolos

Devem restringir-se apenas àqueles usados convencionalmente ou sancionados pelo uso. Unidades não-usuais devem ser claramente definidas no texto. Nomes comerciais de drogas citados entre parênteses, utilizando-se no texto o nome genérico das mesmas. Fórmulas e equações escritas em linha, por exemplo,

$$\frac{a}{b}, \text{ escreva } a/b, \sqrt{ex}, \text{ escreva } ex/2.$$

Os dados e conceitos emitidos nos trabalhos, bem como a exatidão das referências bibliográficas, são de inteira responsabilidade dos autores. Os trabalhos que não se enquadrarem nessas normas serão devolvidos aos autores, ou serão solicitadas adaptações, indicadas em carta pessoal.

ENVIO DOS TRABALHOS

Correspondência e artigos para publicação, deverão ser encaminhados à:
ALIMENTOS E NUTRIÇÃO (revista) Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP
Rodovia Araraquara-Jaú, km 1
Caixa Postal 502
14801-902 Araraquara - SP - Brasil
Fax: (0XX16)3332-1576
E-mail: revistas@fctfar.unesp.br

8.2 Apêndice 2

Tabelas com os valores de pH e acidez expressa em ácido láctico para os tratamentos durante o armazenamento de 28 dias.

Tabela 1 – Valores de acidez (% de ácido láctico) para os tratamentos durante armazenamento

<i>Tratamento</i>	<i>1ºdia</i>	<i>7ºdia</i>	<i>14ºdia</i>	<i>21ºdia</i>	<i>28ºdia</i>
T1	0,74 ^{Ce}	0,82 ^{Ad}	0,84 ^{Bc}	0,89 ^{Ab}	0,94 ^{Aa}
T2	0,75 ^{BCd}	0,79 ^{BCc}	0,81 ^{Cbc}	0,83 ^{Cb}	0,89 ^{Ca}
T3	0,77 ^{ABd}	0,82 ^{Ac}	0,83 ^{BCc}	0,86 ^{Bb}	0,91 ^{BCa}
T4	0,71 ^{Dd}	0,77 ^{Cc}	0,78 ^{Dc}	0,81 ^{Cb}	0,85 ^{Da}
T5	0,75 ^{BCd}	0,79 ^{BCc}	0,89 ^{Ab}	0,90 ^{Ab}	0,93 ^{Aba}
T6	0,78 ^{Ac}	0,80 ^{ABc}	0,84 ^{Bb}	0,89 ^{Aa}	0,92 ^{Aba}
T7	0,78 ^{Aa}	0,82 ^{Aa}	0,85 ^{Ba}	0,90 ^{Aa}	0,94 ^{Aa}

Valores com letras iguais (minúsculas) na mesma linha não diferiram estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância.

Valores com letras iguais (maiúsculas) na mesma coluna não diferiram estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância.

Tabela 2 – Valores de pH para os tratamentos durante armazenamento

<i>Tratamento</i>	<i>Semana 1</i>	<i>Semana 2</i>	<i>Semana 3</i>	<i>Semana 4</i>	<i>Semana 5</i>
T1	4,43 ^{Ca}	4,38 ^{Ab}	4,34 ^{BCc}	4,27 ^{Cd}	4,29 ^{Fd}
T2	4,42 ^{Ca}	4,38 ^{Aab}	4,35 ^{Bb}	4,38 ^{Ab}	4,39 ^{Bab}
T3	4,46 ^{Ba}	4,35 ^{Bb}	4,34 ^{BCb}	4,33 ^{Bb}	4,35 ^{Cb}
T4	4,49 ^{Aa}	4,40 ^{Ac}	4,38 ^{Ac}	4,38 ^{Ac}	4,44 ^{Ab}
T5	4,37 ^{DEa}	4,25 ^{Cc}	4,33 ^{BCb}	4,27 ^{Cc}	4,32 ^{DEb}
T6	4,38 ^{Da}	4,26 ^{Cc}	4,32 ^{CDb}	4,26 ^{CDc}	4,33 ^{CDb}
T7	4,35 ^{Ea}	4,24 ^{Cc}	4,30 ^{Db}	4,24 ^{Dc}	4,30 ^{EFb}

Valores com letras iguais (minúsculas) na mesma linha não diferiram estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância.

Valores com letras iguais (maiúsculas) na mesma coluna não diferiram estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância.

8.3 Apêndice 3

Gráficos apresentando as contagens de bactérias lácticas e bífidas nos tratamentos durante os 28 dias de armazenamento (\log_{10} UFC/mL).

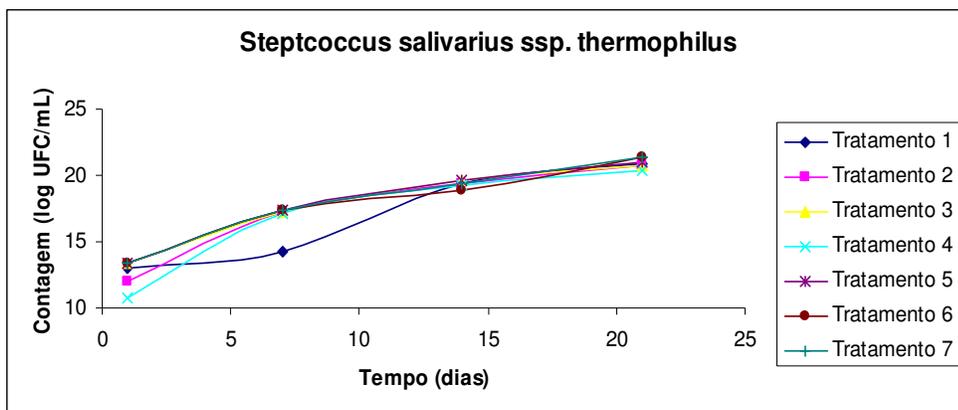


Figura 1 - Efeito do tempo de estocagem na manutenção do número de células viáveis de *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* nos diferentes tratamentos.

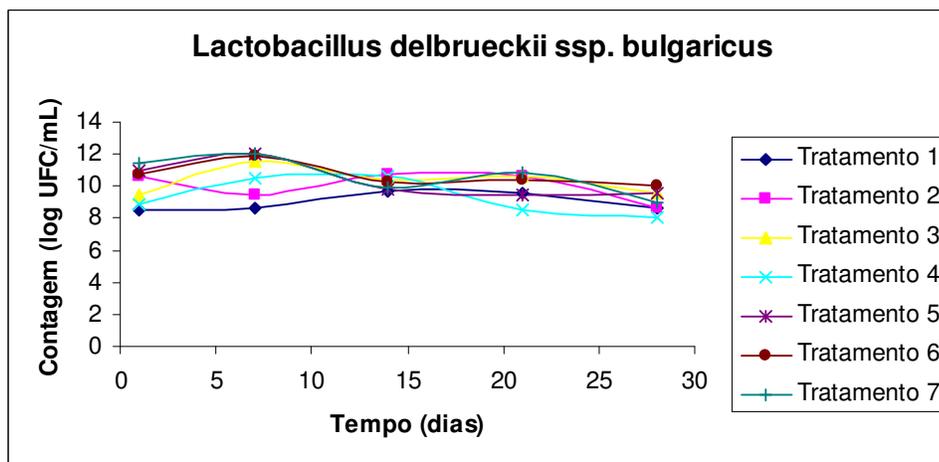


Figura 2 - Efeito do tempo de estocagem na manutenção do número de células viáveis de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* nos diferentes tratamentos.

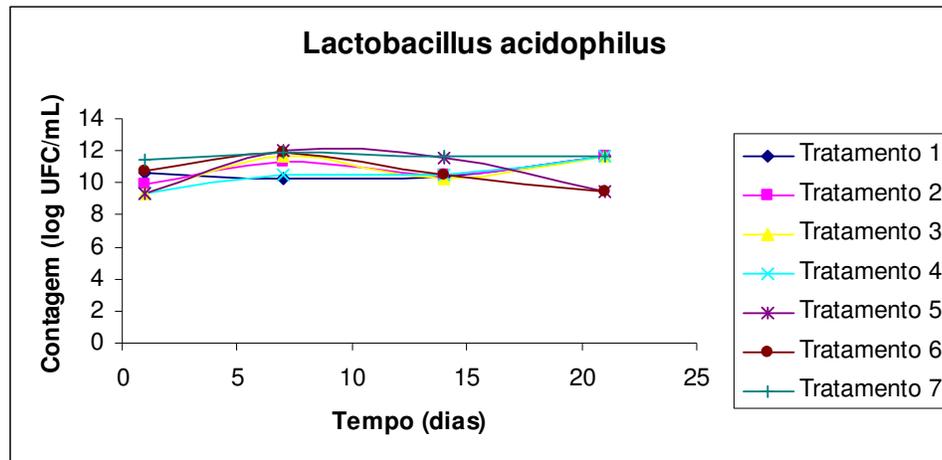


Figura 3 - Efeito do tempo de estocagem na manutenção do número de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* nos diferentes tratamentos.

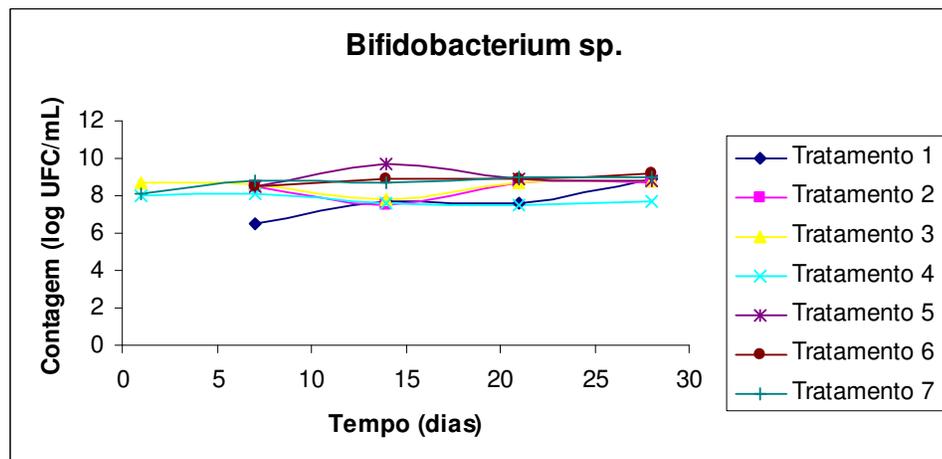


Figura 4 - Efeito do tempo de estocagem na manutenção do número de células viáveis de *Bifidobacterium sp.* nos diferentes tratamentos.

Gráfico com os teores de lactose (expresso em porcentagem) dos diferentes tratamentos durante os 28 dias de armazenamento.

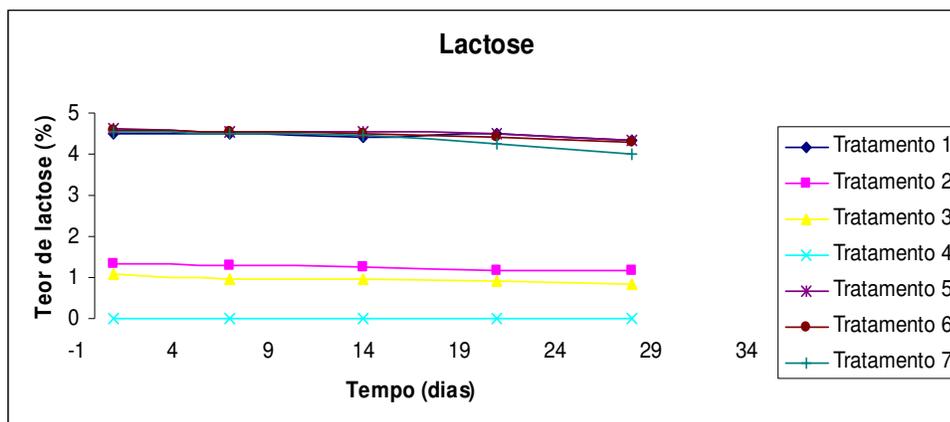


Figura 5 - Teores de lactose nos diferentes tratamentos durante armazenamento.

8.4 Apêndice 4

Tabela com a composição físico-química da farinha de arroz utilizada como ingrediente na fabricação dos iogurtes.

Tabela 1 – Composição físico-química da farinha de arroz

<i>Composição</i>	<i>Teor</i>
Umidade (g%)	11,70
Cinzas (g%)	0,42
Acidez (mL sol. N%)	0,65
Proteína Bruta (g%)	8,00
Lipídios (g%)	0,72
Carboidratos (g%)	78,56
Atividade de água a 17,7°C	0,478