

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

**DESENVOLVIMENTO DE IOGURTE PROBIÓTICO
COM PREBIÓTICO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Sabrina Vieira da Silva

Santa Maria, RS, Brasil

2007

DESENVOLVIMENTO DE IOGURTE PROBIÓTICO COM PREBIÓTICO

Por

Sabrina Vieira da Silva

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

Co-orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Leadir Lucy Martins Fries

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**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

DESENVOLVIMENTO DE IOGURTE PROBIÓTICO COM PREBIÓTICO

elaborada por
Sabrina Vieira da Silva

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. Dr. Ernesto Hashime Kubota (UFSM)

Prof^a. Dr^a. Claire Tondo Vendruscolo (UFPEl)

Santa Maria, 14 de março de 2007

*Dedico este trabalho à minha família,
em especial aos meus pais,
Fábio e Terezinha Beatriz,
pelo apoio, confiança, sacrifício e exemplo
de trabalho, humildade e honestidade.*

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria pela possibilidade de execução deste trabalho, meus agradecimentos.

À **Prof^a. Dr^a. Neila Silvia Pereira dos Santos Richards**, pelo exemplo profissional, apoio, confiança, formação e pelas oportunidades de crescimento profissional e pessoal, além da orientação e amizade.

Ao **Prof. Dr. Ernesto Hashime Kubota** e **Prof^a. Dr^a. Claire Tondo Vendruscolo** pela participação como banca examinadora e, também, pelo importante apoio e contribuição durante a execução do trabalho.

Às pesquisadoras **Caroline Dellinghausen Borges** e **Raquel Guttierres Gomes** na contribuição em algumas análises do trabalho.

Às minhas colegas de pesquisa **Andréia Ciolini, Cristina Moraes Bortolotti, Fabiane Fagundes Dalla Corte, Fernanda Ortolan e Larissa Vargas Becker** pela amizade e valiosas contribuições durante a elaboração deste trabalho.

Aos funcionários e colegas do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, especialmente, **Liana Inês Guidolin Milani** responsável técnica do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos.

Às amigas e colegas do Hospital Universitário de Santa Maria – HUSM, pela amizade, incentivo e companheirismo demonstrados.

Ao **Juliano Smanioto Barin**, pela ajuda, companheirismo, cumplicidade, amor e incentivo.

RESUMO

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

DESENVOLVIMENTO DE IOGURTE PROBIÓTICO COM PREBIÓTICO

Autora: Sabrina Vieira da Silva
Orientador (a): Professora Dr^a. Neila Silvia Pereira dos Santos Richards
Co-orientador (a): Professora Dr^a. Leadir Lucy Martins Fries
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 14 de março, 2007.

O interesse por produtos alimentícios saudáveis, nutritivos e de grande aproveitamento tem aumentado mundialmente, o que resulta em diversos estudos na área de produtos lácteos. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de iogurtes com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas (0,5%, 1,0% e 1,5%). O processo de fermentação foi acompanhado através dos valores de pH e acidez expressa em ácido láctico. Foram realizadas análises físico-químicas (valor de pH, acidez expressa em ácido láctico, teor de lactose, teor de umidade, teor de cinzas, teor de extrato seco total e desengordurado, teor de proteína, teor de gordura), cor (Sistema CIELAB) e viscosidade aparente após a fermentação e durante o armazenamento do produto. Determinou-se a viabilidade das bactérias lácticas tradicionais (*Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) e probióticas (*Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* sp.) durante os 28 dias de armazenamento. Testes sensoriais de aceitação e preferência foram realizados com adultos e crianças. Os dados obtidos neste estudo foram submetidos a análises estatísticas (valores médios com os respectivos desvios padrão, análise de variância (ANOVA) por Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) e por Delineamento em Blocos Casualizados (DBC) e teste de Tukey). Os resultados mostraram que diferentes concentrações de culturas lácticas influenciaram o tempo de fermentação. Não houve diferenças significativas entre as amostras em relação as características físico-químicas. Observou-se que houve um decréscimo do valor de pH e do teor de lactose e um aumento na acidez expressa em ácido láctico proporcional ao aumento da concentração de culturas lácticas. Durante o tempo de estocagem notou-se um decréscimo significativo no número de células viáveis de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* e de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* sp.. A análise sensorial mostrou que de uma maneira geral o iogurte com 1,0% de culturas lácticas apresentou as melhores notas em relação aos atributos avaliados. Os resultados obtidos demonstram o grande potencial para a produção de iogurtes utilizando culturas lácticas probióticas.

Palavras-chave: iogurte, probiótico, prebiótico, armazenamento.

ABSTRACT

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

DEVELOPMENT OF PROBIOTIC YOGURTS WITH PREBIOTIC

Author: Sabrina Vieira da Silva
Supervisor: Professor Doctor Neila Silvia Pereira dos Santos Richards
Co-supervisor: Professor Doctor Leadir Lucy Martins Fries
Place and Date of Defense: Santa Maria, March 14th, 2007.

The interest for healthy, nutritive and well enjoyed food has increased worldwide and results in several studies in the area of dairy products. This paper aimed the development of yogurts with different concentrations of traditional and probiotic dairy cultures (0.5%, 1.0% and 1.5%). The process of fermentation was followed through the values of pH and acidity expressed in lactic acid. Physical and chemical analysis were carried out (pH value, acidity expressed in lactic acid, lactose proportion, umidity proportion, ash proportion, total dry and not greased extract proportion, protein proportion, fat proportion), color (CIELAB Sistem) and aparent viscosity after the fermentation and during the storage of the product. It was determined the viability of the traditional lactic bacteria (*Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) and the probiotic ones (*Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* sp.) during the twenty-eight (28) days of storage. Sensorial tests of acceptance and preference were taken with adults and children. The collected data in this study were subjected to statistical analysis (average values with the respective standard deviations, analysis, variation analysis (ANOVA) by the Entirely Casual Delineation (ECD) and by Block Casual Delineation (BCD) and by Tukey's test). The results showed that different concentrations of lactic cultures influenced the fermentation time. There were not significant differences among the samples in relation with the physical and chemical characteristics. It was observed that there was a decrease of the pH value and the lactose proportion and an increase in the acidity expressed in lactic acid proportional to the increase in the concentration of lactic cultures. During the storage time it was noticed a significant decrease in the number of feasible cells of *S. termophilus* and *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* sp.. The sensorial analysis that, generally, the yogurt with 1.0% of lactic cultures presentes the best grades concerning to evaluated attributes. The obtained results show the great potential for the production of yogurts using the probiotic lactic cultures.

Keywords: yogurt, probiotic, prebiotic, storage.

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice I - Determinação do valor de pH e da acidez expressa em ácido láctico durante o processo de fermentação	98
Apêndice II - Caracterização físico-química dos iogurtes	99
Apêndice III - Determinação do valor de pH, da acidez expressa em ácido láctico e do teor de lactose durante o período de armazenamento sob refrigeração	100
Apêndice IV - Contagem de bactérias lácticas nos iogurtes	102
Apêndice V - Determinação da viscosidade dos iogurtes	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da inulina	36
Figura 2 - Fluxograma do processo de desenvolvimento dos iogurtes produzidos com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas adicionados de caseinato de cálcio e inulina	44
Figura 3 - Adição das culturas lácticas tradicionais e probióticas no leite integral UHT previamente esterilizado – preparo da cultura	45
Figura 4 - Homogeneização da cultura	46
Figura 5 - Amostras de iogurte no banho termostaticado à 40°C	47
Figura 6 - Amostras de iogurtes (porções) no banho termostaticado à 40°C, para determinação do valor de pH e acidez durante o processo de fermentação	47
Figura 7 - Armazenamento das amostras de iogurtes sob refrigeração à 4°C	48
Figura 8 - Adição de corante nas amostras de iogurtes	49
Figura 9 - Adição de aroma nas amostras de iogurtes	49
Figura 10 - Envase dos iogurtes em frascos de polietileno de 200 mL	50
Figura 11 - Iogurtes em frascos de polietileno de 200 mL	50
Figura 12 - Iogurtes em frascos de polietileno de 1 L	51
Figura 13 - Colônias de <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> desenvolvidas em meio de cultura M 17, após 48 horas de incubação	53
Figura 14 - Colônias de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> desenvolvidas em meio de cultura MRS – ágar glicose acidificado, após 72 horas de incubação	54

Figura 15 - Colônias de <i>Lactobacillus acidophilus</i> desenvolvidas em meio de cultura MRS – maltose, após 72 horas de incubação	54
Figura 16 - Colônias de <i>Bifidobacterium</i> sp. desenvolvidas em meio de cultura MRS – glicose com as soluções A, B e C, após 72 horas de incubação	55
Figura 17 - Ficha utilizada para avaliação de aceitabilidade dos iogurtes com diferentes concentrações de culturas lácticas	57
Figura 18 - Ficha utilizada para avaliação de aceitabilidade dos iogurtes com diferentes concentrações de culturas lácticas, teste aplicado com julgadores infantis	58
Figura 19 - Valores médios de pH durante o processo de fermentação dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas	60
Figura 20 - Valores médios de acidez expressa em ácido láctico durante o processo de fermentação dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas	60
Figura 21 - Valores médios de pH durante o tempo de estocagem dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas	65
Figura 22 - Valores médios de acidez durante o tempo de estocagem dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas	66
Figura 23 - Valores médios do teor de lactose durante o tempo de estocagem dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas	67
Figura 24 - Viscosidade a 10°C de iogurtes adicionados de diferentes concentrações de culturas tradicionais e probióticas e de amostras comerciais de iogurtes probióticos (líquido e tradicional)	76
Figura 25 - Valores médios dos atributos cor, aroma, sabor, acidez, corpo e aparência global dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas	79

Figura 26 - Respostas dos provadores em relação ao Teste de Ordenação de preferência do iogurte elaborado com 0,5% de culturas lácticas tradicionais e probióticas	81
Figura 27 - Respostas dos provadores em relação ao Teste de Ordenação de preferência do iogurte elaborado com 1,0% de culturas lácticas tradicionais e probióticas	81
Figura 28 - Respostas dos provadores em relação ao Teste de Ordenação de preferência do iogurte elaborado com 1,5% de culturas lácticas tradicionais e probióticas	82
Figura 29 - Respostas dos provadores em relação a freqüência do consumo de iogurte	83
Figura 30 - Respostas dos provadores em relação a intenção de compra do iogurte elaborado com 1,0% de culturas lácticas tradicionais e probióticas desenvolvido no estudo	83
Figura 31 - Determinação do teor de umidade (A), cinzas (B), extrato seco total (C), extrato seco desengordurado (D), proteína (E) e gordura (F)	99
Figura 32 - Efeito do tempo de estocagem na manutenção do número de células viáveis de <i>S. thermophilus</i> nos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas	102
Figura 33 - Efeito do tempo de estocagem na manutenção do número de células viáveis de <i>L. bulgaricus</i> nos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas	103
Figura 34 - Efeito do tempo de estocagem na manutenção do número de células viáveis de <i>L. acidophilus</i> nos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas	104
Figura 35 - Efeito do tempo de estocagem na manutenção do número de células viáveis de <i>Bifidobacterium</i> sp. nos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de microrganismos comumente descritos como possuidores de características probióticas	33
Tabela 2 - Ocorrência natural de frutooligossacarídeos (FOS) em alimentos	35
Tabela 3 - Caracterização físico-química dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas	62
Tabela 4 - Contagem média do número de células viáveis de <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas durante o tempo de estocagem (UFC/mL)	68
Tabela 5 - Contagem média do número de células viáveis de <i>Lactobacillus delbruecki</i> ssp. <i>bulgaricus</i> dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas durante o tempo de estocagem (UFC/mL)	69
Tabela 6 - Contagem média do número de células viáveis de <i>Lactobacillus acidophilus</i> dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas durante o tempo de estocagem (UFC/mL)	71
Tabela 7 - Contagem média do número de células viáveis de <i>Bifidobacterium</i> sp. dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas durante o tempo de estocagem (UFC/mL)	72

Tabela 8 - Parâmetros de cor: luminosidade (L*) e coordenadas de cromaticidade (a* e b*) dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas	77
Tabela 9 - Valores médios de pH durante o processo de fermentação dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas	98
Tabela 10 - Valores médios de acidez (% de ácido láctico) durante o processo de fermentação dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas	98
Tabela 11 - Valores médios de pH durante o tempo de estocagem dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas	100
Tabela 12 - Valores médios de acidez (% ácido láctico) durante o tempo de estocagem dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas	100
Tabela 13 - Valores médios do teor de lactose (%) durante o tempo de estocagem dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas	101
Tabela 14 - Contagem média do número de células viáveis de <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas durante o tempo de estocagem (log ₁₀ UFC/ mL)	102
Tabela 15 - Contagem média do número de células viáveis de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas durante o tempo de estocagem (log ₁₀ UFC/ mL)	103
Tabela 16 - Contagem média do número de células viáveis de <i>Lactobacillus acidophilus</i> dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas durante o tempo de estocagem (log ₁₀ UFC/ mL)	104
Tabela 17 - Contagem média do número de células viáveis de <i>Bifidobacterium</i> sp. dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas durante o tempo de estocagem (log ₁₀ UFC/ mL)	105

TABELA 18 - Determinação da viscosidade aparente em iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas e de amostras comerciais de iogurtes probióticos (líquido e tradicional)	106
--	-----

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE APÊNDICES	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	11
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Objetivos	18
1.1.1 Objetivo geral	18
1.1.2 Objetivos específicos	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Iogurte	20
2.1.1 Introdução	20
2.1.2 Etapas do processo tradicional de fabricação do iogurte	23
2.1.2.1 Preparo da matéria-prima	23
2.1.2.2 Tratamento térmico da matéria-prima	23
2.1.2.3 Abaixamento da temperatura	24
2.1.2.4 Inoculação do fermento	24
2.1.2.5 Resfriamento	24
2.1.2.6 Envase e armazenamento	25
2.1.3 Processo de fermentação	26
2.1.3.1 Tipos de culturas utilizadas no processo de fermentação	27

2.1.3.1.1 Cultura tradicional	27
2.1.3.1.2 Cultura probiótica	28
2.1.4 Pós-acidificação	30
2.2 Probióticos	31
2.3 Prebióticos	34
2.3.1 Inulina	35
2.4 Simbióticos	37
2.5 Efeitos fisiológicos dos probióticos e prebióticos	38
2.5.1 Alívio da intolerância à lactose	39
2.6 Caseinato de cálcio	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 Material	42
3.1.1 Matéria-prima	42
3.1.2 Culturas lácticas	43
3.2 Métodos	43
3.2.1 Processo de fabricação dos iogurtes	43
3.2.1.1 Primeira etapa – Elaboração da formulação inicial	45
3.2.1.2 Segunda etapa – Preparo da cultura	45
3.2.1.3 Terceira etapa – Fermentação	46
3.2.1.4 Quarta etapa – Armazenamento das amostras sob refrigeração	48
3.2.1.5 Quinta etapa – Adição de aroma e corante nas amostras de iogurtes	48
3.2.1.6 Sexta etapa – Distribuição dos iogurtes em frascos de polietileno	49
3.2.2 Caracterização físico-química dos iogurtes	51
3.2.3 Vida-de-prateleira dos iogurtes – Pós-acidificação	52
3.2.4 Contagem de microrganismos tradicionais e probióticos	52
3.2.4.1 Contagem de <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	53
3.2.4.2 Contagem de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i>	53
3.2.4.3 Contagem de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	54
3.2.4.4 Contagem de <i>Bifidobacterium</i> sp.	55
3.2.5 Determinação da viscosidade	55

3.2.6 Determinação da cor	56
3.2.7 Análise sensorial	56
3.2.8 Análise estatística	58
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1 Curvas de pH e acidez expressa em ácido láctico durante o processo de fermentação	59
4.2 Caracterização físico-química dos iogurtes	62
4.3 Valores de pH, acidez expressa em ácido láctico e do teor de lactose durante o período de armazenamento sob refrigeração (pós-acidificação)	64
4.4 Contagem das bactérias lácticas durante o tempo de estocagem	68
4.4.1 Contagem de bactérias tradicionais <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> e <i>Lactobacillus delbruecki</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	68
4.4.2 Contagem de bactérias probióticas <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium</i> sp.	71
4.5 Determinação da viscosidade	75
4.6 Determinação da cor dos iogurtes	77
4.7 Análise sensorial dos iogurtes	79
4.7.1 Teste de preferência	81
4.7.2 Avaliação do consumo de iogurtes e intenção de compra	82
4.7.3 Teste de aceitação – Crianças	83
5 CONCLUSÃO	85
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
7 APÊNDICES	97

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a preocupação crescente com a saúde e com a qualidade de vida, levou as pessoas a se preocuparem em fazer exercícios físicos, ingerir alimentos saudáveis, diminuir o consumo de alimentos ricos em açúcar, sal e gordura. Além disso, houve um aumento na procura por alimentos com alguma propriedade funcional. As mudanças nos hábitos alimentares e no estilo de vida são principalmente em função da busca incessante por saúde, proporcionando melhor qualidade de vida e prevenindo o aparecimento de determinadas doenças.

A ciência de alimentos, anteriormente, preocupava-se em desenvolver alimentos para a sobrevivência humana, objetivo que foi substituído pelo conceito de produzi-lo com qualidade. Mais recentemente, a idéia passou a ser usá-los como veículos de promoção de bem-estar e saúde, ao mesmo tempo reduzindo o risco de doenças (MATSUBARA, 2001).

Não há dúvidas que os laticínios são alimentos funcionais. Eles são uma das melhores fontes de cálcio, um nutriente essencial que pode prevenir a osteoporose e possivelmente câncer de cólon. Entretanto, além do cálcio, pesquisas recentes têm focalizado especialmente outros componentes dos laticínios, conhecidos como probióticos. Além dos probióticos, atualmente existe um interesse crescente também nos chamados prebióticos.

Inicialmente, o consumo de iogurte foi bastante limitado, restringindo-se apenas a certos grupos étnicos. Em meados de 1960, a adição de frutas ao produto com o objetivo de atenuar o seu sabor ácido buscava uma maior aceitação popular e, ao mesmo tempo, uma maior divulgação era dada às suas qualidades nutritivas e terapêuticas, levando a um considerável aumento no seu consumo (MOREIRA *et alii*, 1999).

O consumo de leites fermentados por muito tempo, esteve baseado no iogurte tradicionalmente produzido com fermentos compostos de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, o futuro aponta para o uso de probióticos, associados ou não às bactérias tradicionais, quer como agentes “biotecnológicos”, que melhoram as características do produto tradicional, como reduzir a pós-acidificação do iogurte, fato evidenciado pela ação de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* sp. quer como “agentes terapêuticos”, ou seja, microrganismos que promovam efeitos benéficos nos indivíduos que os ingerem (ANTUNES, 2001).

Neste contexto, o desenvolvimento de iogurte, alimento carreador de microrganismos probióticos contendo células bacterianas benéficas, obtendo-se com isso, efeito terapêutico, adicionado de caseinato de cálcio que é uma das principais proteínas com funcionalidade tecnológica em alimentos e inulina – prebiótico que contribui para o aumento da viabilidade de microrganismos presentes no colón, sugerindo uma alternativa viável para as indústrias lácteas, uma vez que, o iogurte é provavelmente o leite fermentado mais popular do mundo.

1.1 Objetivos

O objetivo geral e os objetivos específicos do presente trabalho foram:

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver iogurtes probióticos com prebióticos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o tempo de fermentação dos iogurtes, que foi definido como o tempo necessário para os produtos atingirem aproximadamente o pH 4,8;
- Determinar as características físico-químicas, teor de umidade, teor de cinzas, teor de extrato seco total e extrato seco desengordurado, teor de proteína e teor de gordura;
- Acompanhar as alterações nas características de pós-acidificação – valores de pH, acidez expressa em ácido láctico e teor de lactose durante os 28 dias de estocagem refrigerada;
- Determinar a viabilidade das bactérias lácticas tradicionais (*Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) e probióticas (*Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* sp.) durante os 28 dias de armazenamento;
- Determinar a viscosidade aparente e parâmetros de cor L* (luminosidade), a* e b* (coordenadas de cromaticidade);
- Analisar sensorialmente os atributos cor, aroma, sabor, acidez, corpo, aparência global e preferência dos iogurtes pelos consumidores.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Iogurte

2.1.1 Introdução

A acidificação é um dos métodos mais antigos de preservação do leite. O leite fermentado surgiu na Mesopotâmia a cerca de 5000 a. C.. O iogurte é um alimento e bebida tradicional nos Bálcãs e na Ásia Mediterrânea e a palavra “iogurte” é derivada da palavra turca “jugurt”, sendo conhecida por uma variedade de nomes em diferentes países (TAMIME & DEETH, 1980).

No início do século XX, a teoria de Metchnikoff, denominada “Teoria da Longevidade”, atribuiu ao iogurte vários efeitos benéficos à saúde humana. Para Metchnikoff, a longevidade dos povos dos Bálcãs era resultado de uma dieta rica em leite fermentado, contendo um lactobacilo que por muito tempo foi considerado como *L. bulgaricus*. Posteriormente, verificou-se que o *L. acidophilus* deveria ser o microrganismo contido em tais produtos pela afinidade deste com o trato intestinal humano. Embora esta teoria tenha exagerado no valor do iogurte, influenciou de forma significativa na difusão em vários países da Europa (TAMIME & ROBINSON, 1999).

Leite fermentado é o processo resultante de fermentação láctica, adicionado ou não de frutas, açúcar e outros ingredientes que melhorem sua apresentação e modifiquem seu sabor. O leite fermentado mais importante economicamente é o iogurte, obtido da coagulação do leite pela ação de dois microrganismos, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp.

bulgaricus, e que fornece uma melhor assimilação, pelo organismo, de certos componentes, principalmente a lactose e proteínas (BRANDÃO, 1995).

O iogurte constitui uma rica fonte de proteínas, cálcio, fósforo, vitaminas e carboidratos. O consumo deste produto está relacionado à imagem positiva de alimento saudável e nutritivo, associado a suas propriedades sensoriais (TEIXEIRA *et alii*, 2000). Esse consumo também pode ser atribuído à preocupação crescente das pessoas em consumirem produtos naturais, e os benefícios que o iogurte traz ao organismo, tais como: facilitar a ação das proteínas e enzimas digestivas no organismo humano, facilitar a absorção de cálcio, fósforo e ferro, 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 alii*, 2001).

Além disso, devido à ação metabólica das bactérias sobre os componentes do leite, estes são transformados em substâncias mais simples, podendo ser consumidos por pessoas que, devido à deficiência da enzima lactase em seu organismo, não toleram a lactose presente no leite (SALADO & ANDRADE, 1989). Para Kleinmam (1990), é possível os indivíduos aumentarem sua tolerância a produtos lácteos por ingestão de produtos fermentados como o iogurte, devido ao fato do teor de lactose ser menor.

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 é atribuído à hidrólise intestinal, pela ação da β -galactosidase microbiana dos organismos presentes no iogurte, durante a passagem no trato gastrointestinal (LIN, SAVIANO & 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).

Existem hoje no mercado vários tipos de iogurte classificados de acordo com o processo de elaboração, adição de ingredientes, composição, consistência e textura. São eles (BRANDÃO, 1987; TAMIME & DEETH, 1980):

- **iogurte 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;

- **iogurte batido** (*stirred yogurt*): o processo de fermentação ocorre em fermentadeiras ou incubadoras com posterior quebra do coágulo;

- **iogurte líquido** (*fluid yogurt*): o processo de fermentação é realizado em tanques; é comercializado em embalagens plásticas tipo garrafa ou do tipo cartonadas.

As propriedades físicas do iogurte, como consistência/viscosidade do coágulo, são de grande importância, pois quanto maior o conteúdo em sólidos da mistura destinada à elaboração do iogurte, maior a consistência e viscosidade do produto final. A prática utilizada nas indústrias é a adição de leite em pó (integral, semi-desnatado ou desnatado), com o objetivo de alcançar a concentração de sólidos necessária para a melhor consistência do iogurte (TAMIME & ROBINSON, 1991).

Atualmente, a indústria de iogurte está mais centrada no iogurte batido, pois este permite aos produtores adicionar estabilizantes para prevenir a sinérese durante a vida de prateleira (LUCEY & SINGH, 1998).

O iogurte é um derivado do leite que apresenta uma das melhores margens de rentabilidade para o fabricante de produtos lácteos, devido ao fato de não passar por nenhum processo de concentração, ou seja, começa com um volume de matéria-prima e termina com o mesmo volume ou até um pouco mais, já que alguns ingredientes como polpas de frutas são acrescentados. Seu mercado, em suas diversas categorias, vem demonstrando grande potencial de crescimento nos últimos anos (SANTOS, 1998).

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).

2.1.2 Etapas do processo tradicional de fabricação do iogurte

A seguir uma descrição breve da elaboração do iogurte será apresentada, envolvendo aspectos que vão desde a matéria-prima até o produto final. Tal descrição está baseada nos trabalhos de Lobato (2000), Deeth & Tamime (1981), Brandão (1985) e Tamime & Robinson (1991).

2.1.2.1 Preparo da matéria-prima

O leite utilizado para fabricação de iogurte deve apresentar boa qualidade ser higienicamente produzido e manipulado, de composição físico-química normal, isento de antibióticos e preservativos e não deve ser utilizado congelado, a fim de evitar defeitos na textura do produto.

Para a fabricação de um produto mais consistente, deve-se aumentar a matéria seca do leite pela adição de 2 a 4% de leite em pó.

No caso de utilizar açúcar, este deve ser adicionado ao leite antes do aquecimento, normalmente de 8 a 12%.

2.1.2.2 Tratamento térmico da matéria prima

Esse tratamento tem como objetivo destruir os microrganismos patogênicos e outros que possam competir com as culturas do iogurte, além de promover a desnaturação das proteínas do soro que reduz a contração do coágulo da caseína do iogurte, diminuindo, conseqüentemente, a sinérese. O tratamento térmico estimula o início do crescimento da cultura láctica por redução do conteúdo de oxigênio do leite, além disso, influi sobre o aumento da viscosidade do iogurte e na obtenção de uma boa textura (VARNAN & SUTHERLAND, 1994).

No aquecimento devem ser rigorosamente observados a temperatura e o tempo em que o leite deve permanecer. As condições recomendadas são: 95°C por um minuto e meio; 90°C por três minutos e meio; 85°C por oito minutos e meio ou

80°C por 30 minutos. O aquecimento mais indicado é por meio de banho-maria ou tanques de parede dupla (encamisados).

2.1.2.3 Abaixamento da temperatura

Após aquecimento do leite, deve-se resfriá-lo à temperatura de 42 - 43°C. Isso pode ser feito pela substituição da água quente do banho-maria por água fria. Para não haver contaminação nessa fase, o recipiente do leite deve estar sempre fechado, sendo controlado por termopares.

2.1.2.4 Inoculação do fermento

Após o leite ser resfriado (42 - 43°C) adiciona-se de 1 a 2% de fermento láctico preparado previamente, para ativação das culturas. A cultura mãe deve ser homogeneizada, de forma que todos os grumos sejam quebrados. Após a adição de culturas no leite, o conjunto deve ser novamente homogeneizado por cerca de 2 minutos e o leite deve permanecer em completo repouso por aproximadamente quatro horas, a uma temperatura de 41 a 45°C. Ao final da fermentação, o coágulo deve apresentar pH entre 4,5 e 4,7 e uma concentração de ácido láctico de 0,9%; o gel deve ser liso, brilhante, sem desprendimento de soro ou gases.

A cultura láctica deve ser adicionada, somente em leite previamente esterilizado.

2.1.2.5 Resfriamento

O resfriamento é uma etapa crítica na produção de iogurte e é realizado logo após o produto ter atingido o grau de acidez desejado na fermentação. Como a elaboração do iogurte é um processo biológico, torna-se necessário o uso da refrigeração para reduzir a atividade metabólica da cultura, controlando deste modo a acidez do iogurte.

É recomendado que se faça em duas etapas, para evitar o choque térmico, que provoca um encolhimento da massa e danos ao coágulo, pois o resfriamento muito rápido pode provocar a separação de soro no iogurte (TAMIME & DEETH, 1980).

A primeira etapa consiste em abaixar a temperatura a 18 - 20°C em, no máximo, 30 minutos, o que pode ser feito com água à temperatura ambiente. No caso do iogurte batido, pode-se fazer, nessa temperatura, a adição de ingredientes tais como: frutas, corantes, cereais, mel, etc., que devem ser homogeneizados na massa.

Na segunda etapa, a redução da temperatura da massa deve atingir a temperatura de 10°C. O aparecimento do sabor característico do iogurte ocorre durante as 12 horas posteriores ao resfriamento, proporcionando as características finais de um bom iogurte.

O próximo passo será a quebra da coalhada com agitação, visando obter uma massa de textura homogênea. Segundo Rasic & Kurman (1978), a agitação deve ocorrer preferivelmente a temperaturas menores que 40°C para se obter um coágulo consistente durante o armazenamento. A agitação feita a altas temperaturas (exemplo: logo após o término da fermentação) resulta no aparecimento de partículas do coágulo e separação do soro devido à destruição irreversível da estrutura gel.

2.1.2.6 Envase e armazenamento

No caso do iogurte batido, a fermentação é feita em um tanque com posterior embalagem, no qual é envasado depois de resfriado e mantido sob refrigeração por um período superior a 24 horas antes de ser comercializado.

A embalagem deve seguir alguns critérios como: ser impermeável aos sabores, corantes, odores do ambiente, oxigênio e contaminações externas; resistir a acidez do iogurte, a umidade, golpes mecânicos a que o produto é sujeito durante o transporte e armazenamento e não permitir exposição do produto à luz. Uma boa

opção para produção em pequena escala é a embalagem de polietileno termoformada que apresenta também facilidade para o fechamento térmico.

A temperatura de armazenamento deve ser de 2 a 5°C para conservar e melhorar a consistência do iogurte, que deve ser consumido à temperatura de 10 a 12°C, na qual o sabor torna-se mais apreciável.

2.1.3 Processo de fermentação

Durante o processo de fermentação ocorre a produção de ácido láctico como produto principal e a produção de pequenas quantidades de outros subprodutos que influenciam profundamente nas características organolépticas do iogurte. O acetaldeído é produzido em maiores quantidades seguido por acetona, 2 - butanona, diacetil e acetoína. O ácido láctico resultante da fermentação contribui para a desestabilização da micela de caseína, provocando sua coagulação no ponto isoelétrico (pH 4,6 - 4,7) e conduzindo à formação de um gel, o iogurte. Além disso, a fermentação láctica beneficia o valor nutricional do produto final (RASIC & KURMAN, 1978; TAMIME & ROBINSON, 1991).

A etapa de fermentação pode ser realizada na própria embalagem de comercialização para a produção do iogurte firme ou em tanques para a produção do iogurte batido. No entanto, independente do tipo de iogurte a ser fabricado, as reações bioquímicas responsáveis pela formação do gel/coágulo são exatamente as mesmas. As únicas diferenças existentes entre o iogurte firme e o batido são as propriedades reológicas do coágulo (TAMIME & ROBINSON, 1991).

Para um bom desenvolvimento do processo de fermentação do leite, as culturas devem ser resistentes à degradação, apresentar um poder acidificante médio, capacidade de desenvolvimento em simbiose e de produzirem substâncias responsáveis pela viscosidade, sabor e aroma do iogurte (TAMIME & DEETH, 1980).

2.1.3.1 Tipos de culturas utilizadas no processo de fermentação

2.1.3.1.1 Cultura tradicional

As bactérias lácticas tradicionais na fabricação de iogurtes são *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* – cocos unidos, geralmente em cadeias curtas e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* – bastonetes unidos em cadeias longas - utilizam a lactose como substrato energético com liberação de ácido láctico. Ambos microrganismos são termofílicos e homofermentativos. O crescimento associado destas duas culturas resulta em menor tempo de coagulação do leite, maior produção de ácido láctico e um maior desenvolvimento de sabor e aroma no iogurte. *S. thermophilus* é muito menos acidificante que o *L. bulgaricus* (TAMIME & DEETH, 1980; SABOYA, OETTERER & OLIVEIRA, 1997).

A atividade proteolítica dos bacilos promove a liberação de pequenos peptídeos e aminoácidos, especialmente valina, que favorecem o crescimento dos cocos. Similarmente, o desenvolvimento dos cocos estimula o crescimento dos bacilos devido à produção de ácido fórmico, gás carbônico e a redução da quantidade de oxigênio disponível no meio (WALSTRA *et alii*, 2001; SHAH, 2001; TAMIME & DEETH, 1980).

De acordo com Tamime & Deeth (1980) e Tamime & Robinson (1999), a relação ótima entre cocos e bacilos para o desenvolvimento do sabor e aroma característicos do produto é dependente das propriedades das cepas utilizadas e é de aproximadamente 1:1. Este balanço adequado da cultura é importante para a obtenção de um iogurte com boas características organolépticas relativas ao sabor, aroma e textura.

A predominância de qualquer uma das espécies pode acarretar em defeitos para o produto final. Os principais fatores que podem afetar o balanço adequado entre os dois microrganismos são o tempo e a temperatura de incubação e a porcentagem de inóculo. Por exemplo, um tempo menor de incubação resultaria em um produto com maior proporção de cocos e com um sabor fraco. Por outro lado, um tempo maior de incubação ou um resfriamento inadequado favoreceria a

predominância de bacilos resultando num produto com sabor amargo (WALSTRA *et alii*, 1999).

A temperatura ótima de crescimento do *S. thermophilus* situa-se entre 40 - 45°C, atingindo um mínimo a 20°C e um máximo a 50°C. Para o *L. bulgaricus*, a temperatura ótima de crescimento situa-se entre 40 - 43°C, atingindo um mínimo a 22°C e um máximo a 52,5°C. Quando ocorre uma associação entre *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* a temperatura ótima de crescimento fica entre 40 - 45°C e a coagulação pode demorar mais que quatro horas, dependendo da porcentagem de inóculo adicionada. Após o iogurte ter atingido o pH desejável (geralmente pH 4,6), o gel é resfriado a temperatura menor que 10°C. O pH final da maioria dos iogurtes varia entre 4,6 - 4,0 (LUCEY & SINGH, 1998).

As bactérias tradicionais utilizadas na fermentação de iogurtes, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, não pertencem à flora intestinal, não são resistentes à bile e conseqüentemente não sobrevivem a passagem através do trato gastrointestinal, portanto não são consideradas como probióticas. No entanto, essas bactérias possuem efeitos positivos como ação inibidora contra bactérias patogênicas no trato gastrointestinal e melhoramento da digestão da lactose devido a presença de enzima β -galactosidade nas células das bactérias tradicionais de iogurte (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001).

2.1.3.1.2 Cultura probiótica

Recentemente, os iogurtes têm sido reformulados para incluir linhagens vivas de *L. acidophilus* e espécies de *Bifidobacterium* além dos organismos da cultura tradicional de iogurte *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. Assim, o bio-iogurte é o iogurte que contém microrganismos probióticos vivos que proporcionam o aumento dos efeitos benéficos a saúde do hospedeiro (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001; SHAH, 2001; VINDEROLA, BAILO & REINHEIMER, 2000).

As bifidobactérias são habitantes naturais do intestino humano e animal. Sua população é influenciada pela idade, dieta, antibióticos, estresse entre outros fatores. As bifidobactérias são bastonetes, gram-positivas, anaeróbias, possuem formato de Y e requerem nutrientes especiais, o que dificulta seu isolamento e

crescimento em laboratórios. Todas as espécies de *bifidus* fermentam a lactose e crescem bem em leite. Sua temperatura de crescimento situa-se entre 20°C a 46°C e morrem a 60°C. O pH ótimo é de 6,5 - 7,0 e não há crescimento em pH < 5,1 ou pH > 8,0 (ARUNACHALAM, 1999).

Em humanos, as bifidobactérias são consideradas benéficas por produzirem ácido láctico, acético e pequena quantidade de ácido fórmico, diminuindo o pH do cólon e inibindo a proliferação de patógenos (HUGHES & HOOVER, 1991; IBRAHIM & BEZKOROVAINY, 1994).

Os *L. acidophilus* são bactérias gram-positivas, catalase negativas, anaeróbias a microaerófilas, homofermentativas e possuem formato de bastonetes. São residentes naturais do intestino humano e de animais. Os *L. acidophilus* são fracos formadores de ácidos, e por esta razão, são especialmente utilizados em iogurtes suaves. Crescem em temperatura entre 20 a 48°C, sendo a temperatura ótima de crescimento 37°C (FRANCO, LANDGRAF & DESTRO, 1996). Os lactobacilos contribuem com o sabor e aroma em alimentos fermentados, produzindo vários compostos voláteis, como o diacetil e seus derivados (SILVA & STAMFORD, 2000).

Não está estabelecida a quantidade ótima de consumo de produtos contendo bactérias probióticas necessárias para promover benefícios nutricionais aos consumidores (GILLILAND *et alii*, 2002). Vinderola & Reinheimer (2000) sugerem níveis acima de 10^7 UFC por grama ou mililitros do produto para serem garantidos efeitos funcionais fisiológicos. Outros autores preconizam número mínimo de células viáveis de 10^5 UFC.g⁻¹ (SHAH *et alii*, 1995; SAMONA & ROBINSON, 1991). Possivelmente essas contagens sejam ainda efetivas no caso de produtos lácteos consumidos com frequência regular (VINDEROLA & REINHEIMER, 2000).

Segundo os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados, da Resolução Nº 5, de 13 de novembro de 2000, estabelece que em iogurtes a contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^7 UFC/mL no produto final, durante todo o prazo de validade e, no caso em que mencione(m) o uso de Bifidobactérias, a contagem será de 10^6 UFC/mL (BRASIL, 2000). Em relação aos probióticos, o produto deve constar a quantidade dos microrganismos viáveis que garanta a ação alegada dentro do prazo de validade do produto (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002).

Diversos fatores afetam o crescimento e a viabilidade das bactérias probióticas no produto. Entre eles pode-se destacar o ácido e peróxido de hidrogênio produzidos pela bactéria do iogurte, o pH, o aumento da acidez durante armazenamento, a temperatura de armazenamento, a presença de conservantes e de outros microrganismos, a concentração de oxigênio contida no produto e permeabilidade do oxigênio através da embalagem e a disponibilidade de fatores de crescimento (DAVE & SHAH, 1998; GUEIMONDE *et alii*, 2004).

Do ponto de vista econômico/comercial, não é viável fermentar o leite usando apenas microrganismos probióticos devido ao maior tempo de fermentação requerido para reduzir o pH do leite para 4,6 e também ao sabor desagradável provocado por algumas linhagens de bactérias probióticas. Atualmente, os microrganismos da cultura tradicional de iogurte (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) são empregados em combinação com as bactérias probióticas para reduzir o tempo de fermentação e melhorar o sabor, corpo e textura do produto final (DAVE & SHAH, 1997b).

Segundo Lourens-Hatting & Viljoen (2001), Kailasapathy & Rybka (1997) e Arunachalam (1999), 400 a 500g por semana de iogurte probiótico contendo no mínimo 10^6 UFC/mL devem ser consumidos regularmente para transferir ao consumidor efeito probiótico.

2.1.4 Pós-acidificação

Durante o armazenamento do iogurte, observam-se alterações na sua qualidade. A atividade metabólica das bactérias lácticas do iogurte é reduzida durante o resfriamento. No entanto, o produto final pode sofrer uma pós-acidificação que é o decréscimo do pH durante o armazenamento refrigerado devido à atividade metabólica persistente da bactéria láctica. A pós-acidificação é mais intensa nos primeiros sete dias de fabricação do iogurte devido ao consumo de lactose, produção de ácido láctico e a alta atividade metabólica da bactéria a pH mais elevados (BEAL *et alii*, 1999).

A intensidade da pós-acidificação em iogurtes depende da capacidade de acidificação das culturas, da etapa de fermentação nos tanques, do resfriamento, da

temperatura de armazenamento e do valor inicial do pH. Uma pós-acidificação intensa pode afetar a viabilidade das bactérias lácticas, principalmente das bactérias probióticas *Bifidobacterium* sp. e *L. acidophilus* (SHAH & RAVULA, 2000).

De acordo com Lourens-Hatting & Viljoen (2001), uma excessiva pós-acidificação ocorre, principalmente, devido o crescimento incontrolável de *L. bulgaricus* nas temperaturas de refrigeração e aos baixos valores de pH. A pós-acidificação pode ser prevenida através do controle do pH (> 5), da aplicação de choque térmico (58°C/5 minutos) no iogurte, da aplicação de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e da utilização de culturas que possuam um comportamento reduzido de pós-acidificação como a cultura probiótica composta por *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* sp. juntamente com *S. thermophilus*. Além disso, a diminuição da temperatura de armazenamento (< 4°C) e o aumento da capacidade tamponante do iogurte obtido através da adição de concentrado protéico de soro também previne a pós-acidificação do iogurte (KAILASAPATHY & RYBKA, 1997).

2.2 Probióticos

A palavra “probiótico” deriva do grego e significa “para a vida” (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001). Embora o termo e a definição precisa de probiótico tenham origem nos anos 90, o interesse por microrganismos potencialmente benéficos à saúde é de tempos remotos (SCHREZENMEIR & VRESE, 2001). Em 1910, Metchnikoff foi o primeiro a colocar a idéia de que o consumo regular de leites fermentados oferecia benefícios à saúde. Na mesma época, 1899, Tissier isolou bifidobactérias a partir das fezes de um recém-nascido e verificou que elas eram o componente predominante da flora intestinal de humanos (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001).

O termo probiótico foi introduzido por Lilly & Stillwell em 1965 para descrever “substâncias secretadas por um microrganismo, o qual estimula o crescimento do outro” (SUSKOVIC *et alii*, 2001). Contudo, o termo probiótico foi redefinido por Fuller (1989) como um “suplemento alimentar composto de células microbianas vivas, as quais têm efeitos benéficos para o hospedeiro, por melhorar ou manter o equilíbrio microbiano no intestino”.

Segundo o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde, Resolução RDC nº 2, de janeiro de 2002, entende-se por probióticos os microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002).

Esses microrganismos, notadamente algumas variedades de lactobacilos e bifidobactérias, fermentam a lactose, produzindo ácido láctico. Eles têm a capacidade de manterem-se vivos no produto fermentado e sobreviverem à passagem pelo trato gastrointestinal, fixando-se no intestino e trazendo melhorias no balanço da flora microbiana de indivíduos que consumam periodicamente esses produtos (BEHRENS, ROIG & SILVA, 2000).

O critério de seleção e avaliação dos microrganismos probióticos foi resultado das pesquisas institucionais e de universidades com as indústrias de alimentos. As linhagens de bactérias para se classificarem como probióticas devem apresentar as seguintes propriedades (SUSKOVIC *et alii*, 2001):

- Possuir identificação taxonômica exata;
- Ser um habitante normal das espécies alvo: origem humana para probióticos humanos;
- Não ser tóxica e patogênica;
- Ser geneticamente estável;
- Capacidade de sobreviver, proliferar e estimular a atividade metabólica no trato gastrointestinal;
- Possuir características de aderência e colonização;
- Características desejáveis de viabilidade durante preparação, estocagem e consumo da cultura;
- Viabilidade populacional elevada, apresentando em torno de 10^6 - 10^8 bactérias por grama de produto;
- Produção de substâncias antimicrobianas, incluindo bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos;
- Antagonista a patógenos;

- Capacidade de competir com a microbiota normal, ou espécie específica, ser potencialmente resistente a bacteriocinas, ácidos e outras substâncias antimicrobianas produzidas pela microbiota residente;
- Resistência ao suco gástrico e à bile;
- Propriedade imunoestimulatória;
- Capaz de exercer efeitos benéficos à saúde (documentados e validados clinicamente);
- Favorável ao processo de produção: crescimento adequado, recuperação, concentração, congelamento, desidratação, estocagem e distribuição;
- Fornecer qualidades organolépticas desejáveis.

Na Tabela 1 estão listados exemplos de microrganismos probióticos.

Tabela 1 - Exemplos de microrganismos comumente descritos como possuidores de características probióticas.

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. longum</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. lactis</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. breve</i>	
<i>L. plantarum</i>	<i>B. infantis</i>	
<i>L. lactis</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		
<i>L. gasseri</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. salivarius</i>		

Fonte: Kopp-Hoolihan (2001).

2.3 Prebióticos

O termo prebiótico é definido como um ingrediente alimentar não digerível pela maioria dos microrganismos do intestino, e que afeta benéficamente o hospedeiro, pelo estímulo seletivo do crescimento e/ou atividade de apenas um ou de um número limitado de bactérias no cólon (GIBSON & ROBERFROID, 1995).

Para um ingrediente alimentar ser classificado como um prebiótico é necessário (FOOKS, FULLER & GIBSON, 1999):

- Não sofrer hidrólise e nem ser absorvido na parte superior do trato gastrointestinal;
- Ser um substrato seletivo para um número limitado de bactérias potencialmente benéficas do cólon, que são estimuladas para crescerem e desenvolverem atividades metabólicas;
- Ser capaz de promover uma biota intestinal saudável e, como consequência, induzir efeitos no lúmen que beneficiem o hospedeiro.

Como exemplo de substâncias prebióticas pode-se citar alguns oligossacarídeos como a lactulose, lactitol, lactosacarose, rafinose, frutooligossacarídeos (FOS), e polissacarídeos como a inulina e o amido resistente (CONWAY, 2001).

Entre os oligossacarídeos de ocorrência natural, os frutooligossacarídeos (FOS) são os principais compostos reconhecidos e utilizados em alimentos aos quais atribuem-se propriedades prebióticas (NITSCHKE, 2002). Dependendo do comprimento da cadeia, definida pelo número de unidades de monossacarídeos e também chamada grau de polimerização (DP), os FOS podem ser chamados de oligofrutoses (DP < 10, DP média = 4,8) ou inulina (DP 2 - 60, média = 12) (GIBSON & ROBERFROID, 1995; NINESS, 1999).

Muitos alimentos possuem naturalmente FOS em sua composição, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Ocorrência natural de frutooligossacarídeos (FOS) em alimentos.

Alimento	Inulina (%)	Oligofutose (%)
Cebolas	2 - 6	2 - 6
Chicória (raízes)	15 - 20	5 - 10
Aspargos	1 - 30	1 - 20
Alho	9 - 16	3 - 6
Banana	0,3 - 0,7	0,3 - 0,7
Trigo	1 - 4	1 - 4
Centeio	0,5 - 1,0	0,5 - 1,0
Cevada	0,5 - 1,5	0,5 - 1,5
Alho-poró	3 - 10	2,5 - 8,0

Fonte: Roberfroid (1993) e Gibson, Willis & Van Loo (1994).

Os prebióticos não somente proporcionam aumento potencial do número de bactérias benéficas no intestino grosso de humanos, predominantemente os lactobacilos e as bifidobactérias, mas também aumentam sua atividade metabólica através do fornecimento de substrato fermentável (BIELECKA *et alii*, 2002).

2.3.1 Inulina

A inulina foi descoberta por Rose em 1804 (GIBSON, WILLIS & VAN LOO, 1994). Em meados do século XIX a rota bioquímica foi elucidada, entretanto suas propriedades de resistência à digestão só foram descobertas no início do século XX. Mais recentemente é que foram descritas as propriedades benéficas à saúde deste tipo de carboidrato e conseqüentemente a produção industrial despertou maior interesse (NITSCHKE & UMBELINO, 2002).

A inulina é um carboidrato do grupo de polissacarídeos chamados frutanas. É composto por uma cadeia principal de unidades de frutose com uma unidade de glicose terminal, conforme mostra a Figura 1. A fórmula pode ser descrita como **GF_n**, onde **G** representa a molécula de glicose, **F** a molécula de frutose e **n** o número de unidades de frutose (ROBERFROID, 1993).

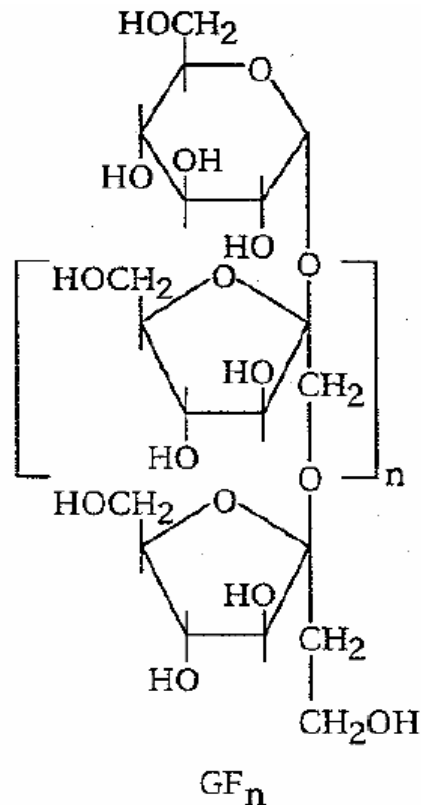


Figura 1 - Estrutura química da inulina.

Os frutooligossacarídeos são definidos como polímeros de D-frutose, terminando com uma molécula de glicose, e desta forma a inulina pode ser classificada como um frutooligossacarídeo (FOS) (MARCHETTI, 1993).

A dose diária aceitável para inulina é estabelecida em 40 gramas. Não existem evidências de toxicidade ou distúrbios gastrointestinais associados ao consumo de inulina. A média diária de consumo *per capita* varia de 1 a 10 gramas em populações da parte ocidental dos EUA e da Europa (VAN LOO *et alii*, 1995).

As propriedades nutricionais e aplicações da inulina compreendem:

- Após a ingestão, a inulina não é quebrada no sistema digestivo humano, não resultando, portanto em contribuição calórica neste processo. Apenas a nível de cólon ocorre a degradação de inulina por fermentação de bactérias, e conseqüentemente ocorre uma baixa contribuição calórica indireta em níveis de 1,0 a 1,5 kcal/g inulina (ROBERFROID, GIBSON & DELZENNE, 1993).

- A inulina afeta os parâmetros fisiológicos do sistema digestivo, como esvaziamento gástrico, tempo de trânsito, pH, e massa fecal de forma similar às fibras dietéticas. Em função do efeito benéfico no sistema digestivo a inulina é considerada um "alimento funcional" (ROBERFROID, GIBSON & DELZENNE, 1993).
- A ingestão de inulina resulta em um significativo incremento dos benefícios das bifidobactérias. A flora *bifidus* estimula o sistema imunológico, a absorção de minerais, e inibe o crescimento de bactérias nocivas ao organismo (ROBERFROID, VAN LOO & GIBSON, 1998).
- Recentes pesquisas em nutrição mostraram resultados interessantes com relação a absorção de cálcio e prevenção de câncer de cólon (COUSSEMET & FRANCK, 1998).
- Devido às cadeias mais longas, a inulina possui a capacidade de formar microcristais quando misturada com água e leite. Estes microcristais interagem entre si para formar uma mistura cremosa e macia promovendo a sensação de presença de gordura. A inulina tem sido utilizada com sucesso como substituta da gordura em recheios prontos, sobremesas congeladas e molhos (NINESS, 1999).
- A inulina é adicionada em barras de cereais, biscoitos, bolos e cereais matinais para aumentar o teor de fibra dietética e na formulação de alimentos prebióticos como bebidas lácticas funcionais ou simbióticas no caso de iogurtes (NITSCHKE, 2002).

A inulina é metabolizada da mesma maneira que as fibras e mostra os efeitos das mesmas quando ingerida. Por alguns de seus efeitos, a inulina pode ser comparada a outras fibras solúveis, como as pectinas (CÂNDIDO, 1995).

2.4 Simbióticos

O termo simbiótico é utilizado quando o ingrediente alimentar contém tanto os probióticos quanto os prebióticos que afetam o hospedeiro de maneira benéfica (SCHREZENMEIR & VRESE, 2001).

Bactérias bífidas constituem um problema como culturas probióticas, pois são difíceis de serem isoladas e manipuladas, uma vez que são anaeróbias. Quando isoladas, não toleram bem ambiente ácido, sendo, portanto, difíceis de serem carregadas em produtos lácteos fermentados, considerados os carreadores universais de bactérias lácteas. Uma alternativa para o aumento de bactérias bífidas no trato gastrointestinal é o emprego de prebióticos (FERREIRA & TESHIMA, 2000).

A interação entre o probiótico e prebiótico *in vivo* pode ser favorecida por uma adaptação do probiótico através do consumo de prebiótico. Isto deve resultar em uma vantagem competitiva para o probiótico se este for consumido juntamente com o prebiótico (PUUPONEN-PIMIÄ *et alii*, 2002).

2.5 Efeitos fisiológicos dos probióticos e prebióticos

O consumo regular de prebióticos e probióticos pode ser empregado na profilaxia e tratamento de uma série de condições patológicas, a maior parte na esfera da gastroenterologia (MARTEAU *et alii*, 2001; CHERMESH & ELIAKIM, 2006).

Existem evidências de benefícios relacionados ao consumo de prebióticos e probióticos que estão em fase de estudo por diversos grupos de pesquisa. São eles: 1) redução de infecção por *Helicobacter pylori*, que está associado a gastrites e úlceras pépticas (CRUCHET *et alii*, 2003; MARTEAU *et alii*, 2001); 2) redução de sintomas de alergias alimentares (SALMINEN, OUWEHAND & ISOLAURI, 1998); 3) regularização da função intestinal, combatendo a obstipação intestinal (ARUNACHALAM, 1999; MARTEAU & BOUTRON-RUALT, 2002); 4) atenuação da síndrome do intestino irritável e doença de Crohn (MARTEAU *et alii*, 2001; SALMINEN, OUWEHAND & ISOLAURI, 1998); 5) eliminação dos sintomas da intolerância à lactose (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001; SALMINEN, OUWEHAND & ISOLAURI, 1998; SCHEINBACH, 1998; VRESE *et alii*, 2001); 6) efeitos benéficos no metabolismo mineral, particularmente na densidade e estabilidade óssea (ARUNACHALAM, 1999; ROBERFROID, 2000; ANDERSON *et alii*, 2001; SCHOLZ-AHRENS *et alii*, 2001); 7) prevenção do câncer de cólon e outros tipos de câncer (ARUNACHALAM, 1999; MARTEAU *et alii*, 2001; SALMINEN,

OUWEHAND & ISOLAURI, 1998); 8) redução do colesterol e concentração de triglicerídeos plasmáticos (ARUNACHALAM, 1999; LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001; SCHEINBACH, 1998; SCHREZENMEIR & VRESE, 2001); 9) resistência à infecções do trato urogenital (ARUNACHALAM, 1999; REID, 2001) e outros.

Segundo Schrezenmeir & Vrese (2001), os benefícios à saúde que estão bem estabelecidos pela literatura atualmente são: 1) diminuição da frequência e duração da diarreia associada ao uso de antibióticos (*Clostridium difficile*), infecção por rotavírus, quimioterapia, e, em menor grau, diarreia do viajante; 2) estimulação humoral e imunidade celular; e 3) diminuição de metabólitos desfavoráveis como amônia e enzimas pró-carcinogênicas do cólon.

2.5.1 Alívio da intolerância à lactose

A intolerância à lactose é causada pela falta ou atividade insuficiente da enzima lactase no intestino humano. A ausência dessa enzima faz com que o indivíduo sofra uma série de desconfortos abdominais. *L. acidophilus* e bifidobactérias produzem β -galactosidase, a qual hidrolisa a lactose, melhorando a intolerância a esse açúcar (KAILASAPATHY & RYBKA, 1997; BEHRENS, ROIG & SILVA, 2000; LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001).

Lactases são enzimas intestinais que possuem um importante papel na digestão da lactose. Elas catalisam a hidrólise do dissacarídeo lactose em seus monossacarídeos glicose e galactose antes da sua absorção (LIM *et alii*, 1995). A atividade da lactase é maior no recém-nascido e diminui durante a infância e adolescência, atingindo baixos índices em adulto (RENNER, 1997).

A deficiência de lactase significa que a concentração da enzima β -galactosidase, que é responsável pela quebra da lactose, é muito pequena na mucosa do intestino delgado. Como resultado, a lactose não é quebrada e o aumento de sua concentração dentro do intestino conduz a um aumento da pressão osmótica causando sintomas como pressão abdominal, flatulência, cólica e diarreia (RENNER, 1997). A frequência desses sintomas depende primeiramente da quantidade de lactose ingerida, da sensibilidade do indivíduo, do tempo de trânsito

gastrointestinal e da microbiota contida no intestino grosso. O mecanismo pelo qual a lactose não digerida ou não absorvida causa os sintomas de intolerância à lactose ainda não está claro. A secreção de água no intestino delgado, a dilatação e trânsito acelerado através do intestino delgado, a desordem dos movimentos peristálticos e a absorção de água no cólon causada por produtos fermentados da lactose devem ser a causa da diarreia. Flatulência e inchaço são provavelmente conseqüências da produção de ácidos, hidrogênio, dióxido de carbono e metano a partir da fermentação da lactose (VRESE, 2001).

A enzima responsável pela hidrólise da lactose (β -galactosidase) contida nas células das bactérias lácticas do iogurte substitui a escassez de β -galactosidase na mucosa do intestino delgado em indivíduos intolerantes a lactose (BURTON & TANNOCK, 1997). As bactérias probióticas melhoram a digestão da lactose em menor grau que as culturas tradicionais de iogurte. A falta de uma relação entre a má digestão da lactose com a incidência dos sintomas da intolerância indicam que a bactéria probiótica atua através da prevenção dos sintomas causados pela intolerância no intestino grosso e/ou melhora a digestão da lactose no intestino delgado (VRESE, 2001).

Segundo Arunachalam (1999), o iogurte é uma excelente alternativa para o tratamento de intolerância a lactose e bilhões de pessoas em todo mundo, que não digerem a lactose, podem se beneficiar com o consumo desse simples alimento tradicional.

2.6 Caseinato de cálcio

O caseinato é uma proteína obtida a partir da proteína láctea e junto com a lactoalbumina do soro são proteínas de alto valor biológico. A caseína é transformada em sais de cálcio ou sódio, para aumentar sua solubilidade e assimilação orgânica, sendo denominada a partir daí como caseinato de cálcio ou de sódio (TADINI, TAQUEDA & GRANDI, 1996).

Os caseinatos, segundo definição na norma 72 da International Dairy Federation de 1974, são produtos fabricados mediante a secagem de dispersões preparadas pela adição de um álcali apropriado e água potável com caseína padrão

alimentício ou com coalhada fresca de caseína padrão alimentício, ambas derivadas integralmente do leite. Os álcalis e/ou sais alcalinos (incluindo amônia e alcalinos terrosos) usados devem ser também de grau alimentício (TADINI, 1994).

De acordo com a norma citada os caseinatos alimentícios extra e de 1ª qualidade tem as seguintes especificações:

- Quanto à cor: devem ser brancos ou cremes claro.
- Quanto ao conteúdo de umidade: extra – não mais que 6,0% e de 1ª qualidade – não mais que 8,0%.
- Quanto ao conteúdo de proteína: extra – não menos que 90,0% na matéria-seca e de 1ª qualidade – não menos que 88,0% na matéria seca.

A fabricação desses concentrados protéicos de leite na forma de caseinatos se dá nas seguintes etapas: preparação e acidificação do leite desnatado, precipitação da caseína, separação e lavagem, secagem pelo processo de nebulização ou secador rotativo e embalagem.

De acordo com os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados, Resolução N° 5, 13 de novembro de 2000 (BRASIL, 2000) é permitido o uso do concentrado de proteínas do leite (como por exemplo, caseinatos alimentícios) em processos de fermentação do leite para obtenção de iogurtes, queijos maturados, queijos frescos e alguns tipos de sorvetes” (TADINI, 1994).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento dos produtos e as análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais foram realizadas nos laboratórios pertencentes ao Departamento de Tecnologia e Ciência de Alimentos – DTCA, do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM.

3.1 Material

3.1.1 Matéria-prima

A matéria-prima utilizada para a elaboração dos iogurtes com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas (0,5%, 1,0% e 1,5%) foi:

- Leite UHT integral longa vida – Elegê®;
- Açúcar refinado especial – União®;
- Caseinato de cálcio tipo: PLASVITA distribuidora Colorcon;
- Inulina (Raftiline, da empresa Orafti – Bélgica);
- Corante em pó de morango – Duas Rodas;
- Aroma (líquido) de morango – Duas Rodas.

3.1.2 Culturas lácticas

Foram utilizadas as seguintes culturas lácticas comerciais:

- Cultura Tradicional: fermento láctico Rich®, que é uma cultura tradicional de iogurte composta por duas linhagens de bactérias lácticas superconcentradas – *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* da Chr. Hansen – Valinhos – SP;

- Cultura Probiótica: Bio Rich® – fermento láctico probiótico que contém culturas selecionadas e superconcentradas de *L. acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium* BB-12 e *S. thermophilus*, da Chr. Hansen – Valinhos – SP.

A dosagem, normalmente, recomendada é de 1% na fabricação de iogurtes caseiros.

3.2 Métodos

3.2.1 Processo de fabricação dos iogurtes

Os iogurtes foram elaborados, de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 2, onde foram inoculadas diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas (0,5%, 1,0% e 1,5%), totalizando três tratamentos.

A diferença entre as amostras de iogurte se limitou a proporção de culturas lácticas utilizadas.

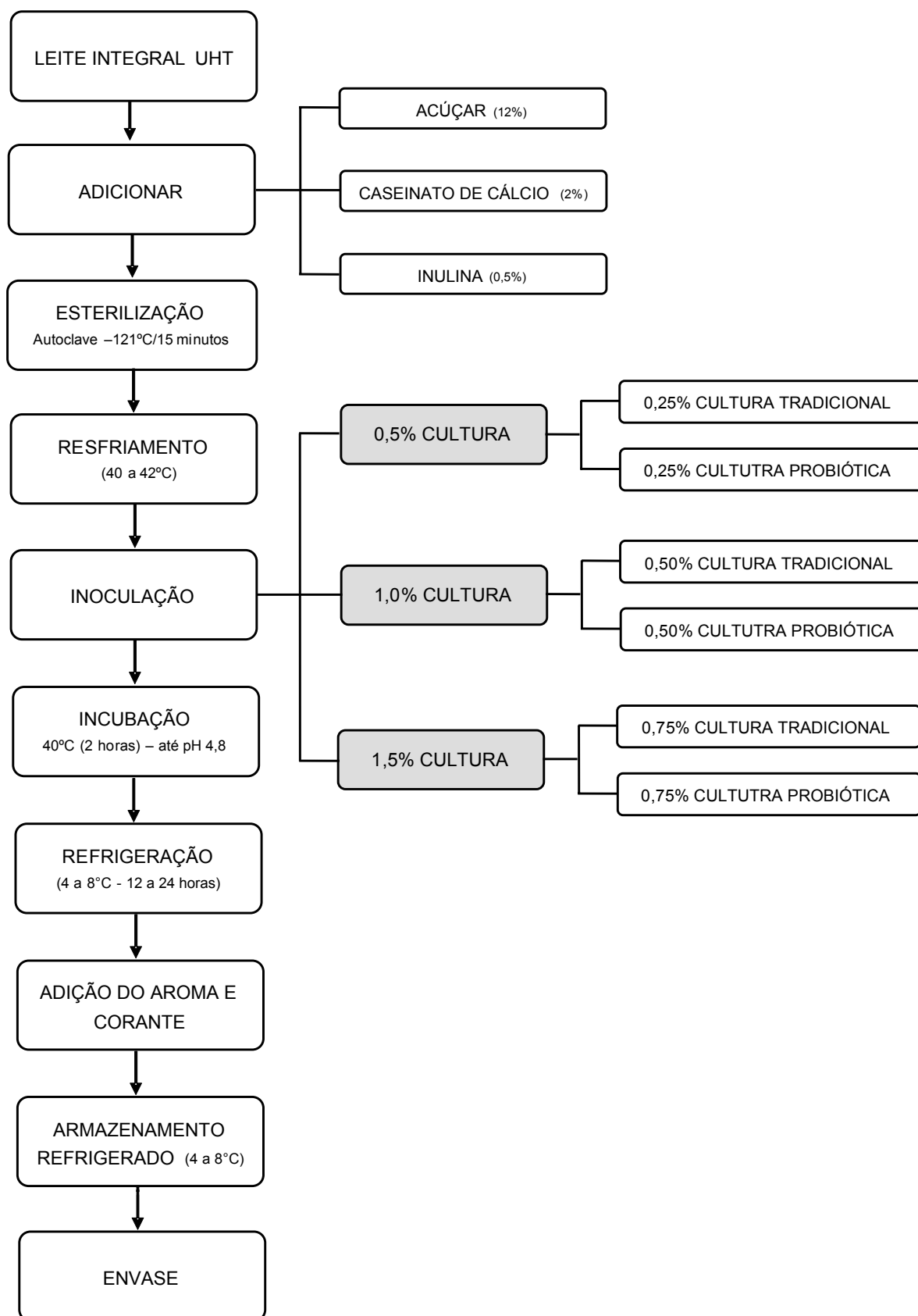


Figura 2 - Fluxograma do processo de desenvolvimento dos iogurtes produzidos com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas adicionados de caseinato de cálcio e inulina.

3.2.1.1 Primeira etapa – Elaboração da formulação inicial

Para a elaboração da formulação inicial utilizada na produção dos iogurtes acrescentou-se para cada um litro de leite integral UHT, 12% de açúcar refinado, 2% de caseinato de cálcio (diluído gradativamente) e 0,5% de inulina. Em seguida, os ingredientes foram homogeneizados e esterilizados em autoclave, na temperatura de 121°C por 15 minutos. As misturas foram resfriadas até atingir 42°C, para receber a culturas lácticas em condições assépticas.

Utilizou-se temperaturas de autoclave com o intuito de evitar possíveis contaminações por parte dos ingredientes adicionados (açúcar, caseinato de cálcio). Essas temperaturas foram recomendadas pelos fornecedores de caseinato de cálcio e da inulina para que houvesse uma perfeita homogeneização.

3.2.1.2 Segunda etapa – Preparo da cultura

As culturas lácticas tradicionais (2 g do fermento láctico Rich®) e culturas probióticas (2 g do fermento láctico Bio Rich®) foram dissolvidas assepticamente em 500 mL de leite integral UHT previamente esterilizado (Figuras 3 e 4). Em seguida a mistura foi homogeneizada e as concentrações foram distribuídas em 0,5%, 1,0% e 1,5% em capela de fluxo laminar.



Figura 3 - Adição das culturas lácticas tradicionais e probióticas no leite integral UHT previamente esterilizado – preparo da cultura.



Figura 4 - Homogeneização da cultura.

3.2.1.3 Terceira etapa – Fermentação

As formulações iniciais foram incubadas em banho termostático à 40°C. Durante a incubação o iogurte foi submetido a medidas do valor do pH e acidez expressa em ácido láctico (conforme descrito no item 3.2.2), monitorados a cada 15 minutos (triplicata), em porções destinadas somente para estas análises, para avaliação do tempo de fermentação, até as amostras atingirem aproximadamente um valor de pH de 4,8 e percentual de ácido láctico de 0,7 (Figuras 5 e 6).

O tempo zero foi avaliado a partir de três horas e trinta minutos, ou seja, partiu do pH de 6,6 e acidez de 0,18% de ácido láctico.



Figura 5 - Amostras de iogurte no banho termostático à 40°C.



Figura 6 - Amostras de iogurtes (porções) no banho termostático à 40°C, para determinação do valor de pH e acidez durante o processo de fermentação.

3.2.1.4 Quarta etapa – Armazenamento das amostras sob refrigeração

Após o processo de fermentação, as diferentes amostras de iogurtes foram resfriadas e armazenadas em ambiente refrigerado à 4°C (Figura 7).



Figura 7 - Armazenamento das amostras de iogurtes sob refrigeração à 4°C.

3.2.1.5 Quinta etapa – Adição de aroma e corante nas amostras de iogurtes

Para cada 1 litro de iogurte fabricado com diferentes concentrações de culturas lácticas foi adicionado 0,02 g de corante e 0,6 mL de aroma, conforme recomendação do fabricante.

O processo de foi realizado na capela de fluxo laminar (Figuras 8 e 9).



Figura 8 - Adição de corante nas amostras de iogurtes.



Figura 9 - Adição de aroma nas amostras de iogurtes.

3.2.1.6 Sexta etapa – Distribuição dos iogurtes em frascos de polietileno

As amostras de iogurtes foram distribuídas em frascos de polietileno de 200 mL e de 1 L, doados pela COOPROL/UFMS, devidamente sanitizados com detergente neutro e álcool à 70%. Foram esterilizados em autoclave (121°C por 15 minutos) vidros de 25 mL onde alíquotas para as análises microbiológicas foram

separadas. Os recipientes utilizados para o armazenamento dos iogurtes foram identificados com etiqueta auto-adesiva com a descrição do produto (Figuras 10, 11 e 12).



Figura 10 - Envase dos iogurtes em frascos de polietileno de 200 mL.



Figura 11 - Iogurtes em frascos de polietileno de 200 mL.



Figura 12 - Iogurtes em frascos de polietileno de 1 L.

3.2.2 Caracterização físico-química dos iogurtes

Para a caracterização dos iogurtes foram realizadas, em triplicata, valor de pH, acidez expressa em ácido láctico, teor de lactose, teor de umidade, teor de cinzas, teor extrato seco total e extrato seco desengordurado, teor de proteínas e teor de lipídios, de acordo com as seguintes metodologias:

- **Acidez titulável:** a acidez, em termos de ácido láctico, foi determinada por titulação (AOAC, 1995).
- **Valor de pH:** o pH foi determinado utilizando-se o pHmetro digital Micronal, modelo 320, com eletrodo de vidro combinado (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).
- **Determinação da lactose:** foi determinada pelo método de Fehling (BRASIL, 2003).
- **Teor de umidade:** foi determinado pelo método de secagem em estufa à 105°C (AOAC, 1995).
- **Teor de cinzas:** foi determinada pelo método de incineração em forno mufla a 550°C (AOAC, 1995).
- **Extrato seco total:** foi determinado pelo método de secagem em estufa à 105°C (AOAC, 1995).

- **Extrato seco desengordurado:** foi determinado pelo método de secagem em estufa à 105°C (AOAC, 1995).

- **Proteínas:** o teor de proteínas foi determinado pelo método Micro Kjeldahl (AOAC, 1995).

- **Gordura:** foi determinada no aparelho Milko – tester MK III F 3140, A/SN. Foss Electric, Denmark.

3.2.3 Vida-de-prateleira dos iogurtes – Pós-acidificação

Estabeleceu-se como período de armazenamento 28 dias à 4°C. Os iogurtes foram avaliados nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 quanto ao valor de pH, acidez expressa em ácido láctico, teor de lactose e determinação de células viáveis de *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium sp.*.

3.2.4 Contagem de microrganismos tradicionais e probióticos

A análise microbiológica é utilizada para estudar o modo de crescimento e reprodução das espécies fermentadoras do iogurte. Para a enumeração é fundamental ajustar as condições físicas, químicas e nutritivas necessárias a cada espécie.

As contagens de bactérias lácticas dos iogurtes foram realizadas no 1º, 7º, 14º, 21º e 28º dia de estocagem. A abertura dos fracos de iogurtes foi feita no interior da câmara de fluxo laminar para prevenir qualquer contaminação ambiente na amostra. Uma alíquota de 1 mL de amostra foi transferida para um tubo com rosca contendo 9 mL de solução de água peptonada estéril 0,1%. A partir desta diluição foram feitas diluições subseqüentes, necessárias à análise do produto. Após o tempo de incubação requerido para cada meio de cultura, a contagem foi realizada em placas de Petri que apresentaram entre 25 e 250 colônias.

Os meios seletivos foram elaborados com o objetivo de favorecer o crescimento da bactéria de interesse, impedindo o crescimento das outras bactérias.

3.2.4.1 Contagem de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*

Para enumeração de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* foi utilizado o meio ágar M 17. A inoculação foi realizada por profundidade. Após a inoculação, as placas de Petri foram incubadas invertidas em aerobiose a 37°C por 48 horas (IDF, 1997) (Figura 13).



Figura 13 - Colônias de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* desenvolvidas em meio de cultura M 17, após 48 horas de incubação.

3.2.4.2 Contagem de *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*

Para a enumeração de *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* foi utilizado o meio MRS ágar glicose acidificado. A inoculação foi realizada por profundidade. Após a inoculação, as placas de Petri foram incubadas invertidas em jarras contendo gerador de anaerobiose Anaerobac (PROBAC) a 37°C por 72 horas (IDF, 1997). A Figura 14 apresenta as colônias de *L. bulgaricus*.

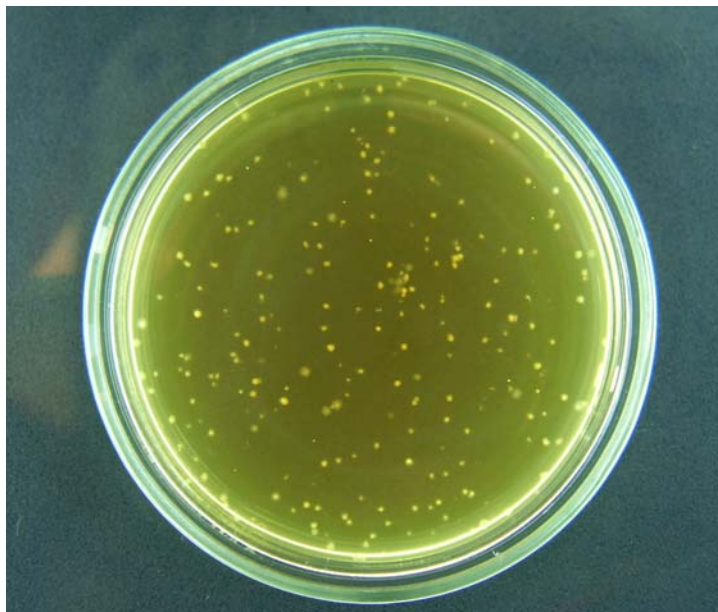


Figura 14 - Colônias de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* desenvolvidas em meio de cultura MRS – ágar glicose acidificado, após 72 horas de incubação.

3.2.4.3 Contagem de *Lactobacillus acidophilus*

Para a enumeração de *Lactobacillus acidophilus* foi utilizado o meio De Man, Rogosa Sharp MRS, formulado em laboratório, com adição de solução de maltose. A técnica utilizada para a inoculação foi por profundidade. Após a inoculação, as placas de Petri foram incubadas invertidas em jarras contendo gerador de anaerobiose Anaerobac (PROBAC) a 37°C por 72 horas (Figura 15) (IDF, 1999).

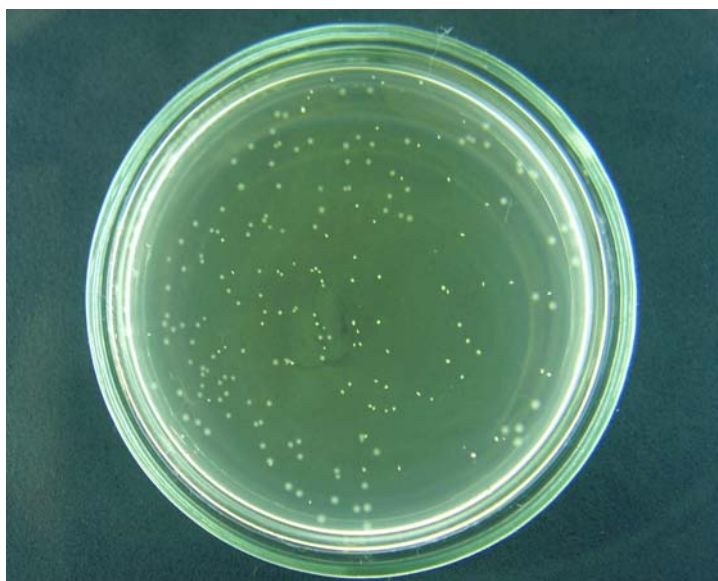


Figura 15 - Colônias de *Lactobacillus acidophilus* desenvolvidas em meio de cultura MRS – maltose, após 72 horas de incubação.

3.2.4.4 Contagem de *Bifidobacterium* sp.

Para a enumeração de *Bifidobacterium* sp. foi utilizado o meio MRS com glicose e adicionado de solução de dicloxacilina (solução A), cloridrato de cisteína (solução B) e cloreto de lítio (solução C). A técnica utilizada para inoculação foi por profundidade. Após a inoculação, as placas de Petri foram incubadas invertidas em jarras contendo gerador de anaerobiose Anaerobac (PROBAC) a 37°C por 72 horas (CHR. HANSEN, 1999). A Figura 16 apresenta as colônias de *Bifidobacterium* sp..

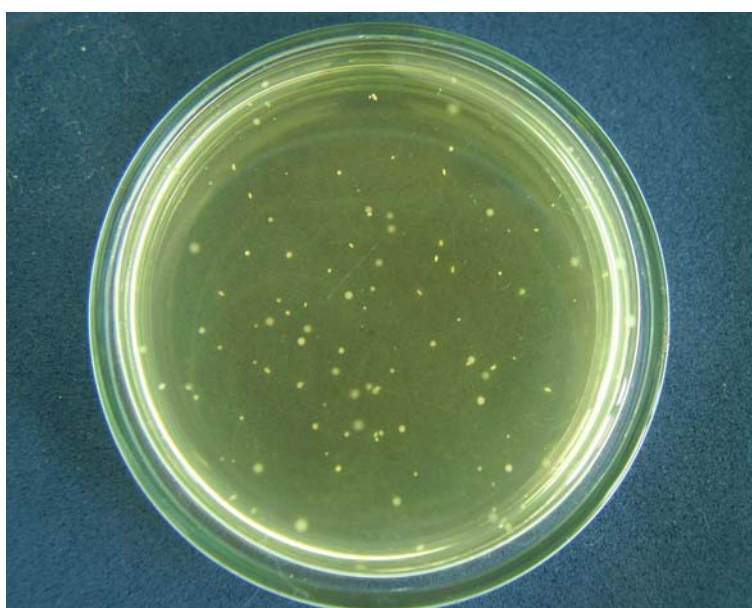


Figura 16 - Colônias de *Bifidobacterium* sp. desenvolvidas em meio de cultura MRS – glicose com as soluções A, B e C, após 72 horas de incubação.

3.2.5 Determinação da viscosidade

As propriedades reológicas das amostras de iogurte foram mensuradas em reômetro no modo rotativo (Haake RS 150), utilizando sistema de cilindro coaxial e sensor Z40 DIN a 10°C. A taxa de deformação foi crescente de 0,13 a 300s⁻¹ em 300s (KOKSOY & KILIC, 2004).

Foi utilizada para comparação dos resultados uma amostra comercial de iogurte líquido e iogurte tradicional, adicionados de cultivo probiótico adquirido no comércio local.

A viscosidade aparente foi determinada na taxa de deformação $55s^{-1}$, pois este valor representa aproximadamente a deformação imposta na mastigação.

Esta determinação foi realizada na Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

3.2.6 Determinação da cor

A cor foi determinada pelo sistema CIELAB em equipamento Minolta® CR 310 (iluminante C ou D65 e ângulo 10°), através dos parâmetros de cor: L^* (luminosidade), a^* e b^* (coordenadas de cromaticidade), medidos no próprio aparelho.

Quanto às coordenadas de cromaticidade, $+a^*$ está na direção do vermelho, $-a^*$ está na direção do verde, $+b^*$ está na direção do amarelo e $-b^*$ está na direção do azul. O centro é acromático, à medida que os valores de a^* e b^* aumentam e o ponto move-se para fora partindo do centro, a saturação da cor aumenta (MINOLTA, 1994).

3.2.7 Análise sensorial

Os iogurtes foram submetidos à avaliação sensorial por uma equipe de 30 provadores não treinados no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia e Ciência de Alimentos. Os parâmetros analisados foram: cor, aroma, sabor, acidez, corpo e aparência global, além disso, aos julgadores solicitou-se que indicassem a frequência de consumo de iogurtes e a intenção de compra do produto caso o encontrassem à venda no mercado.

Na avaliação dos iogurtes foi utilizada uma hedônica de 9 pontos. O modelo de ficha utilizado para avaliar a aceitabilidade dos produtos é apresentado na Figura 17.

Os provadores receberam aproximadamente 40 mL de cada amostra com temperatura entre $4 - 8^\circ C$ em copos de plástico descartáveis com capacidade para 50 mL, codificados com números aleatórios de três dígitos. O teste foi realizado em cabines individuais.

Foram selecionadas 35 crianças com idade entre 4 a 6 anos da creche Ipê Amarelo da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, para verificar a aceitabilidade do iogurte contendo 1,0% de cultura láctica. Esta amostra foi selecionada no teste anterior (com adultos) visto que, as crianças teriam dificuldades em avaliar três amostras.

O teste utilizado foi a escala hedônica facial de 5 pontos (Figura 18) (DUTCOSKI, 1996). Para cada gravura foi atribuído valor numérico correspondente a 1 “desgostei muito” e 5 “gostei muito”.

ANÁLISE SENSORIAL – PRODUTO: IOGURTE

Nome: _____ Data: ____/____/____

Por favor, avalie as amostras de iogurte de morango utilizando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou, em relação aos atributos COR, AROMA, SABOR, ACIDEZ, CORPO e APARÊNCIA GLOBAL.

(1) Desgostei muitíssimo	(6) Gostei ligeiramente
(2) Desgostei muito	(7) Gostei regularmente
(3) Desgostei regularmente	(8) Gostei muito
(4) Desgostei ligeiramente	(9) Gostei muitíssimo
(5) Indiferente	

AMOSTRA	COR	AROMA	SABOR	ACIDEZ	CORPO	AP. GLOBAL
216	_____	_____	_____	_____	_____	_____
574	_____	_____	_____	_____	_____	_____
839	_____	_____	_____	_____	_____	_____

Das amostras analisadas, por favor, ordene-as de acordo com a sua preferência:

Primeira	() 216	() 574	() 839
Segunda	() 216	() 574	() 839
Terceira	() 216	() 574	() 839

Comentários: _____

Você consome iogurte:

	() Todos os dias
	() A cada 15 dias
	() Uma vez por semana
	() Uma vez por mês

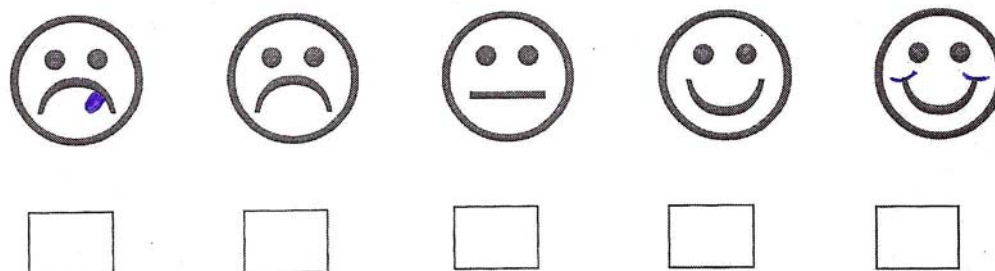
Você compraria esse iogurte (o preferido)?

() SIM	() NÃO
---------	---------

Figura 17 - Ficha utilizada para avaliação de aceitabilidade dos iogurtes com diferentes concentrações de culturas lácticas.

ESCALA HEDÔNICA FACIAL

Faça um x dentro do quadrado abaixo da figura que melhor descreve a sua opinião sobre o produto que você comeu:



Nome: _____ Data: ____/____/____

Figura 18 - Ficha utilizada para avaliação de aceitabilidade dos iogurtes com diferentes concentrações de culturas lácticas, teste aplicado com julgadores infantis.

3.2.8 Análise estatística

Em relação aos valores das curvas de pH e acidez durante o período de fermentação; das curvas de pH, acidez e lactose durante as cinco semanas de monitoramento (pós-acidificação) e as análises microbiológicas os resultados foram expressos em valores médios com os respectivos desvios padrão. Quanto aos resultados das análises de umidade, cinzas, extrato seco total e extrato seco desengordurado, proteína e gordura foram submetidos à análise de variância (ANOVA) por Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), para utilizar esta análise é necessário que seus pressupostos sejam satisfeitos: o primeiro Teste Lilliefors Normalidade e o segundo da Homogeneity.

As notas apresentadas pelos julgadores aos diferentes atributos avaliados na análise sensorial e a determinação da cor foram submetidas à análise de variância (ANOVA) por Delineamento de Blocos Casualizados (DBC) e teste de Tukey para a comparação das médias. Em relação aos itens: preferência, consumo e intenção de compra, os resultados foram expressos em porcentagem.

Para a avaliação dos dados apresentados na pesquisa foi utilizado o programa de estatística *Statistica 7.0*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Curvas de pH e acidez expressa em ácido láctico durante o processo de fermentação

O tempo total de fermentação das formulações iniciais com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas (0,5%, 1,0% e 1,5%) foi de 120 minutos, no banho termostaticado à 40°C, até as amostras atingirem aproximadamente um valor de pH de 4,8 e percentual de ácido láctico de 0,7. O tempo zero foi determinado a partir de três horas e meia de fermentação. O processo de fermentação da amostra com 1,5% de culturas lácticas foi de 60 minutos, para a amostra com 1,0% de culturas lácticas foi de 90 minutos e para a amostra com 0,5% de culturas lácticas foi de 120 minutos.

Nas Figuras 19 e 20 estão ilustradas as curvas de fermentação dos iogurtes experimentais. As tabelas com os valores médios e desvios padrão do valor de pH e acidez expressa em ácido láctico durante a fermentação para cada produto estão apresentadas no Apêndice I (Tabelas 9 e 10).

A Figura 19 apresenta a variação do valor de pH para os três níveis de adição de culturas lácticas tradicionais e probióticas dos iogurtes. No processamento do iogurte com adição de 0,5% de culturas lácticas observa-se uma variação de $5,35 \pm 0,01$ a $4,85 \pm 0,02$ nos valores de pH, em relação ao iogurte adicionado com 1,0% de culturas lácticas essa variação foi de $5,15 \pm 0,01$ a $4,78 \pm 0,01$ e no iogurte com 1,5% de culturas lácticas os valores apresentaram-se entre $5,07 \pm 0,01$ a $4,86 \pm 0,01$.

A Figura 20 descreve a variação da acidez expressa em porcentagem de ácido láctico. Os valores variaram de $0,49 \pm 0,02$ a $0,65 \pm 0,02$ para o iogurte com

0,5% de culturas lácticas, de $0,55 \pm 0,01$ a $0,72 \pm 0,01$ para o iogurte com 1,0% de culturas lácticas e de $0,57 \pm 0,02$ a $0,65 \pm 0,01$ para o iogurte com 1,5% de culturas lácticas.

A concentração de culturas lácticas tradicionais e probióticas afetou o tempo de fermentação das amostras. O iogurte adicionado de maiores concentrações de culturas lácticas (1,5%) acelerou a acidificação favorecendo a diminuição do valor de pH, resultando em um menor tempo de fermentação (60 minutos).

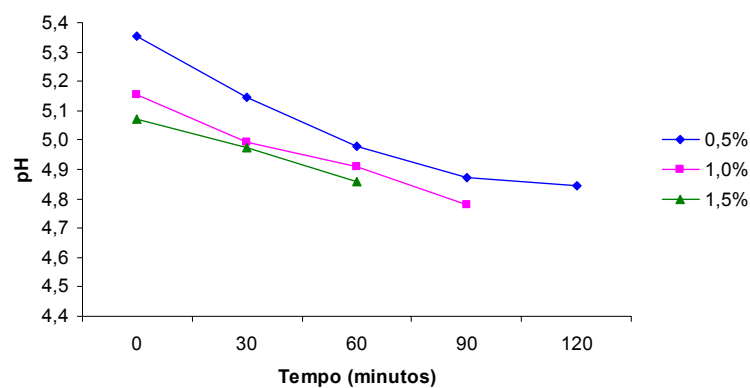


Figura 19 - Valores médios de pH durante o processo de fermentação dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas.

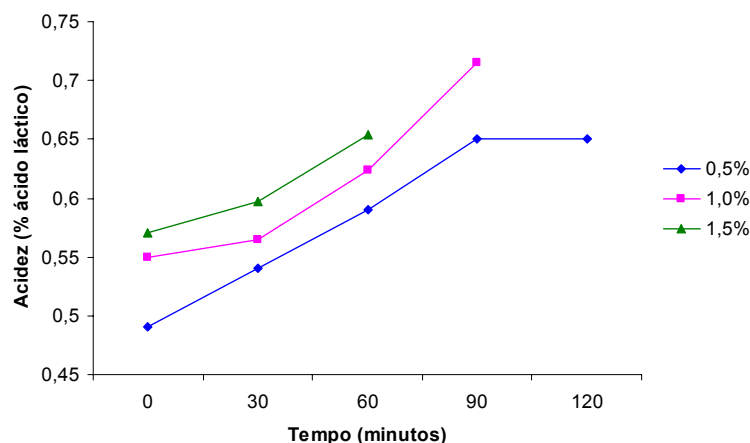


Figura 20 - Valores médios de acidez expressa em ácido láctico durante o processo de fermentação dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas.

Inicialmente as culturas do iogurte convertem parte da lactose em ácido láctico, originando uma diminuição do pH até um ponto em que a caseína se torna insolúvel e o leite mais viscoso. A produção gradual de ácido láctico começa por

desestabilizar os complexos de caseína e proteínas do soro desnaturadas, por solubilização do fosfato de cálcio e dos citratos. Os agregados de micelas de caseína e/ou micelas isoladas vão se associando e coalescem parcialmente à medida que se aproxima o valor de pH do ponto isoelétrico, ou seja, aproximadamente 4,6 a 4,7 (TAMIME & ROBINSON, 1991).

Segundo Tamime & Robinson (1991), a temperatura de inoculação da cultura láctica deve estar na faixa de 40 a 45°C por um período variável entre 2,5 a 5 horas, que lhe proporcionará condições ótimas de crescimento. Atualmente, as empresas visando a minimização de custos de processo produzem culturas mais concentradas que diminuem o tempo de fermentação dos produtos.

Algumas indústrias lácticas estabelecem o fim do processo fermentativo tão logo se evidencie o aspecto de gel lácteo. Uma das vantagens desta prática é produzir iogurtes mais suaves. Em alguns trabalhos verificou-se que em um pH levemente abaixo de 4,9 observava-se gel característico de iogurte. No entanto, quando a fermentação prossegue até pH 4,6 a estabilidade do produto potencializa-se (ANTUNES, 2004).

Pereira (2002) utilizando as culturas tradicionais (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) e probióticas (*L. acidophilus* e *Bifidobacterium* sp.) observou que o tipo de cultura afetou significativamente o tempo de fermentação dos iogurtes. A autora relatou que os produtos fermentados apenas pelas culturas tradicionais apresentaram maior tempo de fermentação.

Dave & Shah (1997) obtiveram tempos de fermentação que variaram de 3:50 a 6:00 horas utilizando culturas lácticas mistas compostas de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* na fabricação de iogurtes. Os produtos fabricados com *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* apresentaram tempos de fermentação maiores (6:50 a 11:00 horas). Provavelmente, a ausência de *L. bulgaricus* neste caso, tenha acarretado o aumento de tempo de fermentação destes produtos, uma vez que a relação simbiótica com *S. thermophilus* e a alta atividade proteolítica são importantes durante a fermentação. As culturas utilizadas neste estudo fermentaram em um menor tempo o substrato, provavelmente por apresentarem uma concentração maior de culturas lácticas, uma vez que, são comercializadas para uso doméstico.

4.2 Caracterização físico-química dos iogurtes

A Tabela 3 apresenta os resultados referentes aos valores médios e desvio padrão do teor de umidade, teor de cinzas, teor de extrato seco total (EST) e extrato seco desengordurado (ESD), teor de proteína e teor de gordura dos iogurtes fabricados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas (0,5%, 1,0% e 1,5%). Os gráficos referentes a caracterização físico-química estão apresentados no Apêndice II (Figura 31).

Tabela 3 - Caracterização físico-química dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas.

Análises	0,5%	1,0%	1,5%
Umidade (%)	78,01 ± 0,76	78,18 ± 0,91	78,41 ± 0,72
Cinzas (%)	0,81 ± 0,07	0,82 ± 0,08	0,73 ± 0,04
EST (%)	21,99 ± 0,07	21,82 ± 0,08	21,59 ± 0,04
ESD (%)	19,10 ± 0,52	18,67 ± 0,82	18,77 ± 0,73
Proteína (%)	4,99 ± 0,84	4,84 ± 0,13	5,21 ± 0,53
Gordura (%)	3,14 ± 0,11	3,15 ± 0,10	3,12 ± 0,09

Observou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos valores de umidade, cinzas, extrato seco total, extrato seco desengordurado, proteína e gordura entre as diferentes amostras de iogurtes obtidos da mesma matéria-prima, porém fabricados com diferentes concentrações de culturas tradicionais e probióticas, justificando-se que as variações de microrganismos utilizados no processo de fermentação não interferem na composição físico-química do produto final.

A composição do iogurte é similar à do leite, embora se reconheça que há algumas diferenças devido as mudanças ocorridas pela fermentação bacteriana sobre a lactose e pela adição de leite em pó, normalmente feita para aumentar os sólidos do leite, o que permite maior conteúdo protéico, além de presença de aditivos e flavorizantes (DEETH & TAMIME, 1981).

A Resolução Nº 5 de 13 de novembro de 2000, não contempla os requisitos físico-químicos como umidade, cinzas, EST e ESD, apresentando somente teor de gordura (g/100g), acidez (g de ácido láctico/100g) e proteínas lácteas (g/100g) (BRASIL, 2000).

De acordo com o artigo 476 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, do Ministério da Agricultura, o leite para ser considerado normal deve apresentar EST mínimo de 11,5% e ESD mínimo de 8,5% (BRASIL, 1952).

Segundo Neirotti & Oliveira (1988) a composição do leite deve apresentar em média 87% de umidade, 3,7% de proteínas (caseína, albumina e globulina) e 0,6% de cinzas.

O teor de umidade (78,01% - 0,5%; 78,18% - 1,0%; 78,41% - 1,5%) e o teor de cinzas (0,81% - 0,5%; 0,82% - 1,0%; 0,73% - 1,5%) das três amostras de iogurtes com diferentes concentrações de culturas lácticas apresentaram valores próximos aos estabelecidos para a principal matéria-prima do iogurte, o leite.

Em relação aos teores de EST (21,99% - 0,5%; 21,82% - 1,0%; 21,59% - 1,5%) e ESD (19,10% - 0,5%; 18,67% - 1,0%; 18,77% - 1,5%) das três amostras de iogurte observou-se que estes ficaram acima dos valores referentes ao leite, em função da adição de caseinato de cálcio que favorece o teor protéico do iogurte.

Os resultados do teor de proteína e o teor de gordura dos iogurtes com 0,5%, 1,0% e 1,5% de culturas lácticas tradicionais e probióticas foram respectivamente, 4,99%; 4,84%; 5,21% e 3,14%; 3,15%; 3,12% e estão de acordo com a legislação brasileira em vigor, que estabelece o mínimo de 2,9% de proteínas lácteas, quanto ao teor de gordura a resolução estabelece para iogurtes integrais uma faixa de 3,0 a 5,9%, para os semi-desnatados 0,6 a 2,9% e para os desnatados um máximo de 0,5% (BRASIL, 2000).

Tamime & Robinson (1991) em estudos afirmaram que durante o processo de elaboração de iogurtes há um aumento do teor de aminoácidos livres e peptídeos. As proteínas desempenham um importante papel na formação do coágulo e, portanto, a consistência e a viscosidade do produto é diretamente proporcional à concentração das mesmas.

Segundo Rasic & Kurman (1978), leites fermentados com maior teor de proteínas possuem um maior tempo de vida útil que controles produzidos sem aumento do teor de sólidos. Os autores atribuem esses efeitos ao aumento da inibição da degradação da lactose combinado com o aumento da capacidade tamponante.

O teor de gordura do leite afeta favoravelmente a qualidade do iogurte, a gordura estabiliza a contração do gel protéico, previne a separação do soro no produto final e afeta a percepção sensorial do produto, que apresenta textura mais macia e cremosa (THOMOPOULOS, TZIZ & MILKAS, 1993).

4.3 Valores de pH, acidez expressa em ácido láctico e do teor de lactose durante o período de armazenamento sob refrigeração (pós-acidificação)

As Figuras 21, 22 e 23 apresentam a evolução do valor de pH, acidez expressa em ácido láctico e teor de lactose dos produtos durante o tempo de estocagem. As tabelas com os valores médios e desvios padrão do valor de pH, acidez expressa em ácido láctico e teor de lactose para cada produto durante o período de armazenamento estão apresentadas no Apêndice III (Tabelas 11, 12 e 13).

Ao comparar os valores de pH e acidez expressa em ácido láctico obtidos no final da fermentação (Figuras 19 e 20) e os obtidos durante o período de estocagem (Figuras 21 e 22) verifica-se que houve um decréscimo do valor de pH e aumento da acidez expressa em ácido láctico durante o armazenamento refrigerado dos iogurtes devido à contínua produção de ácidos pelas bactérias lácticas. Segundo Beal *et alii* (1999) os iogurtes estão sujeitos ao decréscimo de pH e aumento da acidez durante a estocagem refrigerada, isso devido à persistente atividade das bactérias durante a estocagem do produto.

A Figura 21 apresenta a variação do valor de pH durante os 28 dias de armazenamento do produto. No primeiro dia de análise os valores de pH para as amostras de iogurtes com 0,5%, 1,0% e 1,5% de culturas lácticas, foram de $4,62 \pm 0,00$, $4,56 \pm 0,01$ e $4,54 \pm 0,00$, respectivamente, reduzindo gradativamente até alcançar $4,47 \pm 0,01$, $4,45 \pm 0,01$ e $4,45 \pm 0,01$ no 28º dia, correspondente ao

período final de estocagem. A redução do valor de pH foi de 3,25% para a amostra com 0,5% de culturas lácticas, 2,41% para a amostra com 1,0% de culturas lácticas e 1,98% para a amostra com 1,5% de culturas lácticas. A vida de prateleira do iogurte deve ser em torno de 30 dias, período no qual o produto deve manter suas características próprias, deste que adequadamente refrigerado (VEDAMUTHU, 1991c).

A diminuição nos valores de pH está relacionada à pós-acidificação do iogurte durante o armazenamento refrigerado. Oliveira & Damin (2002) também observaram ligeira diminuição do pH, quando estudaram a viabilidade de bactérias do iogurte e das culturas probióticas em leite fermentado sob refrigeração a 4°C durante o período de estocagem das amostras.

O valor do pH é importante, uma vez que o iogurte com baixa acidez (pH > 4,6) favorece a separação do soro porque o gel não foi suficientemente formado, por outro lado, em pH < 4,0, a contração do coágulo, devido à redução da hidratação das proteínas, também causa dessoramento (BRANDÃO, 1995).

No estudo apresentado apesar de ter fixado o término da fermentação em valores de pH superiores a 4,6 nos iogurtes, não ocorreu dessoramento das amostras, provavelmente pela produção de exopolissacarídeo pela cultura utilizada. Este composto formado age como um estabilizante, evitando o dessoramento (BRANDÃO, 1995).

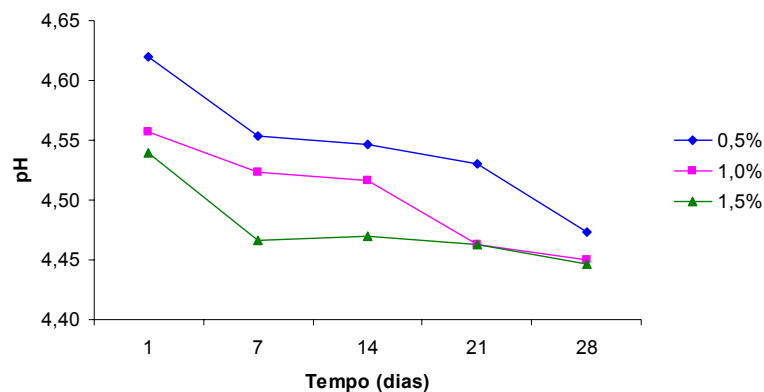


Figura 21 - Valores médios de pH durante o tempo de estocagem dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas.

A Figura 22 apresenta a variação da acidez expressa em ácido láctico do iogurte durante os 28 dias de armazenamento. No primeiro dia de análise os valores de acidez para as amostras de iogurtes com 0,5%, 1,0% e 1,5% de culturas lácticas, foram de $0,67 \pm 0,01$, $0,69 \pm 0,02$ e $0,72 \pm 0,01$, respectivamente, aumentando gradativamente até alcançar $0,81 \pm 0,01$, $0,86 \pm 0,01$ e $0,90 \pm 0,01$ de ácido láctico no 28º dia, correspondente ao período final de estocagem. O aumento da acidez foi de 20,89% para a amostra com 0,5% de culturas lácticas, 24,64% para a amostra com 1,0% de culturas lácticas e 25,0% para a amostra com 1,5% de culturas lácticas.

Os valores de acidez expressa em ácido láctico das diferentes amostras de iogurte, atendem ao estabelecido pela legislação brasileira em vigor, que deve apresentar uma acidez mínima de 0,6g de ácido láctico/100g de produto e máxima de 1,5g de ácido láctico/100g de produto (BRASIL, 2000).

Estudos realizados por Salji & Ismail (1983) mostraram que em iogurtes armazenados sob refrigeração, a acidez pode apresentar alterações em maior ou menor grau, dependendo do valor inicial da mesma, da temperatura de refrigeração, do tempo de armazenagem e do poder de pós-acidificação das culturas utilizadas.

Dave & Shah (1997) observaram um aumento na acidez depois de 35 dias de estocagem de um iogurte elaborado com culturas tradicionais e probióticas.

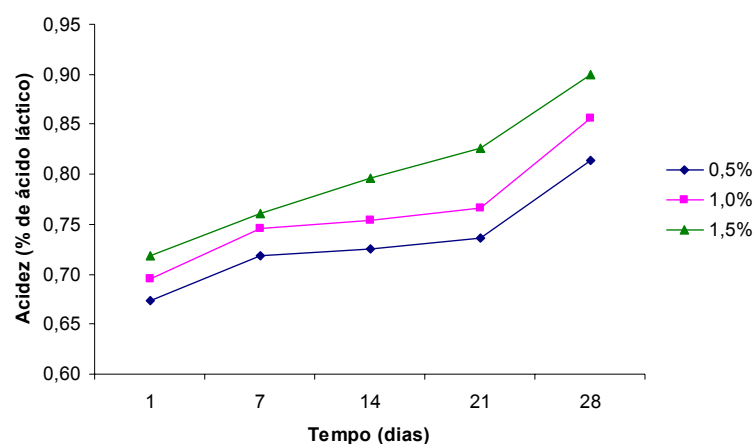


Figura 22 - Valores médios de acidez durante o tempo de estocagem dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas.

A Figura 23 apresenta a variação do teor de lactose durante os 28 dias de armazenamento do produto. No primeiro dia de análise os valores médios de lactose para as amostras de iogurtes com 0,5%, 1,0% e 1,5% de culturas lácticas, foram respectivamente $4,02 \pm 0,03$, $3,85 \pm 0,05$ e $3,72 \pm 0,03$, reduzindo gradativamente até alcançar $3,52 \pm 0,02$, $3,30 \pm 0,05$ e $3,20 \pm 0,03$ no 28º dia, correspondente ao período final de estocagem.

Segundo Tamime & Robinson (1991), a lactose é fonte de energia para os microrganismos do iogurte. A porcentagem de lactose consumida em média no final do período de armazenamento sob refrigeração das amostras de iogurtes (valor médio do teor de lactose correspondente ao 28º dia de análise) comparada com o percentual médio de lactose da formulação inicial ($4,01 \pm 0,14$) foi de 12,22% para a amostra com 0,5% de culturas lácticas, 17,70% para a amostra com 1,0% de culturas lácticas e 20,20% para a amostra com 1,5% de culturas lácticas.

Os valores apresentados de consumo de lactose estão de acordo com a literatura que cita um consumo entre 10 e 30% de lactose durante a fermentação e armazenamento dos iogurtes (GALVÃO, FERNANDES & SWAMURA, 1995).

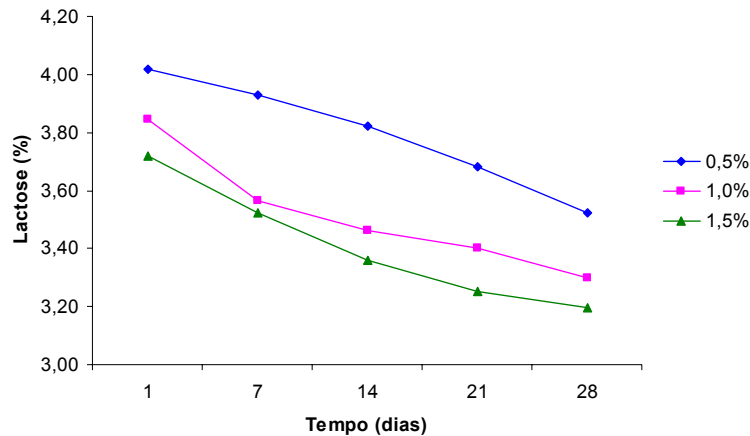


Figura 23 - Valores médios do teor de lactose durante o tempo de estocagem dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas.

As diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas afetaram os valores de pH, acidez expressa em ácido láctico e teor de lactose dos iogurtes. A amostra com 1,5% de culturas lácticas apresentou uma maior queda no valor de pH e maior aumento de acidez conseqüentemente uma maior pós-acidificação ao longo da vida de prateleira dos produtos. Além disso, houve um maior consumo de lactose durante o período de estocagem refrigerada.

4.4 Contagem das bactérias lácticas durante o tempo de estocagem

As Tabelas 4 e 5 apresentam os valores médios (UFC/mL) das contagens de bactérias lácticas tradicionais *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbruecki* ssp. *bulgaricus* dos iogurtes com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas (0,5%, 1,0% e 1,5%) durante o período de armazenamento à 4°C. As curvas médias e tabelas com valores médios e desvios padrão em log₁₀ UFC/mL da contagem de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* dos produtos obtidos durante o tempo de estocagem estão apresentadas no Apêndice IV (Figura 32 - Tabela 14; Figura 33 - Tabela 15).

4.4.1 Contagem de bactérias tradicionais *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbruecki* ssp. *bulgaricus*

Tabela 4 - Contagem média do número de células viáveis de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas durante o tempo de estocagem (UFC/mL).

Tempo de estocagem (dia)	0,5%	1,0%	1,5%
1	1,38 x 10 ⁹	8,38 x 10 ⁸	2,75 x 10 ⁸
7	1,02 x 10 ⁹	1,03 x 10 ⁹	1,08 x 10 ⁹
14	1,02 x 10 ⁹	7,08 x 10 ⁸	8,10 x 10 ⁸
21	7,75 x 10 ⁸	6,93 x 10 ⁸	7,88 x 10 ⁸
28	3,83 x 10 ⁸	5,20 x 10 ⁸	9,30 x 10 ⁸

Tabela 5 - Contagem média do número de células viáveis de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas durante o tempo de estocagem (UFC/mL).

Tempo de estocagem (dia)	0,5%	1,0%	1,5%
1	$1,95 \times 10^7$	$1,26 \times 10^7$	$9,33 \times 10^6$
7	$1,20 \times 10^7$	$1,55 \times 10^7$	$1,96 \times 10^7$
14	$7,98 \times 10^6$	$1,04 \times 10^7$	$1,01 \times 10^7$
21	$3,49 \times 10^7$	$5,98 \times 10^6$	$4,30 \times 10^6$
28	$4,14 \times 10^6$	$2,14 \times 10^6$	$2,62 \times 10^6$

A contagem do número de células viáveis do microrganismo tradicional *S. thermophilus* permaneceu entre $1,38 \times 10^9$ a $3,83 \times 10^8$ para iogurtes com 0,5% de culturas lácticas, $1,03 \times 10^9$ a $5,20 \times 10^8$ para iogurtes com 1,0% de culturas lácticas e $1,08 \times 10^9$ a $2,75 \times 10^8$ para o iogurte com 1,5% de culturas lácticas. Observa-se uma redução de aproximadamente 0,5, 0,3 e 0,6 ciclos logarítmicos para as amostras de iogurte com 0,5%, 1,0% e 1,5% de culturas lácticas, respectivamente após 28 dias de estocagem.

A contagem do microrganismo tradicional *L. bulgaricus* permaneceu entre $3,49 \times 10^7$ a $4,14 \times 10^6$ para iogurtes com 0,5% de culturas lácticas, $1,55 \times 10^7$ a $2,14 \times 10^6$ para iogurtes com 1,0% de culturas lácticas e $1,96 \times 10^7$ a $2,62 \times 10^6$ para o iogurte com 1,5% de culturas lácticas. Observa-se uma redução de aproximadamente 0,9, 1,0 e 0,9 ciclos logarítmicos para as amostras de iogurte com 0,5%, 1,0% e 1,5% de culturas lácticas, respectivamente após 28 dias de estocagem.

A manutenção do número de células viáveis da bactéria láctica tradicional *S. thermophilus* atende aos valores estabelecidos pela legislação brasileira em vigor, que, segundo os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados, Resolução N° 5, 13 de novembro de 2000, onde a contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^7 UFC/mL no produto final, durante todo o prazo de validade e, no caso em que mencione(m) o uso de Bifidobactérias, a contagem será de 10^6 UFC/mL. No presente estudo o microrganismo tradicional *L.*

bulgaricus apresentou valores inferiores ao estabelecido pela legislação, o que provavelmente não se traduz como uma redução importante do ponto de vista tecnológico (BRASIL, 2000). Ressalta-se que a legislação não separa os microrganismos, portanto, na enumeração geral as amostras de iogurtes estavam de acordo com os padrões preconizados.

Estudos têm mostrado que as bactérias do iogurte (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) sobrevivem bem no produto durante a vida de prateleira (DONKOR *et alii*, 2006). O *L. bulgaricus* é o principal responsável pela pós-acidificação dos iogurtes, mas por outro lado, contribui consideravelmente para a produção de compostos aromáticos, especialmente o acetaldeído, característico do iogurte (GUYOT, 1992).

De acordo com Tamime & Robinson (1991) o valor de pH implica na atividade metabólica das bactérias, podendo favorecer um determinado grupo, em detrimento do outro. No caso do iogurte, bactérias do gênero *Lactobacillus* crescem e toleram valores de pH mais baixos do que as pertencentes ao gênero *Streptococcus*.

Segundo Lourens-Hattingh & Viljoen (2001), uma excessiva pós-acidificação (acidificação indesejada ao produto) ocorre, principalmente, devido ao crescimento incontrolável de *L. bulgaricus* nas temperaturas de refrigeração e a baixos valores de pH. Portanto, as indústrias fabricantes de culturas lácticas fornecem culturas tradicionais de iogurte com uma menor concentração de *L. bulgaricus* e uma maior concentração de *S. thermophilus*. A redução na contagem de *L. bulgaricus* no produto final contribui para diminuir a pós-acidificação do iogurte durante a vida de prateleira. Isto é importante tanto para garantir ao produto final um sabor suave, quanto para evitar efeitos adversos do pH baixo sobre as bactérias probióticas (DAVE & SHAH, 1997b).

Rybka & Kailasapathy (1995) observaram uma maior contagem no número de células viáveis de *S. thermophilus* nos iogurtes inoculados com culturas probióticas, a qual variou de 10^9 - 10^7 UFC/mL durante 36 dias de estocagem.

A presença de carboidratos na mistura base pode inibir o crescimento dos microrganismos do iogurte. Estudos comprovaram uma diminuição na velocidade de produção de ácido pelo *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* quando se aumenta a concentração de açúcar de 6 para 12%. Um exame microscópico dos diferentes tipos de iogurte mostrou que o *S. thermophilus* apresentou maior tolerância a altas

concentrações de açúcar que o *L. bulgaricus*. Esta tolerância, das culturas depende da linhagem utilizada, sendo aconselhável uma cuidadosa seleção. A inibição do crescimento das culturas do iogurte com um extrato seco total de 14 - 16% adicionado de açúcar (10 - 12%), se deve principalmente ao efeito osmótico adverso dos solutos do leite, assim como a baixa atividade de água (A_w) (TAMIME & ROBINSON, 1991).

4.4.2 Contagem de bactérias probióticas *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* sp.

As Tabelas 6 e 7 apresentam os valores médios (UFC/mL) das contagens de bactérias lácticas probióticas *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* sp. dos iogurtes com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas (0,5%, 1,0% e 1,5%) durante o período de armazenamento à 4°C. As curvas médias e tabelas com valores médios e desvio padrão em \log_{10} UFC/mL da contagem de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* sp. dos produtos obtidos durante o tempo de estocagem estão apresentadas no Apêndice IV (Figura 34 - Tabela 16; Figura 35 - Tabela 17).

Tabela 6 - Contagem média do número de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas durante o tempo de estocagem (UFC/mL).

Tempo de estocagem (dia)	0,5%	1,0%	1,5%
1	$1,60 \times 10^9$	$9,08 \times 10^8$	$4,56 \times 10^8$
7	$1,29 \times 10^9$	$1,07 \times 10^9$	$1,33 \times 10^9$
14	$9,63 \times 10^8$	$7,30 \times 10^8$	$6,81 \times 10^8$
21	$8,05 \times 10^8$	$7,03 \times 10^8$	$6,23 \times 10^8$
28	$8,33 \times 10^8$	$6,78 \times 10^8$	$7,35 \times 10^8$

Tabela 7 - Contagem média do número de células viáveis de *Bifidobacterium* sp. dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas durante o tempo de estocagem (UFC/mL).

Tempo de estocagem (dia)	0,5%	1,0%	1,5%
1	$2,12 \times 10^6$	$3,66 \times 10^6$	$1,07 \times 10^7$
7	$4,14 \times 10^6$	$1,21 \times 10^7$	$1,37 \times 10^7$
14	$4,93 \times 10^6$	$2,62 \times 10^6$	$7,57 \times 10^6$
21	$3,67 \times 10^6$	$1,12 \times 10^7$	$1,53 \times 10^7$
28	$3,10 \times 10^6$	$5,70 \times 10^6$	$1,25 \times 10^7$

A contagem do número de células viáveis do microrganismo probiótico *L. acidophilus* permaneceu entre $1,60 \times 10^9$ a $8,05 \times 10^8$ para iogurtes com 0,5% de culturas lácticas, $1,07 \times 10^9$ a $6,78 \times 10^8$ para iogurtes com 1,0% de culturas lácticas e $1,33 \times 10^9$ a $4,56 \times 10^8$ para o iogurte com 1,5% de culturas lácticas. Observa-se uma redução de aproximadamente 0,3, 0,2 e 0,6 ciclos logarítmicos para as amostras de iogurte com 0,5%, 1,0% e 1,5% de culturas lácticas, respectivamente após 28 dias de estocagem.

A contagem do número de células viáveis do microrganismo probiótico *Bifidobacterium* sp. permaneceu entre $4,93 \times 10^6$ a $2,12 \times 10^6$ para iogurtes com 0,5% de culturas lácticas, $1,21 \times 10^7$ a $2,62 \times 10^6$ para iogurtes com 1,0% de culturas lácticas e $1,53 \times 10^7$ a $7,57 \times 10^6$ para o iogurte com 1,5% de culturas lácticas. Observa-se uma redução de aproximadamente 0,4, 1,0 e 0,3 ciclos logarítmicos para as amostras de iogurte com 0,5%, 1,0% e 1,5% de culturas lácticas, respectivamente após 28 dias de estocagem.

Os valores encontrados para a contagem das bactérias probióticas estão de acordo com os valores estabelecido pelos Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados, Resolução N° 5, 13 de novembro de 2000, onde a contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^7 UFC/mL no produto final, durante todo o prazo de validade e, no caso em que mencione(m) o uso de Bifidobactérias, a contagem será de 10^6 UFC/mL (BRASIL, 2000).

A atividade metabólica de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* durante a armazenagem resulta na produção de ácidos orgânicos que futuramente podem afetar a viabilidade das células probióticas (DONKOR *et alii*, 2006). Embora *L. acidophilus* tolere a acidez, um rápido decréscimo no seu número foi observado sob condições ácidas. Bifidobactérias não são tão tolerantes ao ácido quanto *L. acidophilus*; o crescimento dos últimos organismos cessa a um pH menor que 4,0, enquanto o crescimento de *Bifidobacterium* sp. é retardado a pH abaixo de 5,0 (SHAH & LANKAPUTHRA, 1997).

Mesmo com a pós-acidificação os produtos não atingiram pH < 4,0 (Figura 21), sendo este valor prejudicial à sobrevivência das bactérias probióticas (SHAH & RAVULA, 2000).

Os valores observados neste trabalho estão semelhantes aos encontrados por Dave & Shah (1997) que obtiveram, uma contagem de células viáveis de *L. acidophilus* que variou de $3,9 \times 10^7$ para $1,2 \times 10^6$ UFC/mL. Dave & Shah (1997) e Rybka & Kailasapathy (1995) que observaram uma contagem no número de células viáveis para *Bifidobacterium* ssp. que diminui de $1,6 \times 10^7$ para $4,9 \times 10^5$ UFC/mL e que *L. acidophilus* pode sobreviver no iogurte a níveis suficientes ($> 10^6$ UFC/mL) por até 28 dias.

A variação da viabilidade probiótica nas amostras utilizadas por diferentes autores pode ser provavelmente atribuída a diferenças comportamentais dos microrganismos e a influência de fatores como acidez, pH, outras bactérias iniciais, e oxigênio dissolvido no leite (GUEIMONDE *et alii*, 2004; SHAH, 2000).

Segundo Charteris *et alii* (1997), Dave & Shah (1997), a viabilidade das bactérias probióticas armazenadas sob refrigeração e baixo pH, por longos períodos pode diminuir, e ainda, a viabilidade do *L. acidophilus* pode ser afetada pela presença do *L. bulgaricus*.

O peróxido de hidrogênio produzido por *L. bulgaricus* apresenta efeito antimicrobiano, afetando o crescimento de bactérias probióticas (DAVE & SHAH, 1997b; DAVE & SHAH, 1998). Samona & Robinson (1994) citam ainda a secreção de bacteriocinas por *L. bulgaricus*, podendo comprometer a sobrevivência de bifidobactérias.

A sobrevivência das bactérias probióticas em produtos lácteos fermentados depende de vários fatores, tais como a linhagem utilizada, interação entre as espécies presentes, condições da cultura, composição química do meio (fonte de carboidrato), acidez final, conteúdo de sólidos do leite, disponibilidade de nutrientes, promotores e inibidores do crescimento, concentração de açúcar (pressão osmótica), oxigênio dissolvido (especialmente para a *Bifidobacterium* sp.), quantidade inoculada, temperatura de incubação, tempo de temperatura de estocagem (KAILASAPATHY & RYBKA, 1997; LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001).

Os resultados mostraram que com a utilização de culturas contendo microrganismos probióticos, o produto apresentou contagem suficiente para promover efeitos terapêuticos à saúde do consumidor, além de contribuir para os efeitos tecnológicos, como reduzir a pós-acidificação do iogurte e leites fermentados, fato evidenciado pela ação de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* sp. (ANTUNES, 2001).

Contagens inferiores de culturas probióticas foram observadas por Vinderola, Bailo & Reinheimer (2000), ao estudarem a viabilidade de bactérias do iogurte durante a estocagem refrigerada à 5°C por quatro semanas, observaram que o nível de perda de viabilidade depende do tipo de iogurte (firme ou líquido, semi-desnatado ou integral) e da cultura láctica utilizada. As contagens iniciais de *L. acidophilus* e *B. bifidum* variaram de 10^6 a 10^7 UFC/mL, enquanto que no final da estocagem eram menores que 10^4 UFC/mL.

Apesar da importância da viabilidade dessas bactérias benéficas, pesquisas conduzidas na Austrália e na Europa, têm mostrado uma precária viabilidade da bactéria probiótica, especialmente bifidobactérias, em preparações de iogurte (SHAH & LANKAPUTHRA, 1997; LANKAPUTHRA, SHAH & BRITZ, 1996b).

Bactérias probióticas devem, após a ingestão, alcançar o intestino em níveis elevados para ser capaz de sobreviver, aderir as paredes intestinais, multiplicar-se e, talvez, exercer seus efeitos de promoção da saúde. Conseqüentemente, a viabilidade de espécies probióticas durante a armazenagem de leite fermentado é muito importante (AWAISHEH, HADDADIN & ROBINSON, 2005).

Com o objetivo de solucionar a sobrevivência dos organismos probióticos, diferentes perspectivas tem sido utilizadas, incluindo culturas selecionadas,

microencapsulação e adição de prebióticos (DONKOR *et alii*, 2006). Prebióticos são geralmente adicionados a produtos lácteos para seletivamente estimular o crescimento de probióticos selecionados tais como *Bifidobacterium* sp. no intestino humano. Vários estudos têm mostrado a melhora do crescimento e atividades de *Bifidobacterium* sp. com inulina (AKALIN, FENDERYA & AKBULUT, 2004).

Segundo Donkor *et alii* (2006), embora a inulina não enriqueça a viabilidade de organismos probióticos durante a estocagem, observou-se um efeito significativo no desempenho do crescimento inicial de probióticos e uma melhor retenção da viabilidade, independentemente de sua concentração, durante o período de estocagem. Similarmente, houve uma melhora substancial no crescimento das culturas do iogurte (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) na presença de inulina.

Neste trabalho a adição de inulina na formulação inicial destinada a elaboração dos iogurtes com diferentes concentrações de culturas tradicionais e probióticas, provavelmente contribuiu para a viabilidade dos probióticos durante o período de estocagem, como pode ser observado nas Figura 34 - Tabela 16 e Figura 35 - Tabela 17 (Apêndice IV). Além disso, a redução no número de células viáveis de *L. bulgaricus* favoreceu a viabilidade das bactérias probióticas.

4.5 Determinação da viscosidade

A viscosidade é a propriedade inversa da fluidez, ou seja, é a resistência do alimento a sofrer deslocamentos quando submetido a uma força externa, como a agitação. É uma propriedade básica que caracteriza o comportamento de escoamento e importante na aceitação de muitos alimentos (BOBBIO & BOBBIO, 1995). A tabela com a descrição dos valores de viscosidade dos iogurtes está apresentada no Apêndice V (Tabela 18).

Wolfschoon-Pombo, Granzinoli & Fernandes (1983) afirmam que a viscosidade, a consistência e a estabilidade do iogurte podem ser influenciadas por fatores como a homogeneização, o tratamento térmico, a acidificação, a temperatura de incubação e as condições de armazenamento.

Para um melhor entendimento dos resultados das amostras elaboradas neste trabalho, estas foram comparadas com amostras comerciais de iogurtes probióticos (líquido e tradicional).

As amostras de iogurtes adicionados de diferentes concentrações de culturas probióticas, como também as amostras comerciais apresentaram comportamento pseudoplástico (Figura 24), ou seja, a viscosidade diminuiu com o aumento da taxa de deformação, diminuindo a sensação de gomosidade durante a mastigação (DUBOC & BEAT, 2001).

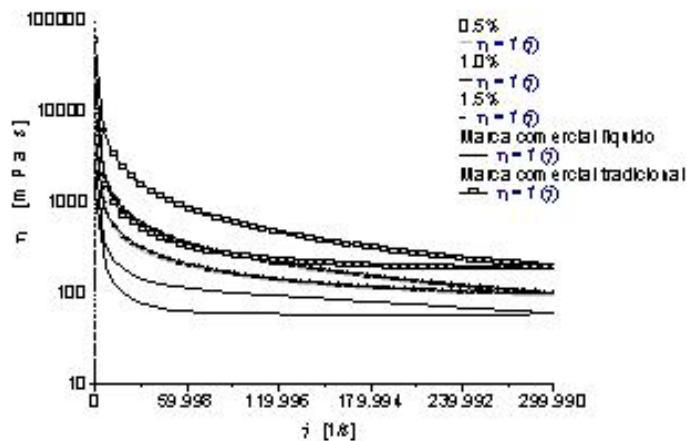


Figura 24 - Viscosidade a 10°C de iogurtes adicionados de diferentes concentrações de culturas tradicionais e probióticas e de amostras comerciais de iogurtes probióticos (líquido e tradicional).

A viscosidade dos iogurtes foi fracamente influenciada pela concentração da cultura probiótica (Figura 24). Na taxa de deformação $55s^{-1}$ a viscosidade obtida para o iogurte adicionado de 0,5% de culturas lácticas foi 369mPa.s, com 1,0% de culturas lácticas 382mPa.s e com 1,5% de cultura lácticas 388mPa.s. Entretanto, a viscosidade dos iogurtes produzidos foi significativamente diferente das amostras comerciais, tanto para o iogurte líquido (116mPa.s) quanto o iogurte tradicional (924mPa.s).

As bactérias ácido lácticas (LAB) utilizadas para fermentar produtos lácteos sintetizam ácidos graxos de cadeia curta, vitaminas e exopolossacarídeos (EPS) (SHENE & BRAVO, 2006), sendo que este último tem uma importante função como agente *bio-thickening* natural para melhorar a reologia do produto fermentado, como estabilizador físico e para reter água e limitar a sinérese (DUBOC & BEAT, 2001).

A viscosidade dos iogurtes desenvolvidos no estudo provavelmente foi maior em função da adição de culturas lácticas tradicionais e probióticas. Em estudos desenvolvidos por Hassan *et alii* (1996) e Teggatz (1990), observou-se que a maior consistência no iogurte é atribuída à produção de exopolissacarídeos pela cultura.

Além disso, os iogurtes foram desenvolvidos com caseinato de cálcio que resultou no aumento do conteúdo de sólidos totais da mistura destinada à elaboração do iogurte, proporcionando uma maior consistência e viscosidade do produto final (MISTRY & HASSAN, 1992; TAMIME & ROBINSON, 1991).

4.6 Determinação da cor dos iogurtes

A Tabela 8 apresenta os resultados referentes aos valores médios e desvio padrão dos parâmetros luminosidade (L^*) e coordenadas de cromaticidade (a^* e b^*) utilizados para a determinação da cor dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas (0,5%, 1,0% e 1,5%).

Tabela 8 - Parâmetros de cor: luminosidade (L^*) e coordenadas de cromaticidade (a^* e b^*) dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas.

logurtes	L^*	a^*	b^*
0,5%	82,80 ^b ± 0,39	16,72 ^c ± 0,01	13,94 ^a ± 0,35
1,0%	83,99 ^a ± 0,16	18,46 ^b ± 0,14	12,15 ^b ± 0,55
1,5%	83,74 ^a ± 0,11	19,28 ^a ± 0,03	12,45 ^b ± 0,27

*Os valores com a mesma letra, não diferiram significativamente entre si (Teste de Tukey ao nível de 5% de significância).

A determinação da cor das três amostras de iogurtes desenvolvidos foi realizada durante o período de armazenagem sob refrigeração.

O valor de L^* do iogurte com 0,5% de culturas lácticas apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos iogurtes com 1,0% e 1,5% de culturas

láticas, este valor representa que amostras são escuras, uma vez que, o parâmetro L^* , indica a luminosidade e pode determinar valores entre zero (0) e cem (100), sendo denominado preto e branco, respectivamente. Uma redução nos valores de L^* provavelmente é causada devido a incorporação de constituintes no produto como inulina (fibra), caseinato de cálcio e açúcar favorecendo a absorção e a redução de água livre em função do aumento de sólidos totais, resultando em uma menor sinérese durante a estocagem do produto e conseqüentemente menor reflexão de luz (GARCÍA-PÉREZ *et alii*, 2005).

Em relação aos valores de a^* observa-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as três amostras. O valor de b^* do iogurte com 0,5% de culturas láticas apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado as demais amostras que não diferiram entre si. As coordenadas de cromaticidade a^* e b^* indicam as direções das cores, desta forma, $a^* > 0$ é a direção do vermelho, $a^* < 0$ é a direção do verde; $b^* > 0$ é a direção do amarelo e $b^* < 0$ é a direção do azul (MINOLTA, 1994). Os valores de a^* foram positivos ($+a^*$), em direção ao vermelho e os valores de b^* foram positivos ($+b^*$), em direção ao amarelo, estes resultados ocorreram provavelmente em função da adição de corante vermelho em pó nas diferentes amostras de iogurtes.

Segundo García-Pérez *et alii* (2005), estudando cor em iogurte, verificaram que diferenças não significativas nos parâmetros, foram observadas até 120 a 150 minutos de fermentação, depois, os valores de L^* iniciaram um declínio e os valores de a^* e b^* um aumento, concluindo-se que a cor no iogurte depende do pH. A um pH de 4,8, a solubilização de fosfato de cálcio a partir da micela de caseína é maximizado, permitindo então a dissociação das proteínas em subunidade de micela de caseína dentro da fase sérica do leite, aumentando a permeabilidade da micela. Efeito semelhante foi encontrado neste trabalho, onde o menor valor de L^* foi encontrado na amostra com 0,5% de culturas láticas. Valores maiores de a^* e b^* foram observados na amostra com 1,5% de cultura láctica.

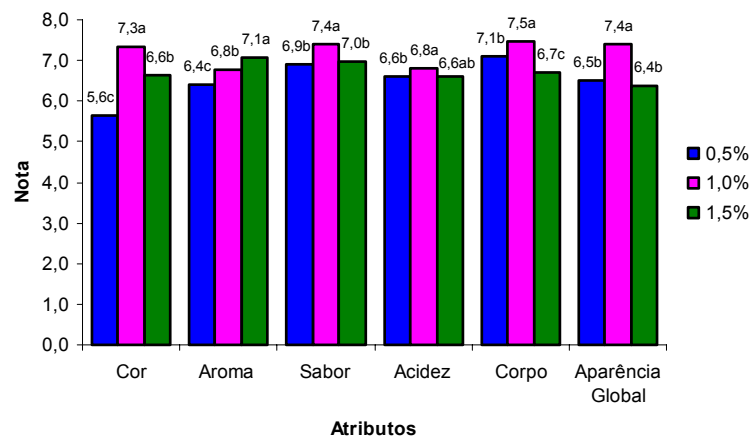
Roefs *et alii* (1985) demonstrou que o tamanho das micelas de caseína foi mínimo a um pH de 5,2. A diminuição do valor de L^* é atribuída, provavelmente a redução do tamanho das micelas de caseína aumentou o teor protéico do produto, resultando no escurecimento da amostra.

De acordo com García-Pérez *et alii* (2005), a esterilização da mistura (leite, açúcar, leite em pó e fibra) utilizada na produção dos iogurtes, induz uma desestabilidade nas micelas de caseínas que aumentam os valores de a^* e b^* , fato este observado neste trabalho onde a mistura era composta por leite, açúcar, caseinato de cálcio e inulina.

Em estudos recentes observou-se que a refrigeração do iogurte depois da fermentação aumentou L^* (mais esbranquiçado), b^* (mais amarelado), e valores de a^* (menos esverdeado) dos iogurtes (GARCÍA-PÉREZ *et alii*, 2005).

4.7 Análise sensorial dos iogurtes

Na Figura 25 observam-se os valores médios de cor, aroma, sabor, acidez, corpo e aparência global dos iogurtes elaborados com diferentes culturas lácticas tradicionais e probióticas, atribuídos pelos julgadores.



*Os valores com a mesma letra, não diferiram significativamente entre si (Teste de Tukey ao nível de 5% de significância).

Figura 25 - Valores médios dos atributos cor, aroma, sabor, acidez, corpo e aparência global dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas.

De maneira geral, as amostras apresentaram diferenças significativas em relação aos atributos avaliados ($p < 0,05$).

Em relação ao atributo cor, aroma e corpo observou-se que houve diferença significativa entre as três amostras, o iogurte com 1,0% de culturas lácticas recebeu

maior nota em relação a cor e corpo (valor médio 7,3 e 7,5, respectivamente). O iogurte com 1,5% de culturas lácticas obteve maior nota para o atributo aroma (valor médio 7,1).

O iogurte com 1,0% de culturas lácticas apresentou valores maiores de nota em relação aos atributos sabor (valor médio 7,4), acidez (valor médio 6,8) e aparência global (valor médio 7,4) quando comparado as amostras de iogurte com 0,5% e 1,5% de culturas lácticas que não diferiram estatisticamente entre si.

Os valores médios das notas apresentadas para os diferentes atributos avaliados, foram correspondentes a “gostei”.

A primeira impressão que se tem de um alimento é geralmente visual, sendo que a cor é um dos aspectos fundamentais na qualidade e aceitação do produto. A cor dos alimentos resulta da presença de compostos coloridos já existentes no produto natural (pigmentos naturais), ou da adição de corantes sintéticos (BOBBIO & BOBBIO, 1995). Foi observado que os produtos apresentaram cor característica, sem grumos e com aspecto homogêneo, além de um suave sabor ácido.

O sabor e aroma do iogurte dependem inteiramente da cultura e de seu metabolismo durante a fermentação. Sabores e odores estranhos são geralmente causados por subprodutos da fermentação inadequada. Estes atributos devem-se ao ácido láctico e em quantidades muito pequenas de acetaldeído, diacetil e ácido acético e dependem também do tipo e da qualidade dos ingredientes utilizados na mistura do iogurte, do tempo e da temperatura de fermentação (VEDAMUTHU, 1991b).

Segundo Man & Jones (1996), o aumento da acidez pode alterar o perfil de sabor dos iogurtes, diminuindo a preferência do produto.

O corpo do iogurte é devido, principalmente aos ingredientes acrescentados durante o processo de fabricação. Deve possuir suficiente viscosidade para resistir ao manuseio normal durante todo o processo e armazenamento. A contração do coágulo e a separação do soro durante o envase são considerados defeitos do corpo. A separação do soro não é apenas prejuízo na aparência visual, mas também revela problemas de corpo e textura do produto (PINHEIRO, 2003).

A aparência global é traduzida pelo “conjunto”, relativa à primeira impressão causada pelo produto como um todo, sem representar a média das notas das outras características avaliadas.

4.7.1 Teste de preferência

De acordo com o Teste de Ordenação de Preferência dos iogurtes realizado por 30 julgadores, os resultados mostraram que o iogurte fabricado com 1,0% de culturas lácticas tradicionais e probióticas obteve uma maior preferência (primeira opção), enquanto que o iogurte com 1,5% de culturas foi eleito como segunda opção e os iogurtes com 0,5% e 1,5% de culturas com terceira opção, conforme as Figuras 26, 27 e 28.

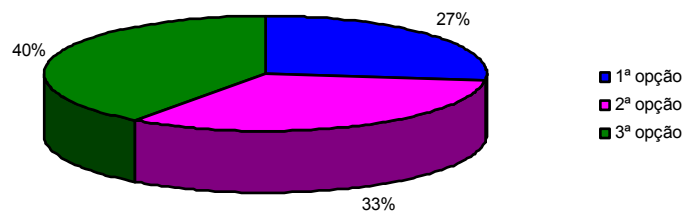


Figura 26 - Respostas dos provadores em relação ao Teste de Ordenação de preferência do iogurte elaborado com 0,5% de culturas lácticas tradicionais e probióticas.

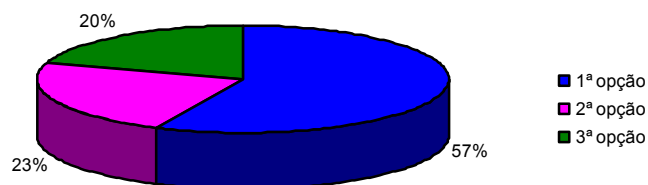


Figura 27 - Respostas dos provadores em relação ao Teste de Ordenação de preferência do iogurte elaborado com 1,0% de culturas lácticas tradicionais e probióticas.

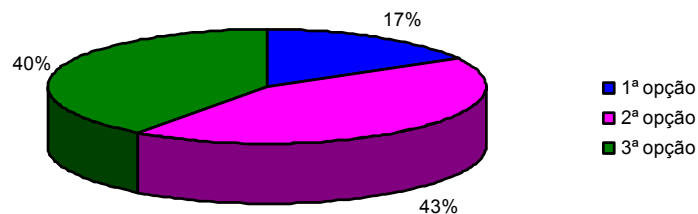


Figura 28 - Respostas dos provadores em relação ao Teste de Ordenação de preferência do iogurte elaborado com 1,5% de culturas lácticas tradicionais e probióticas.

Os resultados foram analisados através da tabela de Newell e MacFarlane (DUTCOSKI, 1996), onde não houve diferenças significativas entre as amostras, porém pode-se observar uma tendência de preferência para amostra com 1,0% de culturas lácticas.

4.7.2 Avaliação do consumo de iogurtes e intenção de compra

O Teste de Frequência de Consumo foi realizado com 30 provadores. Os resultados referentes ao consumo de iogurte foram: 30% consomem todos os dias, 43% uma vez por semana, 17% a cada 15 dias e 10% uma vez por mês, conforme a Figura 29.

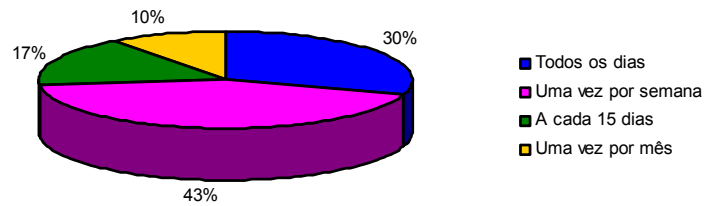


Figura 29 - Respostas dos provadores em relação a frequência do consumo de iogurte.

Através do Teste de Atitude do Consumidor foi observado que, caso o produto, escolhido com preferido no Teste de Ordenação de Preferência que foi o iogurte com 1,0% de culturas, fosse comercializado a maioria dos consumidores, ou seja, 97% provavelmente compraria, enquanto 3% dos consumidores não comprariam o iogurte, conforme a Figura 30.

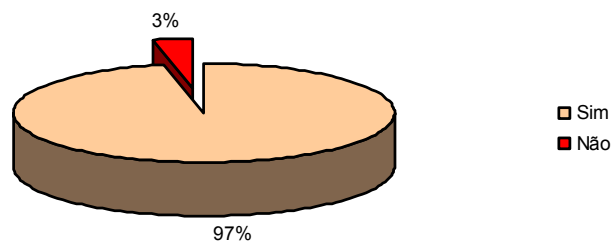


Figura 30 - Respostas dos provadores em relação a intenção de compra do iogurte elaborado com 1,0% de culturas lácticas tradicionais e probióticas desenvolvido no estudo.

4.7.3 Teste de aceitação – Crianças

De acordo com o Teste de Preferência realizado pelos adultos, a amostra contendo 1,0% de cultura foi selecionada para ser testada com 35 crianças da creche Ipê Amarelo da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Amostras que apresentam o I.A. (Índice de Aceitação) superior a 70% indicam que o produto será

aceito pelos consumidores. No caso da amostra avaliada o índice foi de 100%, ou seja, todas as crianças aprovaram o produto testado.

5 CONCLUSÃO

Através desta pesquisa foi possível concluir que:

- As diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas (0,5%, 1,0% e 1,5%) adicionadas na formulação inicial influenciaram o tempo de fermentação.

- Os iogurtes com diferentes concentração de culturas tradicionais e probióticas (0,5%, 1,0% e 1,5%) não apresentaram diferenças significativas em relação as características físico-químicas.

- Os valores de pH decresceram em função da produção de ácido láctico durante o período de estocagem refrigerada para todos os produtos obtidos caracterizando a pós-acidificação. Houve diferenças significativas nos valores de pH e acidez, entre as diferentes amostras de iogurte, em função da concentração de culturas tradicionais e probióticas. Os valores de acidez estão de acordo com o proposto pela legislação brasileira.

- O teor de lactose apresentou uma redução para os iogurtes com diferentes concentrações de culturas tradicionais e probióticas.

- Durante o tempo de estocagem, o número de células viáveis de *S. thermophilus* atende aos valores estabelecidos pela legislação brasileira em vigor, no entanto, *L. bulgaricus* apresentou valores inferiores ao esperado, no entanto, a legislação não prevê a enumeração dos microrganismos separadamente.

- O número de bactérias viáveis das culturas lácticas probióticas (*L. acidophilus* e *Bifidobacterium* sp.) estão de acordo com o padrão estabelecido pela legislação brasileira. O produto apresentou contagem suficiente para promover efeitos terapêuticos à saúde do consumidor.

- A viscosidade dos iogurtes foi fracamente influenciada pelas diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas, não houve diferenças significativas entre as amostras.

- Nos parâmetros de cor a coordenada de cromaticidade a^* ($a^* > 0$ vermelho, $a^* < 0$ verde) apresentaram diferenças significativas para as amostras de iogurtes com 0,5%, 1,0% e 1,5% de culturas tradicionais e probióticas.

- De maneira geral o iogurte com 1,0% de culturas lácticas obteve as melhores notas para os atributos cor, sabor, acidez, corpo e aparência global.

- No Teste de Preferência a amostra com 1,0% de culturas lácticas foi eleita a preferida de acordo com os julgadores.

- No teste realizado com crianças o produto contendo 1,0% de culturas lácticas obteve 100% de aceitação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, **Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional ou de Saúde**, Resolução RDC nº 2, 7 de janeiro de 2002.

AKALIN, A. S.; FENDERYA, S.; AKBULUT, N. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 613-621, 2004.

ANDERSON H.; ASP, N.; BRUCE, A.; ROOS, S.; WADSTROM, T.; WOLD, A. E. Health effects of probiotics and prebiotics: a literature review on human studies. **Scandinavian Journal of Nutrition**, v. 45, p. 58-75, 2001.

ANTUNES, A. E. C. **Influência do concentrado protéico do soro de leite e de culturas probióticas nas propriedades de iogurtes naturais desnatados**. 2004. 219 p. Tese de Doutorado (Doutora em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. 2004.

ANTUNES, L. A. F. Microrganismos probióticos e alimentos funcionais. **Indústria de Laticínios**, v. 6, n. 34, p. 30-34, 2001.

ARUNACHALAM, K. D. Role of bifidobacteria im nutrition, medicine and tecnologia. **Nutrition Research**, v. 19, n. 10, p. 1559-1597, 1999.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16. ed. Washington, 1995. v.1-2.

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

BEAL, C.; SKOKANOVA, J.; LATRILLE, E.; MARTIN, N.; CORRIEU, G. Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 4, p. 673-681, 1999.

BEHRENS, J. H.; ROIG, S. M.; SILVA, M. A. P. Aspectos de funcionalidade, de rotulagem e de aceitação de extrato hidrossolúvel de soja fermentado e culturas lácteas probióticas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 34, n. 2, p. 99-106, 2000.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A.; JUSKIEWICZ, J.; WRÓBLEWSKA, M. Effect of non-digestible oligosaccharides on gut microecosytem in rats. **Food Reserch International**, v. 35, p. 139-144, 2002.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Manual de laboratório de química dos alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1995, 129 p.

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

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

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, 13 de novembro de 2000. Disponível em: www.agricultura.gov.br/sislegis. Acesso em 13/12/2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA**, Decreto Nº 30.691 de 29 de março de 1952. Disponível em: www.agricultura.gov.br/sislegis. Acesso em 13/12/2006.

BRASIL. **Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados no Sistema de Laboratório Animal do Departamento de Defesa Animal**. Ministério da Agricultura Abastecimento e da Reforma Agrária, 02/05/2003. Disponível em: www.agricultura.gov.br/sislegis. Acesso em 13/12/2006.

BURTON, J. P.; TANNOCK, G. W. Properties of porcine and yogurt lactobacilli in relation to lactose intolerance. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 10, p. 2318-2324, 1997.

CÂNDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. **Alimentos para fins especiais: dietéticos**. 1.ed. São Paulo: Livraria Varela, 1995. 423 p.

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, 1997.

CHERMESH, I.; ELIAKIM, R. Probiotics and the gastrointestinal tract: where are we in 2005? **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 6, p. 853-857, 2006.

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

CONWAY, P. Prebiotics and human health: the state –of-the-art and future perspectives. **Scandinavian Journal of Clinical Nutrition**, v. 45, p. 13-21, 2001.

COUSSEMET, P.; FRANCK, A. New food applications for inulin. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v. 9, n. 3, p. 26-28, 1998.

CRUCHET, S.; OBREGON, M. C.; SALAZER, G.; DIAZ, E.; GOTTELAND, M. E.; GOTTELAND, M. Effect of the ingestion of a dietary product containing *Lactobacillus johnsonii* La1 on *Helicobacter pylori* colonization in children. **Applied Nutritional Investigation**, v. 19, n. 9, p. 716-721, 2003.

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Viability of yogurt and probiotic, in yogurt made from commercial starter cultures. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 1, p. 31-41, 1997.

_____. Effect of cysteine on the viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurt made with commercial starter cultures. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 8, p. 537-545, 1997b.

_____. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 11, p. 2804-2816, 1998.

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

DONKOR, O. N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1181-1189, 2006.

DUBOC, P.; BEAT M. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 759-768, 2001.

DUTCOSKI, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: Champagnat, 1996. 122 p.

FERREIRA, C. L. L. F. Produtos lácteos probióticos: uma realidade. **Leites & Derivados**, v. 7, n. 42, p. 66-70, 1998.

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.

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

FOOKS, L.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 1, p. 53-61, 1999.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF M.; DESTRO, M. T. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996, 182 p.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

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

GARCÍA-PÉREZ, F. J.; LARIO, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; SAYAS, E.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A.; SENDRA, E. Effect of orange fiber addition on yogurt color during fermentation and cold storage. **Industrial Applications**, v. 30, n. 6, p. 457-463, 2005.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GIBSON, G. R.; WILLIS, C. L.; VAN LOO, J. Non-digestible oligosaccharides and bifidobacteria – implications for health. **International Sugar Journal**, v. 96, p. 381-387, 1994.

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

GUARNIER, F. Enteria flora in health and disease. **Digestion** (Suppl 1), v. 73 p. 5-12, 2006.

GUEIMONDE M.; DELGADO S.; BALTASAR, M.; MADIEDO-RUAS, P.; MARGOLLES A.; REYES-GAVILÁN, C. G. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. **Food Research International**, v. 37, p. 839-850, 2004.

GUYOT, A. Les yoghourts. **Le Lait et Nous**, n. 2, p. 6-12, 1992.

HASSAN, A. N.; FRANK, J. F.; SCHMIDT, K. A.; SHALABI, S. I. Rheological properties of yogurt made with encapsulated nonropy lactic cultures. **Journal Dairy Science**, v. 79, n. 12, p. 2091-2097, 1996.

HUGHES, D. B.; HOOVER, D. G. Bifidobacteria: their potential for use in american dairy products. **Food Technology**, v.45, n. 4, p. 75-83, 1991.

IBRAHIM, S. A.; BEZKOROVAINY, A. Growth-promoting factors for *Bifidobacterium longum*. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 1, p. 189-191, 1994.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos. 3. ed. São Paulo: IAL, 1985. v. 1.

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

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

KAILASAPATHY, K.; RYBKA, S. *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* ssp.: their therapeutic potencial and survival in yogurt. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 52, n. 1, p. 28-35, 1997.

KLEINMAM, R. E. Pratical significance of lactose intolerance in children: supplement. **Pediatric**, v. 86, n. 4, p. 643-644, 1990.

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

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 101, p. 229-236, 2001.

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, 1996b.

LIM, S. G.; MENZIES, S.; NUKAJAM, W. S.; LEE, C. A.; JOHNSON, M. A. Intestinal disaccharidase activity in human immunodeficiency virus disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 30, n. 3, p. 235-241, 1995.

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

LOBATO, V. **Tecnologia de fabricação de derivados do leite na propriedade rural**. Lavras/MG: Editora UFLA. Boletim Técnico. 2000.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 1-2, p. 1-17, 2001.

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.

MAN, C. M. D.; JONES A. A. (Ed). Shelf life evaluation of foods. Savoy, 1996. 321 p.

MARCHETTI, G. Inulina e fruttani. **Industrie Alimentari**, v. 32, n. 319, p. 945-949, 1993.

MARTEAU, P. R.; VRESE, M.; CELLIER C. J.; SCHREZENMEIR J. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, 430s-436s, 2001. Suppl S.

_____. Probiotic form gastrointestinal diseases with the use of probiotics. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 430s-436s, 2001. Suplemento

MARTEAU, P.; BOUTRON-RUAULT, M. C. Nutritional advantages of probiotics and prebiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 87, n. 2, p. S153-S157, 2002.

MATSUBARA, S. Alimentos funcionais: uma tendência que abre perceptivas aos laticínios. **Indústria de Laticínios**, v. 6, n. 34, p. 10-18, 2001.

MINOLTA. **Precise color communication**: color control from feeling to instrumentation. MINOLTA Co. Ltd., 1994.

MISTRY, V. V.; HASSAN, H. N. Manufacture of nonfat yogurt from a high milk protein powder. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 4, p. 947-957, 1992.

MOREIRA, S. R.; SCHWAN, R. F.; CARVALHO, E. P.; FERREIRA, C. Análise microbiológica e química de iogurtes comercializados em Lavras – MG. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 147-152, 1999.

NEIROTTI, E.; OLIVEIRA, A. J. Produção de iogurte pelo emprego de culturas lácticas mistas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 1/2, p. 1-16, 1988.

NINESS, K. R. Inulin and oligofuctose: what are they? **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 7S, p. 1402s-1406s, 1999.

NITSCHKE, M.; UMBELINO, D. C. Frutooligosacarídeos: novos ingredientes funcionais. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia**, v. 36, n. 1, p. 27-34, 2002.

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, M. O.; DAMIN, M. R. Efeitos do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação e na viabilidade de bactérias do iogurte e das probióticas em leite fermentado. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. 17, 2002. **ANAIS**: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Porto Alegre: SBCTA, 2002. p. 3015-3018, CD-ROM.

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

PICARD, C.; FIORAMONTI, J.; FRANÇOIS, A.; ROBINSON T.; NEANT F.; MATUCHANSKY, C. Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 22, p. 495-512, 2005.

PINHEIRO, M. V. S. **Caracterização de iogurtes fabricados com edulcorantes, fermentados por culturas lácticas probióticas**. 2003. 196 p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2003.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.; OKSMAN-CALDENTY, K.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 1, p. 3-11, 2002.

RASIC, J. L.; KURMANN, J. A. **Yoghurt: Scientific grounds technology, manufacture & preparation**. Copenhagen: Technical Dairy Publishing House, 1978. 427 p.

REID, G. Probiotic agents to protet the urogenital tract against infection. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 437s-443s, 2001. Suplemento.

RENNER, E. Dietary approaches to alleviation of lactose maldigestion. **Food Science and Technology International**, v. 3, n. 2, p. 71-79, 1997.

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

ROBERFROID, M. Dietary fiber, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 2, p. 103-148, 1993.

ROBERFROID, M. B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? **American Journal Clinical Nutrition**, v. 71, n. 1, p. 1682s-1687s, 2000.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G. R.; DELZENNE, N. The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: an approach to calculate its caloric value. **Nutrition Reviews**, v. 51, n. 5, p.137-146, 1993.

ROBERFROID, M. B.; VAN LOO, J. A. E.; GIBSON, G. R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **Journal of Nutrition**, v. 128, n. 1, p. 11-19, 1998.

ROEFS, S. P. F. M.; WALSTRA, P.; DALGLEISH D. G.; HORNE D. S. Preliminary note on the change in casein micelles caused by acidification. **Netherlands Milk Dairy Journal**, v. 39, p. 119-122, 1985.

SABOYA, L. V.; OETTERER, M.; 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.

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

SALJI, J. P.; ISMAIL, A. A. Effect of initial acidity of plain yogurt on acidity changes during refrigerated storage. **Journal Food Science**, v. 48, n.1, p. 249-258, 1983.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C.; ISOLAURI, E. Clinical applications of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 563-572, 1998.

SAMONA, A.; ROBINSON, R. K. Effect of yogurt cultures on the survival of bifidobacteria in fermented milks. **Journal of Society of Dairy Technology**, v. 47, n. 2, p. 58-60, 1994.

_____. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 44, n. 3, p. 64-66, 1991.

SANTOS, J. A. Iogurte: um bom negócio se feito com profissionalismo. **Indústria de Laticínios**, n. 18, p. 20-27, 1998.

SCHEINBACH, S. Probiotics: functionality and commercial status. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 3, p. 581-608, 1998.

SCHOLZ-AHRENS, K.; SCHAAFSMA, G.; VAN DER HEUVEL, E.; SCHREZENMEIR, J. Effects of prebiotics on mineral metabolism. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 459s-464s, 2001.

SCHREZENMEIR, J.; VRESE, M. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 361s-364s, 2001.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: Enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 894-907, 2000.

_____. Functional foods form probiotics and prebiotics. **Food Tecnology**, v. 55, n. 11, p. 46-52, 2001.

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

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

SHAH, N. P.; RAVULA, R. R. Influence of water activity on fermentation, organic acids production and viability of yogurt and probiotic bacteria. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 55, n. 3, p. 127-131, 2000.

SHENE, C.; BRAVO, S. Whey fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* for exopolysaccharide production in continuous culture. **Enzyme and Microbial Technology**, p. 1-7, 2006.

SILVA, L. L.; STAMFORD, T. L. M. Alimentos probióticos: uma revisão. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 68-69, p. 41-50, 2000.

SUSKOVIC, J.; KOS, B.; GORETA, J.; MATOSIC, S. Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in symbiotic effect. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 227-235, 2001.

TADINI, C. C. **Utilização de caseinato de cálcio na produção de queijo tipo minas frescal**. 1994. 241 p. Tese de Doutorado (Doutora em Engenharia Química) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. 1994.

TADINI, C. C.; TAQUEDA, M. E.; GRANDI, J. G. Use de caseinato de calcio en la producción de queso Minas Frescal. **Tecnología Láctea Latinoamericana**, n. 3, p. 22-33, 1996.

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

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yogurt: ciencia y tecnologia**. Zaragoza: Acribia, 1991. 368 p.

_____. **Yoghurt: science and technology**. 3 ed. England: Woodhead Publishing Limited, 619 p., 1999.

TEGGATZ J. A.; MORRIS, H. A. Changes in the rheology and microstructure of ropy yogurt during shearing. **Food Struture**, v. 9, p. 133-135, 1990.

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

THOMOPOULOS, C.; TZIA, C.; MILKAS, D. Influence of processing of solids-fortified milk on coagulation time and quality properties of yogurt. **Milchwissenschaft**, v. 48, n.8, p.426-430, 1993.

VAN LOO, J. A. E.; COUSSEMENT, P.; LEENHEER, L.; HOEBREGS, H.; SMITS, G. The presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, n. 6, p. 525-552, 1995.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Leche y productos lácteos**. Tecnología, Química y Microbiología, p. 1-34, 365-401, 1994. Zaragoza: Acribia.

VEDAMUTHU, E. R. The yogurts story – past, present and future. Part V. **Dairy, Food Envionmental Sanitarians**, v. 11, n. 8, p. 444-446, 1991b.

_____. The yogurts story – past, present and future. Part VI. **Dairy, Food Environmental Sanitarians**, v. 11, n. 9, p. 513-514, 1991c.

VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 1-17, 2001.

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

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 4, p. 271-275, 2000.

VRESE, M. Probiotics – compenstion for lactase insufficiency. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 23, n. 2 (Supplement), p. 421s-429s, 2001.

VRESE, M.; STEGELMANN, A.; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.; SCHREZENMEIR. Probiotic – compesantion for lactose insufficiency. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 421s-429s, 2001. Suplemento.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. **Dairy technology**: principles of milk properties and processes, New York, 1999.

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**, v. 38, p. 19-24, 1983.

ZIEMER, C.; GIBSON, G. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 5-6, p. 473-479, 1998.

7 APÊNDICES

Apêndice I - Determinação do valor de pH e da acidez expressa em ácido láctico durante o processo de fermentação.

Tabela 9 - Valores médios de pH durante o processo de fermentação dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas.

Tempo de observação (minutos)	0,5%	1,0%	1,5%
0	5,35 ± 0,01	5,15 ± 0,01	5,07 ± 0,01
30	5,14 ± 0,01	4,99 ± 0,01	4,97 ± 0,01
60	4,98 ± 0,02	4,91 ± 0,02	4,86 ± 0,01
90	4,87 ± 0,01	4,78 ± 0,01	-
120	4,85 ± 0,02	-	-

Tabela 10 - Valores médios de acidez (% de ácido láctico) durante o processo de fermentação dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas.

Tempo de observação (minutos)	0,5%	1,0%	1,5%
0	0,49 ± 0,02	0,55 ± 0,01	0,57 ± 0,02
30	0,54 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,60 ± 0,01
60	0,59 ± 0,01	0,62 ± 0,00	0,65 ± 0,01
90	0,65 ± 0,01	0,72 ± 0,01	-
120	0,65 ± 0,02	-	-

Apêndice II - Caracterização físico-química dos iogurtes.

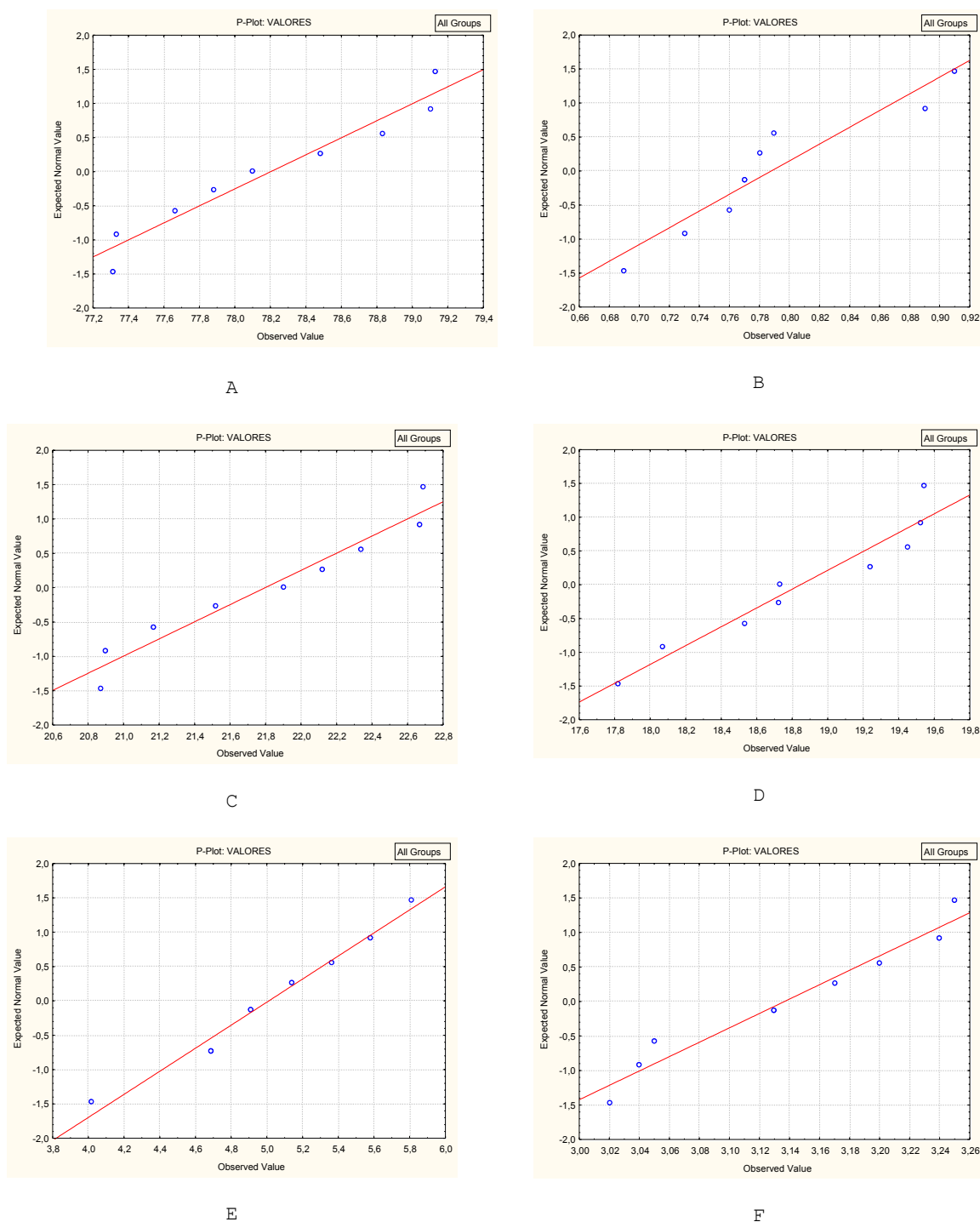


Figura 31 - Determinação do teor de umidade (A), cinzas (B), extrato seco total (C), extrato seco desengordurado (D), proteína (E) e gordura (F).

Apêndice III - Determinação do valor de pH, da acidez expressa em ácido láctico e do teor de lactose durante o período de armazenamento sob refrigeração.

Tabela 11 - Valores médios de pH durante o tempo de estocagem dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas.

Tempo de estocagem (dia)	0,5%	1,0%	1,5%
1	4,62 ± 0,00	4,56 ± 0,01	4,54 ± 0,00
7	4,55 ± 0,01	4,52 ± 0,01	4,47 ± 0,02
14	4,55 ± 0,01	4,52 ± 0,01	4,47 ± 0,00
21	4,53 ± 0,01	4,46 ± 0,01	4,46 ± 0,01
28	4,47 ± 0,01	4,45 ± 0,01	4,45 ± 0,01

Tabela 12 - Valores médios de acidez (% ácido láctico) durante o tempo de estocagem dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas.

Tempo de estocagem (dia)	0,5%	1,0%	1,5%
1	0,67 ± 0,01	0,69 ± 0,02	0,72 ± 0,01
7	0,72 ± 0,01	0,75 ± 0,01	0,76 ± 0,01
14	0,72 ± 0,01	0,75 ± 0,01	0,80 ± 0,02
21	0,74 ± 0,01	0,77 ± 0,01	0,83 ± 0,01
28	0,81 ± 0,01	0,86 ± 0,01	0,90 ± 0,01

Tabela 13 - Valores médios do teor de lactose (%) durante o tempo de estocagem dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas.

Tempo de estocagem (dia)	0,5%	1,0%	1,5%
1	4,02 ± 0,03	3,85 ± 0,05	3,72 ± 0,03
7	3,93 ± 0,02	3,57 ± 0,03	3,52 ± 0,02
14	3,82 ± 0,03	3,46 ± 0,05	3,36 ± 0,03
21	3,68 ± 0,04	3,40 ± 0,02	3,25 ± 0,02
28	3,52 ± 0,02	3,30 ± 0,05	3,20 ± 0,03

Apêndice IV - Contagem de bactérias lácticas nos iogurtes.

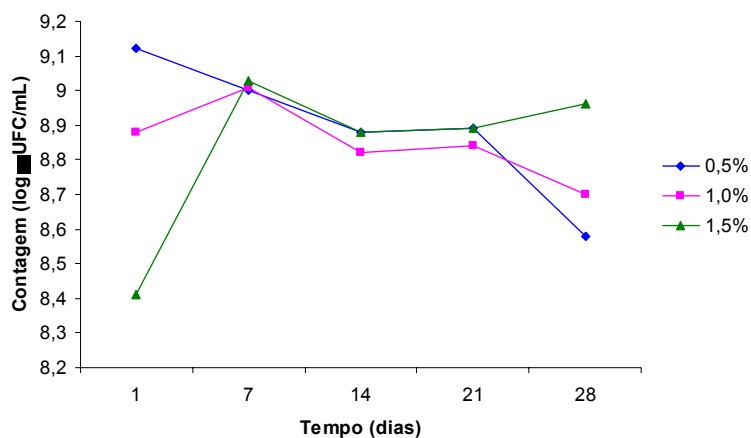


Figura 32 - Efeito do tempo de estocagem na manutenção do número de células viáveis de *S. thermophilus* nos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas.

Tabela 14 - Contagem média do número de células viáveis de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas durante o tempo de estocagem (log₁₀ UFC/ mL).

Tempo de estocagem (dia)	0,5%	1,0%	1,5%
1	9,12 ± 0,16	8,88 ± 0,23	8,41 ± 0,18
7	9,00 ± 0,09	9,01 ± 0,03	9,03 ± 0,08
14	8,88 ± 0,10	8,82 ± 0,18	8,88 ± 0,17
21	8,89 ± 0,06	8,84 ± 0,05	8,89 ± 0,08
28	8,58 ± 0,07	8,70 ± 0,13	8,96 ± 0,09

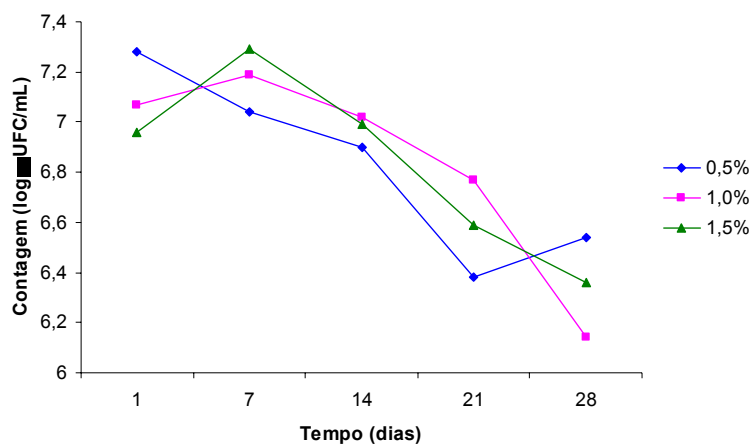


Figura 33 - Efeito do tempo de estocagem na manutenção do número de células viáveis de *L. bulgaricus* nos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas.

Tabela 15 - Contagem média do número de células viáveis de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas durante o tempo de estocagem (log₁₀ UFC/mL).

Tempo de estocagem (dia)	0,5%	1,0%	1,5%
1	7,28 ± 0,10	7,07 ± 0,18	6,96 ± 0,09
7	7,04 ± 0,22	7,19 ± 0,03	7,29 ± 0,07
14	6,90 ± 0,08	7,02 ± 0,02	6,99 ± 0,13
21	6,38 ± 0,55	6,77 ± 0,08	6,59 ± 0,24
28	6,54 ± 0,34	6,14 ± 0,50	6,36 ± 0,26

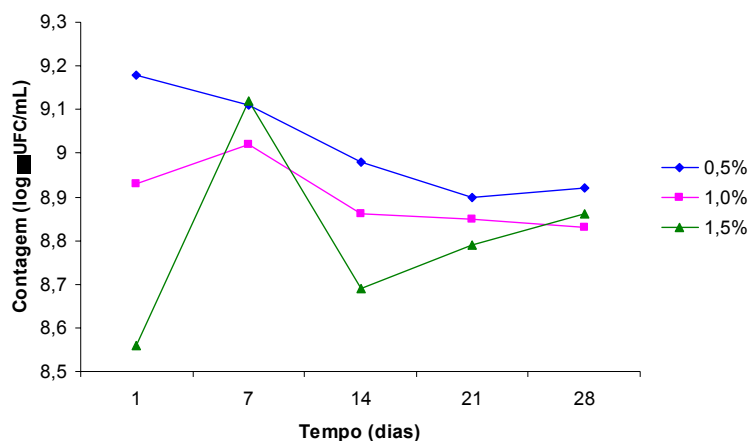


Figura 34 - Efeito do tempo de estocagem na manutenção do número de células viáveis de *L. acidophilus* nos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas.

Tabela 16 - Contagem média do número de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas durante o tempo de estocagem (log₁₀ UFC/ mL).

Tempo de estocagem (dia)	0,5%	1,0%	1,5%
1	9,18 ± 0,19	8,93 ± 0,19	8,56 ± 0,34
7	9,11 ± 0,06	9,02 ± 0,11	9,12 ± 0,06
14	8,98 ± 0,02	8,86 ± 0,09	8,69 ± 0,51
21	8,90 ± 0,05	8,85 ± 0,02	8,79 ± 0,06
28	8,92 ± 0,07	8,83 ± 0,06	8,86 ± 0,10

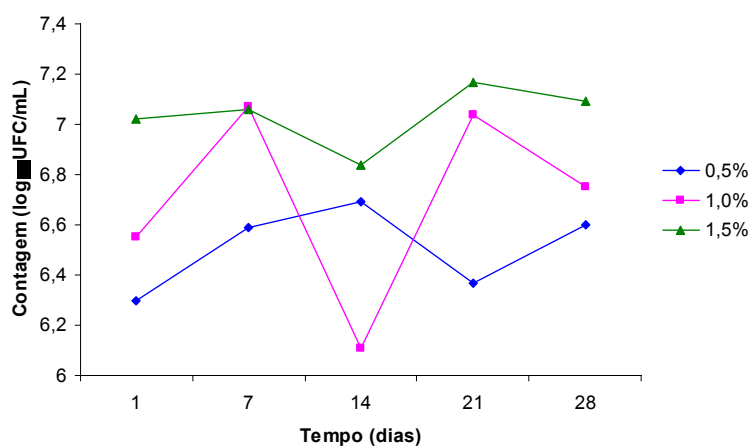


Figura 35 - Efeito do tempo de estocagem na manutenção do número de células viáveis de *Bifidobacterium* sp. nos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas.

Tabela 17 - Contagem média do número de células viáveis de *Bifidobacterium* sp. dos iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas durante o tempo de estocagem (log₁₀ UFC/ mL).

Tempo de estocagem (dia)	0,5%	1,0%	1,5%
1	6,30 ± 0,17	6,55 ± 0,14	7,02 ± 0,08
7	6,59 ± 0,18	7,07 ± 0,13	7,06 ± 0,30
14	6,69 ± 0,03	6,11 ± 0,67	6,84 ± 0,22
21	6,37 ± 0,56	7,04 ± 0,08	7,17 ± 0,12
28	6,60 ± 0,15	6,75 ± 0,08	7,09 ± 0,05

Apêndice V - Determinação da viscosidade dos iogurtes.

TABELA 18 - Determinação da viscosidade aparente em iogurtes elaborados com diferentes concentrações de culturas lácticas tradicionais e probióticas e de amostras comerciais de iogurtes probióticos (líquido e tradicional).

logurtes	Viscosidade (mPa.s) 55s⁻¹
0,5%	369
1,0%	382
1,5%	388
Comercial líquido	116
Comercial tradicional	924