

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
URI - CAMPUS ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FABIELE WITSCHINSKI

ELABORAÇÃO DE IOGURTE COM ADIÇÃO DE
FRUTO-OLIGOSSACARÍDEO E CULTURA PROBIÓTICA (*BIFIDOBACTERIUM*)

ERECHIM, RS - BRASIL
AGOSTO DE 2012

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
URI – CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**Elaboração de iogurte com adição de fruto-oligossacarídeo e
cultura probiótica (*Bifidobacterium*)**

FABIELE WITSCHINSKI

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da URI - Campus de Erechim, como requisito parcial a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

**ERECHIM, RS – BRASIL
AGOSTO, 2012.**

Elaboração de iogurte com adição de fruto-oligossacarídeo e cultura probiótica (*Bifidobacterium*)

FABIELE WITSCHINSKI

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários á obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr.^a Eunice Valduga
Orientadora

Prof. Dr.^a Clarissa Dalla Rosa
Orientadora

Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago
URI - Campus de Erechim

Prof. Dr.^a Daniela dos Santos de Oliveira
Faculdade IDEAU – Getúlio Vargas

Erechim, 17 de Agosto de 2012.

Dedico este trabalho aos meus pais Adelio e Edineia, por estarem presentes na minha vida, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradecer primeiramente a Deus, por mais esta etapa concluída, por ter me iluminado e abençoado para que tudo desse certo.

Aos meus pais, pelo amor e dedicação, pelo exemplo de trabalho, humildade e honestidade, por tantos sacrifícios em meu favor, por sempre acreditarem em mim e em meus sonhos.

Ao meu companheiro de todos os momentos Daniel, pelo amor e companheirismo, pelo apoio e compreensão, por estar sempre ao meu lado.

A minha avó Vanilda, pela ajuda e compreensão dos dias difíceis.

A todos meus familiares que de uma forma ou outra se fizeram presentes e me apoiaram nesta realização.

As minhas professoras orientadoras Eunice e Clarissa pela paciência e pelos ensinamentos que me fizeram crescer pessoalmente e profissionalmente.

Ao professor Rogério Marcos Dallago pela ajuda e dedicação nos momentos difíceis.

Aos professores da banca, pela contribuição acadêmica e científica prestada a essa dissertação, pelas correções e sugestões.

A minha colega Débora, pela ajuda nos laboratórios e apoio diariamente.

As minhas colegas Letícia e Chaline pelo apoio e amizade.

A ajuda e compreensão da Marcella Fernandes e da Sandi.

A Aline Riquetti pela doação de materiais do laboratório e ajuda.

Ao pessoal da central de materiais: Rosetânea, Solange e Vera, e dos laboratórios: Anderson, Marciele, Márcia, Débora e Madalena, pela ajuda e paciência em todos os momentos.

E a todos que me incentivaram e que de alguma forma me auxiliaram para a realização deste trabalho.

Resumo da dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Elaboração de iogurtes com adição de fruto-oligossacarídeo e cultura probiótica (*Bifidobacterium*)

FABIELE WITSCHINSKI

Agosto/2012

Orientadoras: Eunice Valduga

Clarissa Dalla Rosa

A utilização de ingredientes funcionais em alimentos vem adquirindo uma presença crescente na alimentação dos indivíduos e na indústria alimentícia. Os prebióticos e os probióticos são atualmente os aditivos alimentares que compõem esses alimentos funcionais. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da adição de cultura probiótica (*Bifidobacterium* BB12) e ingrediente prebiótico (Fruto-oligossacarídeos) nas características físico-químicas (pH, acidez, sinérese, proteína, sólidos solúveis totais (°Brix), cor objetiva, análise dos açúcares e dos fruto-oligossacarídeos), sensoriais (aceitação geral), reológica (viscosidade) e microbiológicas (contagem de bactérias lácticas totais) de formulações de iogurte e na estabilidade do produto armazenado a 4°C por um período de 28 dias. Na elaboração das formulações empregou-se a metodologia de planejamento de experimentos, no qual as variáveis independentes de estudo foram as concentrações de fruto-oligossacarídeos (0 a 3 %) e de cultura láctica probiótica (0 a 3 %). A avaliação da análise físico-química indicou que o iogurte adicionado de probiótico e prebiótico apresentou menores valores de acidez e sinérese que o iogurte controle, resultando em um produto de maior aceitação e de melhores aspectos de consumo. A cor objetiva demonstrou que os valores de luminosidade (L*) aumentaram com o tempo de armazenamento, para todas as amostras. A caracterização dos fruto-oligossacarídeos (FOS) determinou que em 100 g de FOS comercial (Fiber FOS®) obtém-se somente 56,1 % de FOS puro, ou seja, o restante são outros açúcares e compostos. A quantidade de lactose diminuiu com o aumento do tempo de armazenamento, sendo que

inicialmente o teor de lactose das formulações era de aproximadamente 4,06g/100 mL. A amostra que obteve a queda mais acentuada no teor de sacarose foi a amostra com adição somente de fruto-oligossacarídeos, apresentando um consumo de 54,4 %, entre o 1º dia e 28º dia de armazenamento. As amostras que contém FOS juntamente com Bifidobactéria apresentaram menores valores de glicose. Na formulação com adição de maiores quantidades de FOS e de bifidobactéria, se observa menor perda dos fruto-oligossacarídeos em decorrência do tempo, sendo assim aos 21 e 28 dias, restaram um total de e 1,5 g de FOS por 100 g de iogurte. A viscosidade do iogurte foi pouco influenciada pela adição de cultura probiótica, mas sim fortemente influenciada pela presença do FOS. Foi verificado que a adição de FOS proporcionou maiores contagens de bactérias lácticas totais do início até o final da vida útil. A aceitação geral dos iogurtes foi influenciada pela adição de FOS. Por outro lado o aumento da concentração da cultura probiótica, fez diminuir a aceitação dos produtos. A estabilidade do iogurte foi avaliada pela aceitação geral, resultando em uma vida útil de 21 dias de conservação sob refrigeração. A amostra que continha maiores quantidades de Bifidobactéria e de FOS, pode até o final de sua vida útil (21 dias), manter a quantidade mínima exigida na legislação para ser um produto funcional.

Palavras-chave: Iogurte, *Bifidobacterium*; Fruto-oligossacarídeo, prebióticos, probióticos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmulas estruturais dos FOS.....	29
Figura 2. Fluxograma do processo de desenvolvimento de iogurte produzido com culturas lácticas tradicionais e probióticas adicionadas de fruto-oligossacarídeo.....	37
Figura 3. Aspecto visual do iogurte após envase - Sabor Framboesa.....	38
Figura 4. Valores de pH e valores de acidez (% ácido láctico) para as amostras de iogurte nos diferentes períodos de armazenamento.....	48
Figura 5. Gráfico de pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental fatorial 2^2 , para análise de pH no 1º dia de armazenamento, 7º dia de armazenamento e 28º dia de armazenamento.....	49
Figura 6. Gráfico de pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental fatorial 2^2 , para análise de acidez no 1º dia de armazenamento, 21º dia de armazenamento e 28º dia de armazenamento.....	51
Figura 7. Gráfico de pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental fatorial 2^2 , para análise de sinérese no 1º dia de armazenamento refrigerado e no 14º dia de armazenamento refrigerado.....	55
Figura 8. Gráfico de pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental fatorial 2^2 , para análise de °Brix no 7º dia de armazenamento e no 21º dia de armazenamento refrigerado.....	57
Figura 9. Cromatograma do fruto-oligossacarídeo (padrão de FOS).....	62
Figura 10. Cromatograma do fruto-oligossacarídeo (FOS comercial FIBER FOS®).....	62
Figura 11. Aspecto dos ensaios de precipitação de proteína e gordura do iogurte: Ensaio 1 e 2.....	64
Figura 12. Metodologia para detecção do FOS na amostra de iogurte: Ensaio 5, com fase-móvel e com acetonitrila.....	65
Figura 13. Lactose Residual (%) das formulações de iogurte em função do tempo de armazenamento.....	67
Figura 14. Concentração (%) de sacarose nas amostras de iogurte em função do tempo de armazenamento.....	68
Figura 15. Concentração (%) de glicose nas amostras de iogurte em função do tempo de armazenamento.....	69

Figura 16. Frutose (% de área) na amostra de iogurte do Ensaio 2 em função do período de armazenamento.....	71
Figura 17. Teor de kestose, nistose e frutossilnistose em amostra de iogurte (Ensaio 2) em função do período de armazenamento.....	72
Figura 18. Teor de kestose, nistose e frutossilnistose em amostra de iogurte (Ensaio 4) em função do período de armazenamento.....	73
Figura 19. Teor de kestose, nistose e frutossilnistose em amostra de iogurte (Ensaio 5) em função do período de armazenamento.....	74
Figura 20. Variação da viscosidade nas amostras de iogurte com o tempo de armazenamento a 4°C.....	76
Figura 21. Gráfico de pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental fatorial 2^2 , para contagem de bactérias lácticas totais no 1º dia e no 28º dia de armazenamento refrigerado.....	80
Figura 22. Visualização do crescimento das colônias nas placas de petri de bactérias lácticas totais.....	82
Figura 23. Gráfico de pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental fatorial 2^2 , para aceitação geral no 1º dia de armazenamento e no 21º dia de armazenamento refrigerado.....	84
Figura 24. Histograma de frequência para o atributo aceitação geral no 1º, 7º, 14º e 21º dia de armazenamento refrigerado.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis utilizados no planejamento 2^2 (com triplicata de ponto central) para fabricação do iogurte.....	39
Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial 2^2 completo (valores codificados e reais) e resposta em pH e acidez (% de ácido láctico) no 1º, 7º, 14º, 21º e 28º dia de armazenamento refrigerado.....	47
Tabela 3. Matriz do planejamento fatorial 2^2 completo (valores codificados e reais) e resposta em Sinérese no 1º, 7º, 14º, 21º e 28º dia de armazenamento refrigerado.....	53
Tabela 4. Matriz do planejamento fatorial 2^2 completo (valores codificados e reais) e resposta em Proteína no 1º, 7º, 14º, 21º e 28º dia de armazenamento refrigerado.....	56
Tabela 5. Matriz do planejamento fatorial 2^2 completo (valores codificados e reais) e resposta em ° Brix no 1º, 7º, 14º, 21º e 28º dia de armazenamento refrigerado.....	57
Tabela 6. Matriz do planejamento fatorial 2^2 completo (valores codificados e reais) e resposta em análise de Cor para Luminosidade (*L) no 1º, 7º, 14º, 21º e 28º dia de armazenamento refrigerado.....	58
Tabela 7. Matriz do planejamento fatorial 2^2 completo (valores codificados e reais) e resposta em análise de Cor para Cromaticidade (a*) no 1º, 7º, 14º, 21º e 28º dia de armazenamento refrigerado.....	59
Tabela 8. Matriz do planejamento fatorial 2^2 completo (valores codificados e reais) e resposta em análise de Cor para Cromaticidade (b*) no 1º, 7º, 14º, 21º e 28º dia de armazenamento refrigerado.....	60
Tabela 9. Equação da reta e R obtidos para as diferentes curvas de calibração para os padrões de FOS e de açúcares nas condições cromatográficas.....	63
Tabela 10. Resultados expressos em % de recuperação da amostra para as diferentes metodologias aplicadas para iogurte com FOS.....	66
Tabela 11. Matriz do planejamento fatorial 2^2 completo (valores codificados e reais) e resposta para contagem de bactérias lácticas (\log_{10} UFC/ml) no 1º, 7º, 14º, 21º e 28º dia de armazenamento refrigerado.....	79
Tabela 12. Matriz do planejamento fatorial 2^2 completo (valores codificados e reais) e resposta em aceitação geral para as formulações no 1º, 7º, 14º e 21º dia de armazenamento refrigerado.....	83

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
SUMÁRIO	x
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	16
3.1 IOGURTE.....	16
3.1.1 Definição	16
3.1.2 Tecnologia de produção do iogurte	17
3.1.2.1 Padronização do iogurte.....	17
3.1.2.2 Homogeneização.....	18
3.1.2.3 Tratamento térmico do leite.....	18
3.1.2.4 Resfriamento do leite.....	19
3.1.2.5 Inoculação do fermento láctico e incubação.....	19
3.1.2.6 Resfriamento do iogurte.....	20
3.1.3 Aspectos relevantes na produção do iogurte	21
3.1.4 Importância nutricional do iogurte	23
3.2 ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	24
3.2.1 Probióticos	26
3.2.2 Prebióticos	28
3.2.3 Produtos simbióticos	30
3.2.4 Importância nutricional dos probióticos e prebióticos	31

3.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 MATERIAIS.....	36
4.1.1 Matéria-prima e culturas lácticas empregadas na formulação de iogurte.....	36
4.2 MÉTODOS.....	36
4.2.1 Processo de fabricação do iogurte.....	36
4.2.1.1 Preparo do pré-inóculo.....	38
4.2.1.2 Elaboração das formulações de iogurte.....	38
4.2.2 Planejamento experimental para obtenção de iogurte.....	39
4.2.3 Caracterização dos iogurtes.....	39
4.2.3.1 pH.....	40
4.2.3.2 Determinação de sólidos solúveis totais (°Brix).....	40
4.2.3.3 Acidez total titulável (expressa como % de Ácido láctico).....	40
4.2.3.4 Determinação dos açúcares (Lactose, frutose, glicose e sacarose).....	40
4.2.3.5 Determinação de Fruto-oligossacarídeo (FOS) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	41
4.2.3.5.1 Caracterização do FOS comercial.....	41
4.2.3.6 Índice de sinérese.....	43
4.2.3.7 Viscosidade.....	44
4.2.3.8 Proteína.....	44
4.2.3.9 Gordura.....	44
4.2.3.10 Cor objetiva.....	44
4.2.4 Caracterização microbiológica dos iogurtes.....	45
4.2.4.1 Contagem de bactérias lácticas totais.....	45
4.2.5 Análise sensorial.....	45
4.2.6 Tratamento estatístico.....	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS.....	47
5.1.1 pH e Acidez.....	47
5.1.2 Gordura.....	52
5.1.3 Sinérese.....	53
5.1.4 Proteína.....	55

5.1.5 ° Brix	56
5.1.6 Cor objetiva	57
5.1.7 Quantificação dos açúcares e do Fruto-oligossacarídeo	61
5.1.7.1 Desenvolvimento e validação de metodologia de análise por CLAE.....	61
5.1.7.2 Açúcares das formulações de iogurte.....	66
5.2 CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS	75
5.2.1 Viscosidade	75
5.3 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS	78
5.3.1 Contagem de bactérias lácticas totais	78
5.4 CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS	82
6 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
APÊNDICES	97
ANEXOS	101

1. INTRODUÇÃO

O papel da alimentação equilibrada na manutenção da saúde e prevenção de doenças tem despertado interesse pela comunidade que produz estudos com intuito de comprovar a atuação de certos alimentos na prevenção de doenças (STEFE et al., 2008), possibilitando a inovação de produtos alimentícios e a criação de novos nichos de mercado (THAMER e PENNA, 2006).

Como se tem observado, o mercado de lácteos para fins especiais vem apresentando crescimento maior do que o de lácteos tradicionais (BRANDÃO e FONTES, 2010). Apresentando uma nova tendência, como a produção de iogurtes e leites fermentados funcionais que apresentam grande aceitação pelo público em geral. Esses produtos definidos como alimentos funcionais contêm em sua composição substâncias biologicamente ativas que, ao ser incluído à dieta usual, modula processos metabólicos ou fisiológicos, resultando na redução de riscos de doenças e manutenção da saúde, devendo ser seguro para o consumo sem supervisão médica. Entre esses alimentos funcionais estão os prebióticos e probióticos (SILVEIRA, 2006; KEMPKA et al., 2008; STEFE et al., 2008).

Os prebióticos são carboidratos complexos não-digeríveis, geralmente oligossacarídeos, com atividade bifidogênica, capazes de estimular a proliferação e/ou a atividade de algumas bactérias desejáveis no intestino que afetam benéficamente o hospedeiro (DONKOR et al., 2007; CASTRO et al., 2009).

A inulina e os fruto-oligossacarídeos (FOS) são classificados como prebióticos e são considerados ingredientes alimentares ou fibras que tem recebido atenção pelos efeitos sobre a flora intestinal, pois são altamente hidrossolúveis e fermentáveis. Dentre os benefícios da sua ingestão encontram-se: proliferação de bactérias intestinais benéficas (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) e redução das patogênicas, prevenção de diarreia e constipação e redução do colesterol sérico, etc (OLIVEIRA, 2010).

Já os probióticos são micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefício a saúde humana, melhorando o equilíbrio microbiano da flora intestinal do hospedeiro e as defesas contra micro-organismos patogênicos (CASTRO et al., 2009). Outros benefícios atribuídos aos probióticos incluem a

prevenção do câncer, a estimulação do sistema imunológico, diminuição dos níveis séricos de colesterol e melhoria da síntese de vitaminas (CASTRO et al., 2009).

A procura do consumidor brasileiro por produtos mais saudáveis, inovadores, seguros e de prática utilização, aliada à consolidação dos produtos no mercado, contribuíram para o crescimento da indústria de alimentos funcionais. E o aumento da preocupação com o excesso de peso corporal tem sido relacionado com o aumento da demanda de produtos para fins especiais (THAMER e PENNA, 2006).

Com a crescente incidência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), devido a um estilo de vida errôneo, é de extrema importância que as pessoas optem por incluir alimentos adequados em sua dieta para assegurar melhorias no estado nutricional. Com esta necessidade, se tem o dever de oferecer ao mercado novos produtos funcionais que suplementem alguns requerimentos nutricionais e que aportem os benefícios que apresentam os probióticos e prebióticos, podendo levar a uma melhor nutrição e estado e saúde (GONZALEZ et al., 2010).

O desenvolvimento de alimentos funcionais esta cada vez mais impulsionada por mudanças, assim, as pessoas podem escolher pelos mais diversos produtos no mercado. Além disso, incluí-los diariamente nas refeições, como segurança de promoção e prevenção da saúde. Com base no exposto, justifica-se a presente proposta de trabalho, no qual visa elaborar um produto lácteo – iogurte. O iogurte é um alimento de grande aceitação pelas mais diversas faixas etárias, constitui uma fonte concentrada de nutrientes lácteos e apresenta em sua composição proteínas de elevado valor nutricional e cálcio. Através disto, para garantir sua funcionalidade, este produto será adicionado de *Bifidobacterium* como cultura probiótica e de fruto-oligossacarídeos como prebiótico, considerando sua aceitabilidade e praticidade pelos consumidores. Este produto pode se apresentar como uma alternativa na dieta usual dos indivíduos para melhorar hábitos alimentares, e proporcionar um estilo de vida mais saudável.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é o desenvolvimento e caracterização de um iogurte com menor teor de gordura, acrescido de cultura probiótica (*Bifidobacterium*) e ingrediente prebiótico (Fruto-oligossacarídeos) com intuito de ampliar comercialmente a gama de produtos funcionais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da adição do probióticos e prebiótico nas características físico-químicas (pH, acidez, gordura, sinérese, proteína, sólidos solúveis totais (°Brix), cor objetiva, análise dos açúcares e dos fruto-oligossacarídeos), sensoriais (aceitação geral), reológica (viscosidade) e microbiológicas (contagem de bactérias lácticas totais) do iogurte, empregando a metodologia de planejamento de experimentos;
- Avaliar a estabilidade físico-química, sensorial e microbiológica das formulações de iogurte durante 28 dias em estocagem refrigerada (4°C).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item, estão apresentados vários aspectos, de grande importância para a tecnologia de produção do iogurte, dentre elas o processamento e aplicações tecnológicas, como a inclusão de ingredientes probióticos e prebióticos, e seus benefícios associados ao consumo destes produtos.

3.1 IOGURTE

3.1.1 Definição

Entende-se por iogurte o produto resultante da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por fermentos lácticos próprios, devendo ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade. A fermentação se realiza com cultivos protosimbióticos de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* aos quais podem-se acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-lácticas (BRASIL, 2007) que, por sua ação simbiótica produzem ácido láctico, diacetil, acetona, acetoína, ácido acético e acetaldeído, que são os responsáveis pelo sabor característico do iogurte (BASTIANI, 2009).

O leite fermentado mais importante é o iogurte, obtido da coagulação do leite pela ação de micro-organismos, e que fornece uma melhor assimilação, pelo organismo, de certos componentes, principalmente a lactose e proteína (SILVA, 2007). Através da fermentação láctica resulta-se o leite fermentado, adicionado ou não de frutas, açúcar e outros ingredientes que melhoram sua apresentação e modificam seu sabor. Como exemplo de leites fermentados, pode-se citar o iogurte, o leite fermentado ou cultivado, o leite acidófilo ou acidofilado, o kefir, o kumis e a coalhada (BRASIL, 2007):

a) Leite Fermentado ou Cultivado é o produto que cuja fermentação se realiza com um ou vários dos seguintes cultivos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp.*, *Streptococcus salivarius subsp thermophilus* e/ou outras bactérias ácido lácticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final;

- b) Leite Acidófilo ou Acidofilado é o produto cuja fermentação se realiza apenas com cultivos de *Lactobacillus acidophilus*;
- c) Kefir é o produto cuja fermentação se realiza com cultivos ácido-lácticos elaborados com grãos de Kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono;
- d) Kumys é o produto cuja fermentação se realiza com cultivos de *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* e *Kluyveromyces marxianus*;
- e) Coalhada ou Cuajada é o produto cuja fermentação se realiza por cultivos individuais ou mistos de bactérias mesofílicas produtoras de ácido láctico.

3.1.2 Tecnologia de produção do iogurte

Segundo Krolow e Ribeiro (2006) o iogurte pode ser classificado de acordo com sua tecnologia de produção sendo classificado da seguinte forma: - Iogurte tradicional: fermentado na embalagem (natural ou com sabores); - Iogurte batido: com correção de sólidos solúveis, fermentado em tanques e adicionado ou não de frutas, geléias, polpas, sucos, etc; - Iogurte líquido “para beber”: sem correção de sólidos solúveis, fermentado em tanques e também adicionado de frutas, sucos, polpas, etc.

3.1.2.1 Padronização do iogurte

A padronização dependerá do tipo de produto: integral, padronizado, semi-desnatado, dietético, etc. (KROLOW e RIBEIRO, 2006).

Esta operação se faz necessária para correção do teor de sólidos, para que se obtenha um produto com maior viscosidade/consistência e, portanto menor teor de soro e maior rendimento (BEZERRA et al., 2011). A gordura pode ser padronizada para 3,4 a 3,5 %. Acrescenta-se 10 a 12 % de açúcar e leite em pó desnatado (2 a 4 %) para melhorar o extrato seco total. Pode-se substituir o leite em pó por concentração de leite ou adição de leite evaporado (KROLOW e RIBEIRO, 2006). O ideal é que a dissolução do leite em pó e do açúcar seja feito no restante do leite em temperatura de 55°C, para que a mesma ocorra completamente facilitando a dissolução e a homogeneização, o que seria difícil após a formação do coágulo (FOSCHIERA, 2004).

3.1.2.2 Homogeneização

De acordo com Krolow e Ribeiro (2006) este processo tem por finalidade, promover uma dispersão homogênea dos constituintes da mistura base de iogurte, aumentar a viscosidade e a estabilidade do iogurte, além de melhorar as qualidades sensoriais do produto. Isso ocorre devido à mudança na capacidade de retenção de água das proteínas do leite, pois os glóbulos de gordura formados são recobertos por uma membrana formada, na sua maior parte, por submicelas de caseína.

Devido este recobrimento parcial dos glóbulos com caseína, eles se comportam como grandes micelas que quando em meio ácido ou excessivamente aquecido, podem se agregar. E antes que se forme a nova membrana, os glóbulos perdem parcialmente a sua antiga membrana, devido ao choque entre eles e unem-se as micelas de caseína formando grumos de homogeneização que são recobertos pela nova membrana, isto faz reduzir os glóbulos de gordura e aumenta a adsorção sobre as micelas de caseína, o que determina um aumento de volume total efetivo de substâncias em suspensão (ALMEIDA, 2008).

O processo de homogeneização do leite é realizado na temperatura de 55° C sob pressão de 3.000 psi, através da circulação entre o homogeneizador e o maturador pelo período de uma hora (FOSCHIERA, 2004).

3.1.2.3 Tratamento térmico do leite

Bezerra et al. (2011) determina que o melhor tratamento é de 90° C por 30 min, porém se utiliza temperaturas de 85-90° C, por 15 a 30 min. O aquecimento mais indicado é por meio de banho-maria ou tanques de parede dupla (encamisados) (FOSCHIERA, 2004).

Segundo Krolow e Ribeiro (2006) o tratamento térmico tem por objetivos a destruição da flora natural do leite, que além de produzir contaminações, afeta o desenvolvimento das bactérias do iogurte; eliminar o ar, reduzindo assim o teor de oxigênio do leite tornando-o melhor para o crescimento das bactérias, principalmente o *L. bulgaricus*; decomposição parcial de alguns constituintes do leite (principalmente proteínas) o que resulta na produção de fatores de crescimento para as bactérias lácticas, tais como compostos sulfidrílicos. Também as proteínas do soro tornam-se mais sensíveis ao cálcio com o tratamento térmico, facilitando a coagulação; a albumina e a globulina precipitam, passando a comportar-se como a caseína, aumentando, assim, a consistência e viscosidade do produto final.

3.1.2.4 Resfriamento do leite

Deve-se proceder o resfriamento do leite à temperatura de 42 a 45°C (KROLOW e RIBEIRO, 2006). 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 (FOSCHIERA, 2004).

Na fabricação de iogurte tradicional esta etapa se torna bastante importante, pois é necessário que o leite esteja a uma temperatura adequada quando se inoculam as bactérias lácticas. Uma temperatura demasiadamente alta pode inibir ou até destruir os micro-organismos da cultura láctica e se a temperatura estiver muito baixa o tempo de fermentação se prolonga desnecessariamente (PIMENTEL, 2009).

3.1.2.5 Inoculação do fermento láctico e incubação

A inoculação do fermento láctico é feita com 1 a 3 % de cultura à temperatura anteriormente citada por um tempo médio de 4 a 6 h, devendo permanecer nesta até atingir a acidez desejada (pH em torno de 4,5 a 4,7). Temperatura muito alta durante a incubação favorece a contração da coalhada e separação de soro. Temperaturas baixas e, flutuações desta durante a incubação influenciam negativamente na estrutura da coalhada, acarretando inúmeros defeitos. A acidificação irregular pode produzir uma coalhada granulosa e arenosa no produto final (KROLOW e RIBEIRO, 2006).

No processo de produção de iogurte necessita-se de rápida produção do ácido láctico. As culturas lácticas são constituídas de micro-organismos termofílicos que por definição, são aqueles cuja temperatura ótima de crescimento encontra-se na faixa de 37 a 45 °C (BEZERRA et al., 2011).

Os micro-organismos termofílicos utilizados como inóculo são *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, na proporção de 1:1 numa concentração de 2×10^6 a 4×10^6 células/mL e quantidade de 2 a 3 % da mistura básica, o pH e temperatura ótima para o desenvolvimento desses micro-organismos são 6,0/43°C e 6,8/38°C, respectivamente. Quando se emprega a cultura liofilizada a proporção numérica das bactérias continua sendo de 1:1, mas a concentração celular aumenta para de 10^8 células/mL (BEZERRA et al., 2011).

A cultura liofilizada é a mais utilizada pela indústria, pois possui maior facilidade de armazenamento, manipulação e por conter os micro-organismos na proporção certa, o que é difícil de conseguir com as culturas semeadas (FOSCHIERA, 2004).

Bezerra et al. (2011) afirmam que a microflora do iogurte pode crescer muito fácil no leite e a taxa de formação de ácido é acelerada devido ao crescimento associado destes dois micro-organismos (*Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*). O *S. thermophilus* chega a 90°D, enquanto que o *L. bulgaricus* chega a 140°D. O crescimento pode ser dividido em dois estágios. No primeiro estágio o *S. thermophilus*, cresce rapidamente durante a fase inicial da incubação, pois os aminoácidos e peptídeos liberados pelo *L. bulgaricus* estimulam seu desenvolvimento acelerado. Com o aumento da produção de ácido láctico a velocidade de crescimento *S. thermophilus* diminui e o *L. bulgaricus* acelera seu desenvolvimento que em parte é estimulado devido aos compostos gerados pelo *S. thermophilus* (ácido fórmico, gás carbônico e redução de oxigênio disponível no meio).

3.1.2.6 Resfriamento do iogurte

Após atingir a acidez desejada, segue-se o resfriamento, que é um dos pontos críticos na produção de iogurte. Sua função é reduzir a atividade metabólica da cultura “starter”, controlando a acidez do produto e também a separação da água (sinérese) (BEZERRA, et al., 2011; KROLOW e RIBEIRO, 2006).

Segundo Krolow e Ribeiro (2006), a fermentação é interrompida quando o leite apresentar um pH em torno de 4,5 a 4,7 ou uma acidez titulável de 70 a 72°D. Neste ponto, considerado o ponto final, a massa deverá apresentar-se como um gel liso, brilhante, sem desprendimento de soro. Esta interrupção é efetuada através do resfriamento da massa, da seguinte forma:

- a) Na primeira etapa a queda de temperatura para 20 a 24°C, faz cessar a produção de ácido, mas esta não pode ser brusca; deve-se evitar o choque térmico, porque este provoca o encolhimento da massa, resultando no dessoramento; este tempo de resfriamento não deverá ser inferior a 30 min. 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;
- b) Na segunda etapa, a redução da temperatura da massa deve atingir a temperatura de 10°C este deverá ocorrer, no máximo, em 1 h.

Quando o resfriamento não é efetuado no momento ideal, isto acarreta o surgimento de defeitos na elaboração do iogurte: excesso de acidez, desprendimento de soro e formação de grânulos ou textura arenosa (KROLOW e RIBEIRO, 2006). A baixa temperatura, quando da quebra do coágulo, permite que as micelas de caseína reabsorvam o soro, evitando a sinérese. Não efetuar a quebra da coalhada sem ter realizado o resfriamento, pois isto acarretará em sinérese permanente. A quebra da coalhada deverá ser feita com agitação, não devendo permitir a incorporação de ar o qual pode atentar contra a estabilidade do produto final. Se a quebra for insuficiente, pode ocorrer a formação de grumos, que liberam soro e endurecem apresentando um produto com estrutura granular e tendência a dessorar. A agitação excessiva ocasiona a obtenção de um produto demasiadamente líquido com tendência à formação de aglomerados de gordura, constituindo um defeito (KROLOW e RIBEIRO, 2006).

3.1.3 Aspectos relevantes na produção do iogurte

Para Mazochi (2009), o leite utilizado para fabricação de iogurte deve apresentar boa qualidade, ser higienicamente produzido e manipulado, de composição físico-química normal, isento de antimicrobianos e preservativos e não deve ser utilizado congelado, a fim de evitar defeitos na textura do produto.

A textura apresenta um importante papel na aceitação de iogurtes pelos consumidores, e diversos fatores podem afetar esta característica, como: a composição do leite; o tratamento térmico; a adição de leite em pó; as gorduras do leite quando homogeneizadas; a presença de estabilizantes; a cultura bacteriana utilizada; a temperatura de incubação; o pH final e a temperatura de estocagem (PIMENTEL, 2009).

A redução no conteúdo de gordura pode causar alguns defeitos no iogurte como perda de sabor, de consistência ou falta de textura, onde normalmente a gordura removida é substituída por leite em pó desnatado, caseinato de sódio, ou concentrados protéicos de soro de leite. Mas a quantidade desses ingredientes necessária para alcançar o conteúdo de sólidos totais similar ao iogurte integral pode levar a um desenvolvimento ácido excessivo a partir da fermentação da lactose, firmeza excessiva, maior expulsão do soro, e textura granular (GAUCHE, 2007; PIMENTEL, 2009).

As propriedades físicas do iogurte, incluindo a separação do soro (sinérese), apresentam um papel importante na qualidade do produto e aprovação pelo consumidor. A sinérese é parte essencial do processo de produção de queijos, no entanto, a separação do soro

na superfície do produto é considerada o principal defeito na produção de iogurte (GAUCHE, 2007).

Segundo Pimentel (2009); Mazochi (2009), os iogurtes devem apresentar os seguintes atributos importantes: o corpo deve ser viscoso, firme e coeso; a textura deve ser suave, livre de grumos e sem fissuras; deve ter nítido sabor ácido e o maior componente volátil deve ser o acetaldeído. O tempo de vida útil deve ser em torno de 30 dias, mantendo as características próprias, que retenha água sem ocorrer sinérese.

O aparecimento do sabor característico (acetaldeído) ocorre durante as 12 primeiras horas após o resfriamento, propiciando as características finais de um bom iogurte. Este sabor é fornecido pelo lactobacilo. Considerando este aspecto, o iogurte deverá ser consumido no mínimo 12 horas após sua elaboração, tempo suficiente para a formação de todos os compostos aromáticos, consistência e textura (KROLOW e RIBEIRO, 2006).

A acidez provocada pela fermentação, além de estar associada ao desenvolvimento do sabor, torna os iogurtes relativamente estáveis, e inibe o crescimento de bactérias deterioradoras. Sendo que o pH do produto final deve estar entre 4,2 e 4,4 uma vez que a produção exagerada de ácido conduz a uma super acidificação durante a incubação, resfriamento e armazenamento, promovendo características indesejáveis ao produto (BASTIANI, 2009).

As fibras alimentares também fornecem propriedades funcionais quando são incorporadas em sistemas alimentares, como no caso de produtos lácteos, pois, além da capacidade de formar gel, e substituir gordura, elas contribuem para melhoria da textura, das características sensoriais e para o aumento da vida de prateleira de alimentos devido à sua capacidade de se ligar à água (BASTIANI, 2009).

Para Staffolo et al. (2004), o iogurte é um dos produtos lácteos, que futuramente suas vendas deverão aumentar, devido à grande diversificação de produtos, que os incluem: iogurte com redução do conteúdo de gordura, iogurtes probióticos, iogurte batidos, iogurtes líquidos, mousse de iogurte, iogurte gelado (Fronzen iogurt), etc. A chave para o crescimento do mercado é uma avaliação contínua e alteração do produto à altura das expectativas do consumidor.

Segundo Silva (2007), o iogurte 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

acrescentadas. Seu mercado, em suas diversas categorias, vem demonstrando grande potencial de crescimento nos últimos anos.

3.1.4 Importância nutricional do iogurte

O consumo de alimentos fermentados, principalmente derivados do leite, tem sido estimulado por profissionais de saúde, em função de seu perfil nutricional, apresentando proteínas de alto valor biológico e micro-organismos capazes de promover diversos benefícios à saúde humana (BASTIANI, 2009).

O seu consumo está relacionado com a imagem positiva de alimentos saudáveis e nutritivos, associado às suas propriedades sensoriais, podendo ser atribuído também aos benefícios que o mesmo traz ao organismo, tais como, facilitar a ação das proteínas e enzimas digestivas no organismo humano, facilitar a absorção de cálcio, fósforo e ferro, melhorar o sistema imunológico, reduzir o colesterol sérico e ser fonte de galactose (importante na síntese de tecidos nervosos e cerebrosídeos em crianças), bem como ser uma forma indireta de se consumir leite (BASTIANI, 2009; BECKER, 2009).

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, sendo possível o indivíduo aumentar sua tolerância a produtos lácteos por ingestão de produtos fermentados como o iogurte, devido ao fato do teor de lactose ser menor (SILVA, 2007).

Os produtos lácteos fermentados com bactérias lácticas também têm sido utilizados no tratamento de doenças do trato gastrointestinal, como gastro-enterites agudas; efeitos adversos da radioterapia; constipação; alergias alimentares; entre outras. A ingestão destes produtos pode inibir o desenvolvimento de bactérias patogênicas e, por consequência, constituir um meio de prevenção contra infecções gastrintestinais (MAZOCHI, 2009).

Mazochi (2009) cita mais alguns efeitos, como: proteólise, em que as proteínas do leite, que têm um alto valor biológico são parcialmente pré-digeridas por ação das bactérias lácticas, o que permite uma melhor digestão. E as vitaminas do leite ajudam no desenvolvimento das bactérias lácticas que, por sua vez, produzem outras vitaminas, principalmente do complexo B, aumentando assim a variedade de vitaminas presentes nesses produtos fermentados.

3.2 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Os alimentos e ingredientes funcionais podem ser classificados de dois modos, quanto à fonte de origem, vegetal ou animal, ou quanto aos benefícios que oferecem, atuando no sistema gastrointestinal e cardiovascular, no metabolismo de substratos, no crescimento, no desenvolvimento e diferenciação celular, no comportamento das funções fisiológicas e como antioxidantes (NOGUEIRA, 2007).

Os padrões dietéticos estão fortemente atrelados aos crescentes números de doenças modernas, cardiopatologias, neoplasias e outras, decorrentes de um conjunto de fatores gerados por mudanças de hábitos alimentares, de atividade física e lazer. Frente a essas mudanças, aumenta a preocupação dos indivíduos com a alimentação e a saúde, bem como suas interações. Neste contexto, os alimentos funcionais desempenham uma importante função (BASTIANI, 2009).

O Japão foi pioneiro na formulação do processo de regulamentação específica dos alimentos funcionais, processados, similares em aparência aos alimentos convencionais, usados como parte de uma dieta normal e que, além de suas funções básicas nutricionais, comprovadamente trazem benefícios fisiológicos e /ou reduzem o risco de doenças crônicas. Conhecidos como alimentos para uso específico de saúde, eles trazem um selo de aprovação do Ministério da Saúde e Bem-Estar do Japão (COSTA e ROSA, 2010). E no Japão, os alimentos funcionais são definidos como aqueles que apresentam a terceira função. A primeira seria a de fornecer nutrientes para o indivíduo sobreviver, a segunda seria a função sensorial e a terceira a função fisiológica, que regula o sistema imune e as defesas do organismo (BASTIANI, 2009).

Já a legislação brasileira, não define alimento funcional, define alegação de propriedade funcional e alegação de propriedade de saúde, estabelece as diretrizes para sua utilização, bem como as condições de registro desses alimentos (COSTA e ROSA, 2010). De acordo com a Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 1999), alimentos ou ingredientes com alegação de propriedade funcional são aqueles que apresentam papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, no desenvolvimento, na manutenção e outras funções normais do organismo humano; devendo, entretanto, serem seguros para o consumo sem supervisão médica. Para apresentarem alegações de propriedade funcional e, ou, de saúde, os alimentos ou ingredientes devem ser, obrigatoriamente, registrados e o conteúdo da

propaganda desses produtos não pode ser diferente, em seu significado, daquele aprovado para a rotulagem.

Desta forma, os novos alimentos que surgirem no mercado deverão trazer em seu rótulo qual é o benefício para a fisiologia do organismo e porque reduzem o risco de certa doença, informação que deverá ser comprovada através de pesquisas científicas (NOGUEIRA, 2007).

Esses alimentos possuem potencial para promover a saúde através de mecanismos não previstos na nutrição convencional, devendo ser salientado que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura de doenças (SAAD, 2006).

Uma grande variedade de produtos tem sido caracterizada como alimentos funcionais, incluindo componentes que podem afetar inúmeras funções corpóreas, relevantes tanto para o estado de bem-estar e saúde como para a redução do risco de doenças. Esta classe de compostos pertence à nutrição e não à farmacologia, merecendo uma categoria própria, que não inclua suplementos alimentares (NOGUEIRA, 2007).

Os alimentos funcionais vêm adquirindo uma presença crescente na indústria brasileira, e os produtos lácteos apresentam a maior categoria de vendas de alimentos funcionais brasileiros, contribuindo com 73 % do total das vendas de alimentos funcionais, e 11 % de todos os produtos lácteos de vendas no Brasil. Os ingredientes funcionais mais utilizados no desenvolvimento de produtos são as fibras alimentares, oligossacarídeos, ácido láctico, proteínas, minerais, vitaminas, fitoquímicos e antioxidantes (BASTIANI, 2009).

Segundo Rossi (2007) os alimentos funcionais podem atuar não só na prevenção de doenças, mas também no retardamento do envelhecimento precoce, melhorar aspectos estéticos como celulite, retenção hídrica, acne, queda de cabelo, pele seca, unhas frágeis e quebradiças. Entretanto, aqui vale um alerta que os alimentos saudáveis devem ser consumidos em quantidades adequadas às necessidades individuais para desempenharem suas propriedades funcionais. Para evitar o aparecimento de doenças ao longo da vida existe a necessidade de colocar os alimentos funcionais como hábito alimentar. Já sabendo de todos os benefícios destes alimentos, seria importante consumi-los desde a infância para reduzir ou evitar os riscos a saúde.

O desenvolvimento de alimentos funcionais deve combinar em conhecimento científico das funções alvo e a sua possível modulação por componentes alimentares. Um desafio chave no desenvolvimento dos alimentos funcionais é garantir ao consumidor final a

segurança dos alimentos funcionais e a veracidade dos efeitos que proclamam na saúde, desenvolvimento e crescimento (TORRES et al., 2008).

Nos últimos anos, o conceito de alimentos funcionais passou a concentrar-se de maneira intensiva nos aditivos alimentares que podem exercer efeito benéfico sobre a composição da microbiota intestinal. Os prebióticos e os probióticos são atualmente os aditivos alimentares que compõem esses alimentos funcionais (SAAD, 2006).

3.2.1 Probióticos

Os probióticos são micro-organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, são capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002). Esses micro-organismos são, geralmente, bactérias gram-positivas sendo incluídos basicamente em dois gêneros: *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que usualmente são adicionados a leites fermentados na forma liofilizada ou congelada (PIMENTEL, 2009), fermentam a lactose, produzindo ácido láctico e têm a capacidade de manterem-se vivos no produto fermentado e sobreviverem à passagem pelo trato gastrointestinal (SILVA, 2007). As bactérias lácticas mais utilizadas pela indústria alimentícia pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* são: *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. animalis*, *B. longum* e *B.thermophilum* (SAAD, 2006).

Inicialmente, as bifidobactérias foram encontradas nas fezes de crianças amamentadas e também isoladas do leite materno, mais frequentemente *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium breve*. As bifidobactérias são difíceis de cultivar em laboratório, uma vez que têm necessidades nutricionais especiais (RUSSELL et al., 2011). Um dos principais componentes do leite humano são oligossacarídeos, que têm sido identificadas como um fator "bifidogênico".

Por serem habitantes naturais do intestino humano e animal, sua população é influenciada pela idade, dieta, antibióticos, estresse entre outros fatores (SILVA, 2007) e sua proporção diminui com a idade, estabilizando-se como terceiro gênero mais abundante, ou seja, 25 % da flora intestinal total.

Em estudo realizado por Russell et al. (2011) foi verificado que em doentes idosos houve uma diminuição do número total de bifidobactérias e um declínio na diversidade de espécies, esta mudança individual com o avanço da idade, pode desempenhar um papel na susceptibilidade destes indivíduos à doença.

As bifidobactérias são de extrema importância no complexo ecossistema ativo no trato gastrointestinal humano como também de outros mamíferos. O *Bifidobacterium longum* é uma espécie que perdura por toda a vida do hospedeiro, por esse fato é a espécie mais procurada para integrar alimentos funcionais. Sua utilização, principalmente em iogurtes, faz que o teor de lactose diminua em aproximadamente 20 a 25 % no produto final (BECKER, 2009). Todas as espécies de *bifidus* fermentam a lactose e crescem bem em leite. Sua temperatura de crescimento situa-se entre 20 a 46°C e morrem a 60°C. O pH ótimo é de 6,5 a 7,0 e não há crescimento em pH menor que 5,1 ou pH maior que 8,0 (SILVA 2007).

Para exercer um impacto benéfico à saúde, a contagem total de bactérias lácticas viáveis em iogurtes pelo uso de probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo (BRASIL, 2008). Portanto, a concentração de células viáveis do probiótico deve ser ajustada na preparação inicial, levando-se em conta a capacidade de sobrevivência do micro-organismo (STEFE et al., 2008).

Desta forma um micro-organismo probiótico deve necessariamente sobreviver às condições adversas do estômago e colonizar o intestino, mesmo que temporariamente, por meio da adesão ao epitélio intestinal (OLIVEIRA et al., 2002).

Segundo Oliveira et al. (2002) para a utilização de culturas probióticas na tecnologia de fabricação de produtos alimentícios, além da seleção de cepas probióticas para uso humano, as culturas devem ser empregadas com base no seu desempenho tecnológico. Culturas probióticas com boas propriedades tecnológicas devem apresentar boa multiplicação no leite, promover propriedades sensoriais adequadas no produto e serem estáveis e viáveis durante o armazenamento. Desta forma, podem ser manipuladas e incorporadas em produtos alimentícios sem perder a viabilidade e a funcionalidade, resultando em produtos com textura e aroma adequados.

Os probióticos são comercializados na forma de preparações farmacêuticas, em cápsulas ou sachês, ou naturais, como leite fermentado ou iogurtes. Quando comercializados em cápsulas ou sachês, a liofilização do produto permite manter a viabilidade durante longo período de armazenamento na temperatura ambiente (STEFE et al., 2008).

Os alimentos probióticos disponíveis no mercado incluem sobremesas à base de leite, leite fermentado, leite em pó, sorvete, iogurte e diversos tipos de queijo, além de produtos na forma de cápsulas ou produtos em pó para serem dissolvidos em bebidas frias, sucos fortificados, alimentos de origem vegetal fermentado e maioneses (STEFE et al., 2008).

3.2.2 Prebióticos

Os prebióticos são ingredientes alimentares não-digeríveis que promovem à saúde do hospedeiro, estimulando assim, a ação de uma bactéria (ou um grupo) benéfica no trato digestivo (DALLA CORTE, 2008).

Os prebióticos apresentam características tecnológicas importantes e propriedades nutricionais interessantes, são encontrados em vegetais e frutas e podem ser processados industrialmente a partir de materiais renováveis. Em formulações de alimentos, podem melhorar muito as características organolépticas (WANG, 2009).

Para se enquadrarem como ingredientes para alimentos funcionais, devem ser estáveis ao processo de tratamento de alimentos, como o calor, baixo pH, e da reação de *Maillard*, e estes resultados fornecem a base para a seleção de prebióticos para serem utilizados como ingredientes para alimentos funcionais e para prever a extensão que o tratamento afeta a atividade pré-biótica (WANG, 2009).

A maioria dos prebióticos é obtida por extração a partir de plantas (por exemplo, a inulina de chicória), seguido por uma síntese de hidrólise enzimática (por exemplo, oligofrutose de inulina) ou por meio de reações de trans-glicosilação de mono ou dissacarídeos como a sacarose (frutooligossacarídeos) ou lactose (trans-galactosilação de oligossacarídeos ou galactooligossacarídeos), a inulina e o oligossacarídeos são os prebióticos mais estudados e foram reconhecidos como fibras alimentares na maioria dos países (WANG, 2009).

Isso tem atraído muita atenção, porque ao contrário dos probióticos, substâncias prebióticas, não estão sujeitos a problemas de viabilidade. Essas substâncias também têm maiores possibilidades para a incorporação em uma ampla variedade de alimentos comuns. Qualquer alimento que atinge o cólon, como carboidratos não digeríveis, tem potencial prebiótico. Os carboidratos não digeríveis, oligossacarídeos de frutose em particular, são os prebióticos mais estudados. Estes compostos resistem à hidrólise e absorção no trato digestivo humano e alcançam o cólon, onde são fermentados pelas bactérias intestinais, especialmente as bifidobactérias (PEREIRA e GIBSON, 2002).

Um dos prebióticos mais conhecidos são os frutanos, os quais incluem os fruto-oligossacarídeos (FOS) ou oligofrutoses, obtidos pela hidrólise enzimática da inulina de ocorrência natural, e seus análogos sintéticos obtidos por síntese enzimática a partir da

sacarose (GRAY, 2006). Além de galactoligossacarídeos, lactulose, isomaltoligossacarídeos, xiloligossacarídeos e gentioligossacarídeos (SILVA, 2010).

Os FOS são formados por uma molécula de sacarose, com uma, duas ou três unidades de frutose unidas, mediante ligações β -(1-2) à molécula de sacarose. Os frutoligossacarídeos são constituídos de frutose e glicose, tendo menor valor calórico que a sacarose. O grau de polimerização varia de 2 a 10 unidades, abreviados como GF2 (1-kestose), GF3 (nistose) e GF4 (frutosilnistose) de acordo com Egea (2010). A Figura 1 mostra as estruturas químicas dos oligossacarídeos.

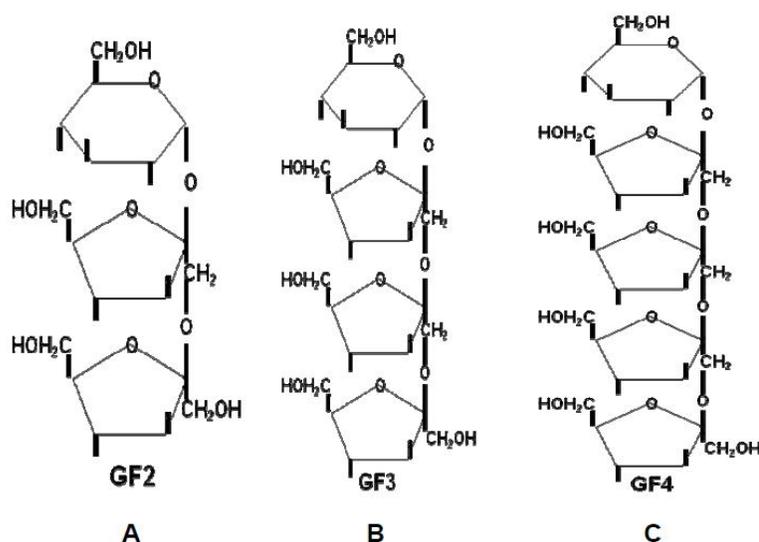


Figura 1. Fórmulas estruturais dos FOS: (A) GF2 (kestose), (B) GF3 (nistose) e (C) GF4 (frutosilnistose). Fonte: EGEA (2010).

Os FOS são os principais compostos reconhecidos e utilizados em alimentos aos quais contribuem propriedades prebióticas. São encontrados naturalmente em vegetais e plantas como alcachofra, raiz de chicória, dália, dente de leão, cebola, alho e banana. Mas, as concentrações presentes são baixas, exigindo um consumo muito elevado para a obtenção dos efeitos fisiológicos desejados (BERNAL, 2004).

Os FOS apresentam propriedades físicas e fisiológicas que tornam um composto de grande potencial de aplicação em alimentos para nutrição humana e animal. São várias as aplicações na indústria de alimentos, podendo ser utilizado na maioria das vezes sem restrições. Em iogurtes os FOS são aplicados como prebióticos na proporção de 2 a 3 % em volume, também utilizado como agente de corpo e textura (OLIVEIRA, 2008).

Também apresentam cerca de um terço do poder adoçante da sacarose, não são calóricos e não podem ser considerados como fonte de energia para os seres humanos, além de poderem ser utilizados de modo seguro por diabéticos. Possuem solubilidade maior que a sacarose, não cristalizam, não precipitam e nem deixam sensação de secura ou areia na boca (SILVA, 2010).

Os oligossacarídeos não digeríveis, quando comparados com as fibras dietéticas, possuem algumas vantagens, como: não causam diarreia quando ingeridos acima da dose recomendada, são ligeiramente doces, não têm textura e sabor desagradáveis, são totalmente solúveis em água, fisicamente estáveis e fáceis de serem incorporados em alimentos e bebidas processados (EGEA, 2010).

Silva (2010), afirma que os FOS não são degradados durante a maioria dos processos de aquecimento, mas podem ser hidrolizados em frutose por condições muito ácidas e em condições de exposição prolongada em relação ao tempo/temperatura.

3.2.3 Produtos Simbióticos

Os simbióticos são combinações de probióticos e prebióticos, sendo também uma modalidade terapêutica emergente (EWASCHUK e DIELEMAN, 2006; PIMENTEL, 2009), como exemplo, quando um prebiótico como FOS é adicionado a um iogurte probiótico.

Os simbióticos promovem o crescimento de bactérias benéficas já existentes no cólon, assim como aumentam a sobrevivência, implantação e crescimento das bactérias que estão sendo adicionadas com o produto. Este último fato, decorre da presença do substrato específico para o probiótico estar disponível para a fermentação (PIMENTEL, 2009).

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 (SILVA, 2007).

Na aplicação em alimentos, o ideal é que o ingrediente selecionado seja um substrato metabolizável pelo micro-organismo probiótico no intestino, o que possibilitaria um aumento na capacidade de sobrevivência do probiótico. Um exemplo seria o probiótico bifidobactéria, associado ao prebiótico galacto-oligossacarídeo. Outros exemplos de alimentos simbióticos incluem as bifidobactérias associadas à fruto-oligossacarídeos (STEFE et al., 2008).

3.2.4 Importância nutricional dos probióticos e prebióticos

É possível aumentar o número de micro-organismos promotores da saúde no trato gastrointestinal (TGI), através da introdução de probióticos pela alimentação, o qual irá modificar seletivamente a composição da microbiota, fornecendo ao probiótico vantagem competitiva sobre outras bactérias do ecossistema (BECKER, 2009).

As bifidobactérias estimulam o sistema imunológico, produzindo vitaminas do complexo B, redução dos níveis e de amônia no sangue e ajudam a restaurar a flora intestinal normal após a antibioticoterapia (WANG, 2009). Quando seu crescimento for estimulado pelo uso de fruto-oligossacarídeos (FOS), são capazes de produzir vitaminas B1, B2, B6, B12 e ácido nicotínico e fólico (STEFE et al., 2008).

Segundo Donkor et al. (2007); Castro et al. (2009), os prebióticos podem exercer um efeito protetor sobre as bactérias probióticas, como a melhoria da sua sobrevivência e a atividade durante o armazenamento do produto contendo probióticos, assim como a passagem pelo trato gastrointestinal (TGI), que por seu efeito antagônico suprimem a atividade das bactérias putrefativas e reduzem a formação de produtos tóxicos da fermentação. Previnem ainda doenças patogênicas, diarreia e prisão de ventre, protegem as funções do fígado, reduzem o colesterol e a pressão sanguínea (THAMER e PENNA, 2006).

Entretanto, os efeitos benéficos da associação dos FOS às bifidobactérias podem ser alcançados também pela produção e liberação de ácidos graxos de cadeia curta como ácido acético, propiônico, e butírico, além de CO_2 , CH_4 e H_2 . Quando esses ácidos graxos são absorvidos, eles contribuem para o *pool* de energia disponível do hospedeiro e podem proteger contra mudanças patológicas na mucosa do cólon. Além disso, uma concentração mais elevada de ácidos graxos de cadeia curta auxilia na manutenção de um pH apropriado no lúmen do cólon, crucial para a expressão de muitas enzimas bacterianas sobre compostos estranhos e sobre o metabolismo de carcinógenos no intestino (SAAD, 2006), e com o gás produzido no interior do intestino, estimulam o peristaltismo (GRAY, 2006).

Com a produção dos ácidos relatos, também, as absorções de cálcio, ferro e magnésio são facilitadas, e com o consumo de 15 g de FOS por dia, a absorção de Ca é aumentada em 10,8 % em humanos (SILVEIRA, 2009).

Gray (2006), afirma que em estudos com animais e em alguns seres humanos, a fermentação colônica de carboidratos não-digeríveis, como os oligossacarídeos, melhoraram a

absorção de minerais como o cálcio, magnésio e ferro. Podendo ter implicações positivas, por exemplo, aumento da densidade óssea.

A fermentação de fibras no colón está associada à liberação e solubilização de minerais, o que facilita sua absorção e diminuição do risco de osteoporose, resultante da absorção diminuída de minerais, particularmente o cálcio (BECKER, 2009). Neste caso a fermentação láctica pelas respectivas bactérias pode aumentar a concentração de nutrientes da dieta, pois elas são caracterizadas pela liberação de diversas enzimas no lúmen intestinal, exercendo efeitos de sinergia na digestão e reduzindo sintomas de deficiência na absorção de nutrientes (DALLA CORTE, 2008).

O carboidrato não-digerido que chega ao intestino grosso altera a consistência das fezes (tornando-as mais pastosas), aumentando o peso e a frequência da defecação. Em elevada ingestão de fibra alimentar, o peso das fezes tende a ser elevado e o tempo de trânsito intestinal reduzido. Estes dois fatores podem contribuir para a prevenção de distúrbios do intestino grosso, por exemplo, constipação, diverticulite e câncer do intestino grosso (GRAY, 2006).

A evidência para modulação dietética do risco de câncer é maior para câncer de cólon, que é um dos principais causadores de mortes por neoplasia maligna na Europa e na América. O mecanismo pelo qual os probióticos exercem efeito anticancerígeno é que os probióticos podem ligar-se a compostos mutagênicos e, assim, estimular a excreção fecal ou urinária de mutagens. Os probióticos também podem inibir a conversão de pré-carcinógenos a agentes cancerígenos (BROEKAERT e WALKER, 2006).

Outro estudo realizado sugere uma redução moderada dos níveis de colesterol com a ingestão de produtos lácteos fermentados. Vários experimentos *in vitro* com lactobacilos e bifidobactérias, evidenciaram a capacidade de algumas cepas dessas bactérias para assimilar o colesterol, na presença de ácidos biliares (PEREIRA e GIBSON 2002). Isso levou os autores a sugerirem que a ingestão de bactérias lácticas pode ser considerada como uma alternativa "biológica" a intervenções médicas ou cirúrgicas para o tratamento da hipercolesterolemia. O mecanismo proposto para redução do colesterol é comparável á de um tratamento de colestiramina, que, como outro sequestrante de sais biliares, ligam-se aos sais biliares e os impede de ser reabsorvido (PEREIRA e GIBSON 2002).

A fibra alimentar também pode ter efeitos no retardo da absorção de gorduras e carboidratos no intestino delgado e pode auxiliar no metabolismo da insulina. Também pode baixar o nível de triacilglicerol circulante e, como resultado, pode reduzir o risco de

cardiopatia coronariana. A presença de alguns tipos de fibra alimentar retarda a absorção de glicose pelo intestino delgado, retardando a elevação da glicemia e baixando o nível máximo da glicose no sangue. Por sua vez, esses efeitos atenuam a resposta da insulina, resultando no declínio mais lento no nível glicêmico (GRAY, 2006).

Os FOS também aumentam a produção de peptídeos intestinais, ou seja, os hormônios incretina, GIP (polipeptídeo inibitório gástrico) e GLP-1 (peptídeo tipo 1 glucagon). Ambos os peptídeos são conhecidos por regular a liberação de insulina pós prandial e também para ter ações diretas semelhante à insulina no metabolismo lipídico. Em conclusão, a relação parece existir entre a modulação de hormônios e produção de peptídeo intestinal e do efeito antilipogênico atribuído ao FOS (PEREIRA e GIBSON, 2002).

Tem sido relatado que uma dieta rica em fibras não digeríveis diminui o peso corporal, da massa de gordura e da gravidade do diabetes. Isto sugere que, a flora intestinal contribui para a regulação fisiopatológica da endotoxemia, que dá o tom da inflamação para a ocorrência de diabetes/obesidade. Neste caso, seria vantajoso desenvolver métodos específicos para favorecer o crescimento de bifidobactérias e impedir o efeito deletério do elevado teor de gordura da doença induzida por dieta metabólica (RUSSELL et al., 2011).

Para Saad (2006), a diminuição da inflamação e de reações de hipersensibilidade pelos probióticos, faz gerar um meio de prevenção primária da alergia em indivíduos suscetíveis. Como por exemplo, ter efeito probiótico fora do trato gastrointestinal e capacidade de reduzir os sintomas da dermatite atópica (BROEKAERT e WALKER, 2006).

Dalla Corte (2008), afirma que a resposta imune é estimulada por efeitos mediados pela ativação dos macrófagos, pelo aumento de níveis de citocinas e atividade de células destruidoras naturais e/ou de níveis de imunoglobulinas, sendo que estes efeitos ocorrem sem resposta inflamatória prejudicial. O aumento na resposta imune ocorre quando consumidos concomitantemente probióticos e bactérias lácticas como, por exemplo, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.

Além disso, a colonização adequada com probióticos resulta em uma resposta equilibrada das células T Helper (que produzem interleucina-2, interferon e outras substâncias que ativam as células B para produzir anticorpos) e anula qualquer desequilíbrio nas respostas TH1/TH2 que podem contribuir para a doença. A resposta TH1 caracteriza-se por produção de citocinas, e é eficaz na eliminação dos patogênicos intracelulares, tais como vírus e bactérias intracelulares, encontradas na doença de Crohn e em gastrite induzida por *Helicobacter pylori*. A resposta TH2 caracteriza-se pelo estímulo da produção de anticorpos

pelos linfócitos B e é eficaz contra organismos que circulem no sangue (bactérias extracelulares e parasitas, desequilíbrio TH2 descritos na doença atópica). No entanto, seu modo de ação completo e seu significado clínico ainda precisam ser determinados, a fim de recomendar o seu papel na prevenção e atenuação de uma doença crônica (BROEKAERT e WALKER, 2006).

Os probióticos têm a capacidade de atenuar a gastrite induzida pelo *H. pylori* no homem, bem como, têm potencial para modificar as taxas de erradicação. Portanto, iogurtes contendo probióticos vivos podem se tornar baratas ferramentas terapêuticas para o tratamento da gastrite por *H. pylori* (BROEKAERT e WALKER, 2006).

Russell et al. (2011), relata que a suplementação de bactérias probióticas, na forma de bifidobactérias para bebês, pode ajudar a resolver o problema da diarreia infecciosa, que é um problema mundial de saúde, e continua a ser uma das principais causas de doença e morte em muitos países em desenvolvimento.

Por reduzir o teor de lactose em iogurtes, os probióticos podem auxiliar as pessoas com intolerância a lactose a utilizar os produtos lácteos, por aumentar a digestão e metabolismo da lactose (SILVA, 2010).

De acordo com a legislação brasileira, para um alimento ter alegação da propriedade funcional por adição de FOS é necessário que o mesmo tenha, no mínimo 3 g do ingrediente se o alimento for sólido e 1,5 g se for líquido, por porção diária de consumo. O consumo do ingrediente não deve ultrapassar a quantidade de 30 g de ingestão diária (BRASIL, 2002).

Já para Oliveira (2008), doses de 4 a 5 g ao dia de FOS com valor calórico de 1,5 Kcal/g são suficientes para estimular o crescimento de *Bifidobacterium*.

Os mecanismos de ação certamente devem ser devidamente definidos, mas é cada vez mais evidente que as alterações da flora intestinal pela ingestão de prebióticos podem interagir com o componente imunológico do intestino e não produzirá apenas efeitos gastrintestinais de proteção, mas pode produzir efeitos sistêmicos, que por sua vez podem ter significado em outras superfícies das mucosas, como a pele e vias respiratórias, proporcionando assim um amplo benefício sistêmico (WANG, 2009).

Portanto, segundo Huebner et al. (2008), os prebióticos sozinhos ou combinados com bactérias probióticas na forma de simbióticos são reconhecidos como tendo a capacidade de influenciar e melhorar a saúde gastrointestinal e geral dos seres humanos.

3.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como já citado anteriormente, vários são os trabalhos que relatam as propriedades funcionais, devidamente comprovadas dos produtos com probióticos e prebióticos, os quais previnem e auxiliam na prevenção de doenças patogênicas, diarreia e prisão de ventre, reduzem o colesterol e a pressão sanguínea. Além disso, auxiliam no aumento da digestão e metabolismo da lactose, aumento de reciclagem de compostos como estrógeno, aumento da síntese de vitaminas e aumento da produção de compostos imuno estimulantes que possuem atividade antitumoral, entre outras.

Com base nas citações apresentadas, verifica-se que são poucos os trabalhos que avaliam os efeitos de diferentes concentrações dos probióticos (*Bifidobacterium*) associado à cultura láctea convencional de iogurte e a adição de fruto-oligossacarídeos nas características físico-químicas, reológicas, microbiológicas e sensoriais, empregando metodologia de planejamento de experimentos, devido a isto justifica-se o emprego desses métodos no presente trabalho.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste item será apresentada a metodologia de fabricação do iogurte adicionado de cultura probiótica (*Bifidobacterium*) e prebiótica (Fruto-oligossacarídeo - FOS), caracterização e avaliação da estabilidade físico-química (pH, acidez, gordura, sinérese, proteína, °Brix -sólidos solúveis totais, cor objetiva, viscosidade, lactose, frutose, glicose, sacarose, kestose, nistose e frutossilnistose), microbiológica (contagem de bactérias lácticas totais) e sensorial (aceitação geral).

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Matéria-prima e culturas lácticas empregadas na formulação de iogurte

As matérias primas empregadas na elaboração do iogurte: leite UHT longa vida semi-desnatado (1 % de gordura, Elegê®), leite em pó desnatado (Elegê®), açúcar refinado especial (União®), Fruto-oligossacarídeos comercial (Fiber FOS®), corante em pó rosa (Regina®), aroma líquido de framboesa (Duas Rodas®).

Na elaboração das formulações as seguintes culturas lácticas comerciais liofilizadas foram utilizadas: Cultura Tradicional Termofílica; contendo cepas de *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* e *Lactococcus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* (Fermento DVS YF L812, da LC Bolonha®); Cultura Probiótica láctica Termofílica; contendo uma cepa definida de *Bifidobacterium* (FD-DVS BB-12® - Probio-Tec™ - da Chr. Hansen, Três Cantos – Madrid).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Processo de fabricação do iogurte

O desenvolvimento do produto e as análises físico-químicas, microbiológicas, reológicas e sensoriais foram realizadas nos laboratórios pertencentes ao Departamento de Ciências Agrárias do Curso de Engenharia de Alimentos (Mini-Usinas de processamento de

alimentos, Laboratório de Análise de Alimentos, Laboratório de Análise Sensorial), da Universidade Regional Integrada do alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim/RS.

Os iogurtes foram elaborados segundo metodologia descrita por Krolow e Ribeiro (2006) e adaptada, de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 2. As concentrações de cultura probiótica e prebiótica (FOS) foram definidas, seguindo metodologia de planejamento de experimentos, conforme descritas na Tabela 1.

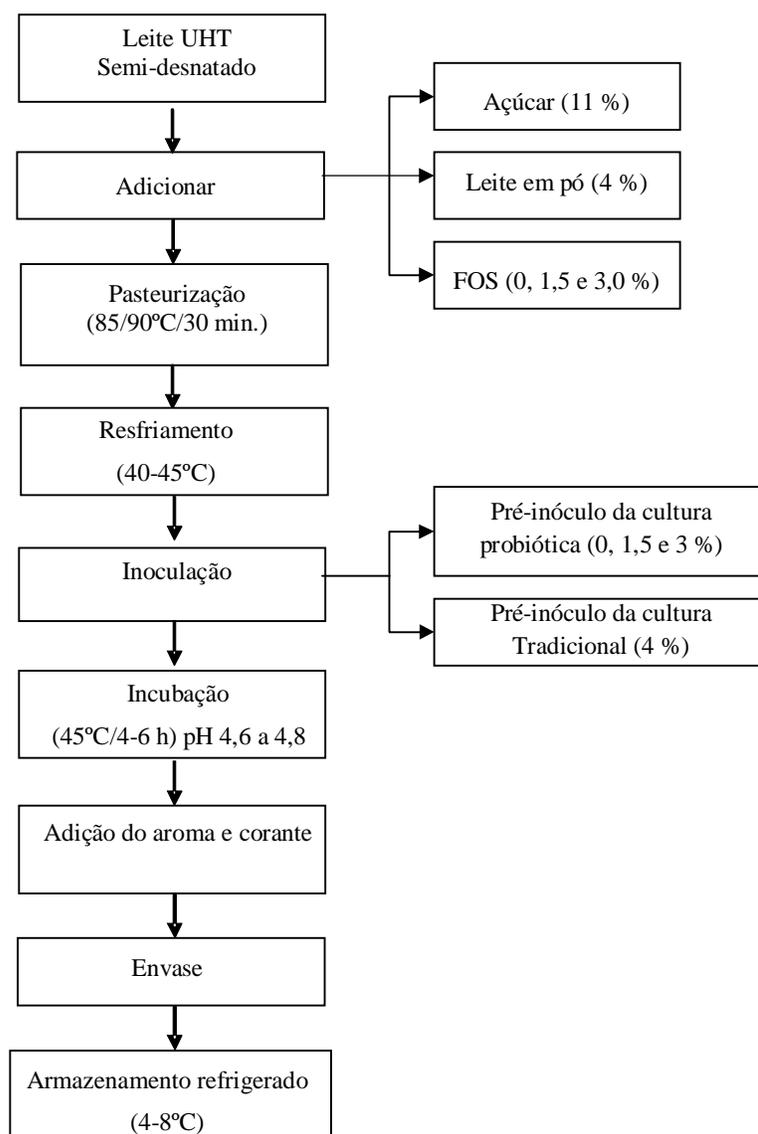


Figura 2. Fluxograma do processo de desenvolvimento de iogurte produzido com culturas lácticas tradicionais e probióticas adicionadas de fruto-oligosacarídeo.

4.2.1.1 Preparo do pré-inóculo

As culturas lácticas (Tradicional e Probiótica) foram adquiridas na forma liofilizada, e após testes preliminares, concluiu-se que para ambas as culturas é necessário fazer o pré-inóculo para serem adicionadas no iogurte.

Para cultura láctica tradicional e probiótica o pré-inóculo foi realizado segundo recomendação do fabricante (0,01 %), onde procedeu-se da seguinte forma: Utilizou-se 100 mL de leite em pó desengordurado (hidratado e aquecido até 100°C/10-15 min.), resfriado em banho de gelo e após resfriamento, adicionado a cultura láctica e mantidas em estufa 37° C/6 h. As culturas (Tradicional e Probiótica) foram preparadas separadas, para em seguida serem distribuídas conforme planejamento de experimento nas diferentes formulações de iogurte (Tabela 1).

4.2.1.2 Elaboração das formulações de iogurte

Os ingredientes utilizados como: leite, leite em pó, FOS e o açúcar, foram misturados e submetidos a uma etapa de pasteurização à temperatura de 85-90°C/30 min., em seguida resfriada até temperatura de 40-45°C. Posteriormente, adicionou-se o pré-inóculo da cultura probiótica e cultura tradicional (conforme o planejamento de experimentos (Tabela 1)), homogeneizado e mantido em estufa a 45°C por um período de 4 a 6 h (pH de 4,6 a 4,8). Após incubação (~6 h) foi adicionado o aroma e o corante. As formulações foram envasadas em frascos plástico de 500 e 1000 mL (Figura 3) e armazenadas a 4°C, para posteriores análises físico-químicas, microbiológicas, reológicas e sensoriais. As análises foram realizadas, em diferentes dias de armazenamento refrigerado.



Figura 3. Aspecto visual do iogurte após envase - Sabor Framboesa

Ensaios preliminares apontaram que o aroma líquido de framboesa na concentração de 0,026 kg/100 kg de produto e de corante rosa em pó de 0,8 g/L de produto, apresentaram as melhores características para a aplicação nas formulações de iogurtes.

4.2.2 Planejamento experimental para obtenção de iogurte

Neste estudo, os níveis das variáveis foram definidos de acordo com os dados disponíveis na literatura para produtos similares e através de testes preliminares. Os níveis das variáveis do estudo do planejamento fatorial 2² estão descritos nas Tabelas 1. As variáveis, concentração de açúcar, leite em pó, aroma, sabor e cultura láctica tradicional e tempo de fermentação foram mantidas fixas.

Tabela 1. Níveis utilizados no planejamento 2² (com triplicata de ponto central) para fabricação do iogurte

Variáveis Independentes	Códigos	Níveis		
		-1	0*	+1
Fruto-oligossacarídeos (%)	X ₁	0	1,5	3,0
Cultura láctica probiótica (%)	X ₂	0	1,5	3,0

*Ponto Central do planejamento de experimentos

4.2.3 Caracterização dos iogurtes

Para avaliar as características do produto desenvolvido foram realizadas as determinações físico-químicas (pH, Acidez total, Gordura, Sinérese, °Brix (sólidos solúveis totais), Proteína, Cor objetiva, análise de açúcares e fruto-oligossacarídeo), reológicas (Viscosidade), microbiológicas e sensoriais.

As determinações foram realizadas em triplicata em diferentes dias (1, 7, 14, 21 e 28 dias) de armazenamento refrigerado. Somente a análise sensorial foi realizada até o 21º dia de armazenamento.

4.2.3.1 pH

O pH do meio de fermentação foi determinado com o potenciômetro, segundo procedimento de (SILVA et al., 1997). Sendo feitas após a abertura das embalagens a temperatura de 8°C, submetendo 50 mL de amostra em béquer e mergulhado o bulbo do eletrodo de medição na amostra. A leitura era feita após estabilização.

4.2.3.2 Determinação de sólidos solúveis totais (°Brix)

Para determinação dos sólidos solúveis totais, foi utilizado o método refratométrico (BERNAL, 2004). As leituras do grau Brix foram feitas por refratometria, utilizando refratômetro de Abbé (Marca Bel[®] Equipamentos Ltda.), corrigido para 20°C. O aparelho foi calibrado a temperatura ambiente com água deionizada (índice de refração = 1,3330 e 0°C Brix a 20°C) e procederam-se as leituras das amostras.

4.2.3.3 Acidez total titulável (expressa como % de Ácido láctico)

A acidez, em termos de ácido láctico, foi determinada por titulação, segundo método oficial da AOAC (1997). A determinação da acidez total foi realizada medindo-se o teor de ácido láctico, pela titulação com NaOH 0,1 mol/L, com alíquotas de 5 mL de amostra, na presença de fenolftaleína como indicador (KEMPKA et al., 2008).

4.2.3.4 Determinação dos açúcares (Lactose, frutose, glicose e sacarose)

A concentração dos açúcares (lactose, frutose, glicose e sacarose) foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Agilent 1100 Series, Detector – RID, Coluna NH₂ Fenomenex 100 Å).

A quantificação foi realizada pelo método dos padrões externos de lactose (Difco Ltda.) D-frutose (Synth), D-glicose (Vetec) e sacarose (Fmaia) em diferentes concentrações (500; 1000; 2000; 5000 e 10000 ppm).

4.2.3.5 Determinação de Fruto-oligossacarídeo (FOS) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para realização deste trabalho foi utilizado um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE (Agilent 1100 Series), com detector de Índice de Refração- RID, Coluna de NH₂ (Fenomenex 100 Å).

4.2.3.5.1 Caracterização do FOS Comercial

Os testes de caracterização foram baseados segundo metodologia de Richetti et al. (2011), utilizando padrões químicos de kestose (GF2), nistose (GF3) e frutossilnístose (GF4), obtidos comercialmente puros da Wako Pure Chemical Industries, Ltda. As condições cromatográficas foram: fase-móvel constituída de acetonitrila/água (70:30, v/v); coluna NH₂, (vazão 1 mL/min.); Temperatura da coluna 20°C; Temperatura do detector 25°C e tempo de corrida 15 min.;

Para determinar a concentração final de fruto-oligossacarídeos (FOS) nas formulações de iogurte, vários testes preliminares foram realizados, no sentido de obter-se a melhor % de recuperação do FOS. Primeiramente, foi necessário caracterizar a amostra de FOS comercial (Fiber FOS®), já que as informações de caracterização não estavam disponíveis na ficha técnica fornecida pelo fabricante (Anexo C).

a) Preparo da amostra para eliminação de interferentes do iogurte

Levando-se em consideração que o iogurte contém proteína e gordura, faz-se imprescindível a separação dos mesmos, pois estes componentes quando presentes comprometem a qualidade da coluna cromatográfica (CLAE). Desta forma realizaram-se ensaios de precipitação de proteína e gordura dos iogurtes com e sem adição de FOS, visando a recuperação dos FOS das amostras:

- Ensaio 1: 2,0 g da amostra de iogurte foi adicionada em balão volumétrico de 25 mL, com 10 mL de água mili-Q a 30°C. Após mistura o volume (25 mL) foi aferido com acetonitrila. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 2000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi separado e filtrado em um filtro orgânico de membrana (Allcrom®) com porosidade de 0,45 µm e analisado;

- Ensaio 2: Adicionou-se 2,0 g da amostra a 10 mL de solução acetato de chumbo saturado e 5 mL solução salina (NaCl) saturada em balão 25 mL. Após homogeneizado completou-se o volume (25 mL) com acetonitrila. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 2000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi separado e filtrado em um filtro orgânico de membrana (Allcrom®) com porosidade de 0,45 µm;

As condições cromatográficas e padrões seguiram a metodologia de Richetti et al. (2011), descrita anteriormente, no entanto foi modificada a temperatura da coluna para 60°C, com o intuito de evitar a retenção da amostra na coluna.

No terceiro ensaio foi testado o padrão do FOS comercial (Fiber FOS®) à concentração de 1000 ppm, mantidas as 2 metodologias anteriores, e mesmas condições cromatográficas de Richetti et al. (2011):

- Ensaio 3: em 25 ml de iogurte sem FOS foi adicionado 0,25 g de FOS comercial. Após homogeneização realizou-se os mesmos procedimentos adotados para os Ensaios 1 e 2. Este ensaio foi conduzido para verificar se o processo de purificação da amostra não estava removendo o FOS, também observar se as bactérias lácticas não estavam utilizando o FOS como substrato durante a estocagem. Neste caso foi diminuído a temperatura da coluna cromatográfica para 20°C;

Foi realizada uma nova etapa, onde foi efetuado um ensaio (Ensaio 4) com diferentes concentrações do padrão do FOS comercial (Fiber FOS®) e dos açúcares (lactose, glicose, frutose e sacarose). O FOS foi diluído em água e após com fase móvel (acetonitrila:água-70:30, v/v):

- Ensaio 4: Foi preparada uma solução com 1 % (10.000 ppm) FOS comercial (Fiber FOS®). A partir desta solução procedeu-se a preparação dos padrões (500, 1000, e 5000 ppm) mediante diluição com a fase móvel;
- O preparo das soluções de sacarose, glicose, frutose e lactose, foram na concentração de 2500 ppm (0,25 %), primeiramente com água mili-Q e completado com fase móvel (10 ml); Cada açúcar foi injetado e analisado separadamente. Para obter uma comparação fidedigna foram analisados também os padrões de FOS na concentração de 1000 ppm;

b) Ensaios de recuperação do FOS comercial

Realizaram-se três testes (Ensaios 5, 6 e 7) distintos com uma máxima concentração de FOS na amostra de iogurte, que constava de 5 % de FOS adicionado no momento da

análise no iogurte, em seguida diluído com 10 ml de água mili-Q (10.000 ppm), onde foram preparadas da seguinte forma:

- Ensaio 5: 2,5 mL da solução preparada foi misturada com mais 2,5 mL de fase-móvel, homogeneizada, após foi centrifugado a 2000 rpm/10min. Do sobrenadante foi filtrado em um filtro orgânico com porosidade de 0,45 µm (Figura 12-A); Este mesmo procedimento foi realizado com acetonitrila pura no lugar da fase-móvel (Figura 12-B);
- Ensaio 6: 1 mL da solução preparada foi misturada com 4 mL de fase-móvel, homogeneizada e após centrifugado a 2000 rpm/10min. Do sobrenadante foi filtrado em um filtro orgânico com porosidade de 0,45 µm; Este mesmo procedimento foi realizado com acetonitrila pura no lugar da fase-móvel;
- Ensaio 7: Para este teste foi utilizada a solução preparada, adicionada de água mili-Q, e centrifugada a 2000 rpm/10min., do sobrenadante, foi realizada as mesmas diluições do Ensaio 5 e 6, porém sem necessidade de centrifugar novamente;

Todos os ensaios foram analisados com iogurte contendo FOS e iogurte sem adição de FOS. O preparo das soluções de sacarose, glicose, frutose e lactose foram realizados nas concentrações de 0,1 e 1 % destes açúcares e os padrões de FOS comercial (Fiber FOS®) nas concentrações de 500, 1000 e 5000 ppm. Anterior a injeção de todas as referidas amostras, foram injetados os padrões de FOS, a fim de que houvesse uma melhor comparação e precisão dos resultados.

4.2.3.6 Índice de Sinérese

A sinérese foi determinada pelo método da drenagem, onde uma determinada quantidade de amostra era transferida para um funil contendo papel filtro. O volume de soro coletado durante 4 h a 4°C era pesado (MANZANO, 2007). A sinérese foi calculada através da equação 1:

$$\text{Sinérese (\%)} = [(\text{peso do soro após filtração}/\text{peso da amostra}) \times 100] \quad (1)$$

4.2.3.7 Viscosidade

A viscosidade foi determinada utilizando um viscosímetro rotacional, (Marca Brookfield - PROGRAMMABLE DV-III + Rheometer). Para a análise empregou-se 50 mL de amostra à temperatura ambiente e número de spindle 31. Os resultados foram expressos em centipoise (cP).

4.2.3.8 Proteína

O teor de nitrogênio foi determinado pelo método de kjeldahl, o qual consta de três etapas distintas: - Digestão da amostra em sistema digestor Kjeldahl, empregando ácido sulfúrico e pastilha catalisadora (3,5 g de K_2SO_4 e 3,5 mg de Se, FOSS); - Destilação em sistema destilador Kjeldahl, empregando solução de ácido bórico a 4 % com indicador misto como solução receptora da amônia destilada; - Titulação do borato de amônia formado com solução de HCl 0,1 N. Na quantificação da proteína foi empregado o teor de nitrogênio multiplicando-se pelo fator de conversão de nitrogênio em proteína de 6,38.

4.2.3.9 Gordura

A gordura foi extraída pelo método de extração com mistura de solventes (éter etílico e éter de petróleo) a frio (Norma FIL-IDF 5B, 1986). Após, a recuperação do solvente em sistema soxhelt, a gordura foi quantificada pelo método gravimétrico, com dessecação em estufa a 105°C.

4.2.3.10 Cor objetiva

A cor foi determinada utilizando um colorímetro portátil (Minolta CR400), com fonte de luz D65, na escala de L^* , a^* , b^* do sistema CIELab, realizando-se as leituras em temperatura ambiente. No espaço colorimétrico CIELAB, definido por L^* , a^* , b^* , a coordenada L^* corresponde a luminosidade, a^* e b^* referem-se às coordenadas de cromaticidade verde(-)/vermelho(+) e azul(-)/amarelo(+), respectivamente.

4.2.4 Caracterização microbiológica dos iogurtes

4.2.4.1 Contagem de bactérias lácticas totais

A partir de testes preliminares e a utilização de vários meios seletivos (M17, MRS), juntamente com vários componentes, não foi possível determinar a contagem somente de *Bifidobacterium*, por isso realizou-se a contagem de bactérias lácticas totais, no decorrer do trabalho será aplicado o método de diferença da contagem das bifidobactérias, em relação a uma formulação controle (sem adição de probiótico).

A inoculação foi realizada utilizando o meio Agar De Man, Rogosa & Sharpe (MRS) pelo método de plaqueamento em profundidade, onde foi adicionada 1 mL de amostra em um tubo com rosca contendo 9 mL de solução de citrato de sódio 2 % estéril. Após transferiu-se 1 mL desta diluição para placa de petri esterilizada, era colocado uma camada de meio MRS e uma sobre camada com meio Agar-Agar. A partir desta diluição foram feitas diluições subseqüentes (10^{-2} a 10^{-8}), necessárias à análise do produto. As placas foram incubadas invertidas durante 48 h a 30°C e a contagem foi realizada em placas de Petri que apresentaram até 250 colônias e expressas por Log UFC/mL (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

4.2.5 Análise sensorial

Nas avaliações sensoriais, participaram dos testes julgadores não treinados (mínimo 30 pessoas), de ambas as faixas etárias (18 a 45 anos) e sexo, acadêmicos dos cursos de Engenharia de Alimentos e Nutrição e funcionários do Centro Tecnológico da URI – Campus de Erechim. Os provadores permaneciam em cabines individuais, onde recebiam 5 amostras diferentes de iogurte, contendo aproximadamente 15-20 mL acondicionado em copo plástico, distribuídos de forma balanceadas em recipientes codificados com números de três dígitos e acompanhados de um copo de água mineral (Branco) e ficha de avaliação sensorial. A temperatura das amostras oferecidas resfriadas era de 4 a 5 °C.

Nas avaliações sensoriais das formulações, nos distintos períodos de armazenamento (0, 7, 14 e 21 dias), foi empregado o teste de aceitação - Escala hedônica (9 pontos), que avalia o quanto um consumidor gosta ou desgosta de um determinado produto. No Apêndice A, consta a ficha para avaliação sensorial das amostras.

4.2.6 Tratamento estatístico

Os resultados das análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais foram analisados conforme metodologia de planejamento de experimentos e Análise de Variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey para comparar as diferenças entre as médias, com auxílio do software STATISTICA (Statsoft, v. 6.0 *for Windows*), com nível de significância de 90 e 95 % de confiança. Para análise sensorial, também, foi demonstrado graficamente os resultados pelos histogramas de frequência - aceitação geral (%) das formulações.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão apresentados os resultados e discussão referentes aos efeitos das diferentes concentrações adicionadas de cultura probiótica e prebiótico (FOS) em iogurtes, sobre os atributos físico-químicos, microbiológicos, reológicos e sensoriais, durante o período de armazenamento.

5.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

5.1.1 pH e Acidez

A Tabela 2 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^2 (valores codificados e reais) com as respostas em pH e acidez das formulações de iogurte durante o período de armazenamento.

Tabela 2 - Matriz do planejamento fatorial 2^2 completo (valores codificados e reais) e resposta em pH e acidez (% de Ácido láctico) no 1º, 7º, 14º, 21º e 28º dia de armazenamento refrigerado

Ensaio	Variáveis		Respostas**									
	Independentes*		pH					Acidez (% de Ácido láctico)				
	X ₁	X ₂	1	7	14	21	28	1	7	14	21	28
1	-1 (0)	-1 (0)	4,50 ^a (0,015)	4,52 ^a (0,010)	4,45 ^a (0,010)	4,18 ^b (0,082)	4,12 ^b (0,118)	0,95 ^c (0,013)	0,98 ^{cb} (0,055)	1,05 ^b (0,009)	1,23 ^a (0,018)	1,22 ^a (0,022)
2	1 (3,0)	-1 (0)	4,84 ^a (0,010)	4,50 ^b (0,010)	4,37 ^c (0,010)	4,32 ^d (0,010)	4,09 ^e (0,023)	0,85 ^b (0,016)	0,90 ^b (0,027)	0,94 ^b (0,018)	1,14 ^a (0,068)	1,16 ^a (0,032)
3	-1 (0)	1 (3,0)	4,97 ^a (0,015)	4,70 ^b (0,015)	4,39 ^c (0,010)	4,25 ^d (0,047)	4,20 ^d (0,030)	0,82 ^c (0,007)	0,94 ^b (0,025)	1,00 ^b (0,023)	1,15 ^a (0,051)	1,17 ^a (0,069)
4	1 (3,0)	1 (3,0)	4,77 ^a (0,012)	4,50 ^b (0,015)	4,45 ^c (0,010)	4,35 ^d (0,015)	4,20 ^e (0,015)	0,86 ^c (0,066)	0,95 ^{bc} (0,067)	0,99 ^b (0,039)	0,98 ^{bc} (0,036)	1,21 ^a (0,031)
5	0 (1,5)	0 (1,5)	4,82 ^a (0,015)	4,46 ^b (0,015)	4,50 ^b (0,006)	4,34 ^c (0,036)	4,23 ^d (0,010)	0,80 ^c (0,012)	1,00 ^b (0,024)	1,00 ^b (0,046)	0,98 ^b (0,025)	1,24 ^a (0,014)

*X₁= Fruto-oligossacarídeos (%), X₂ = Cultura láctica probiótica (%); **média (desvio padrão) seguida de letras iguais nas linhas indicam não haver diferença significativa, entre os dias de armazenamento, à nível de 5% (Teste de Tukey).

Os valores de pH (Tabela 2 e Figura 4) ao longo dos dias de armazenamento para todos os ensaios (formulações) apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) e, conseqüentemente uma elevação na acidez no decorrer do armazenamento. Observa-se que as formulações 2 e 3 tiveram considerável queda nos valores de pH no decorrer do tempo, mas mesmo assim apresentaram valores maiores de pH em relação a amostra controle (Ensaio 1) no 28º dia.

Separadamente, pode-se citar menores valores iniciais (1º dia) para pH no Ensaio 1 (formulação controle), onde no decorrer do tempo de armazenamento, se manteve com menores valores, o mesmo se observa para os resultados do Ensaio 2, que contem FOS na formulação. No entanto, pode-se observar que no 1º e 7º dia de armazenamento para os ensaios que contém probiótico, valores de pH mais elevado e iogurtes menos ácidos, onde formulações que continham FOS juntamente com o probiótico (Bifidobactéria), também apresentaram efeito positivo nos resultados.

Na Figura 4 (a e b), pode-se visualizar que com o aumento do tempo de armazenamento, para todas as formulações, proporcionou uma diminuição do pH e conseqüentemente um aumento dos valores de acidez.

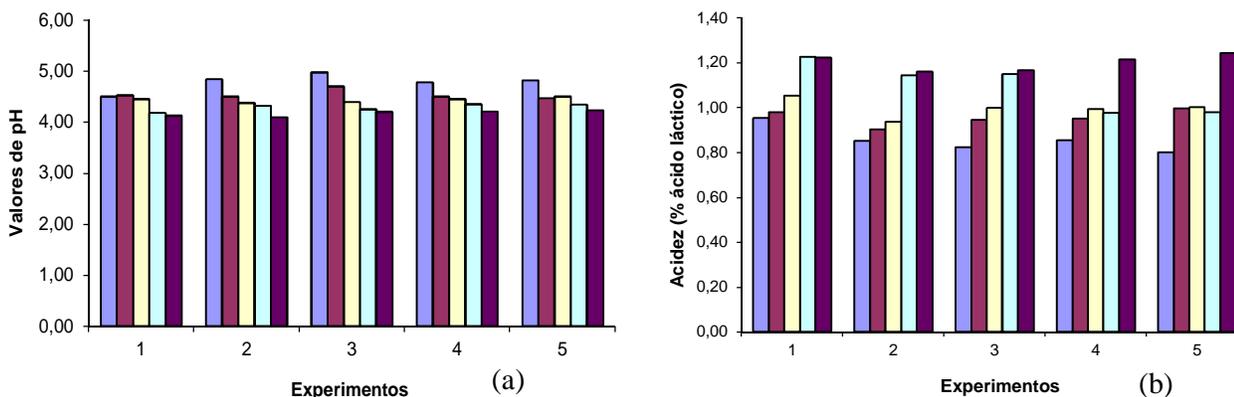


Figura 4. (a) Valores de pH (b) valores de acidez (% ácido láctico) para as amostras de iogurte nos diferentes períodos de armazenamento ■ 1º dia ■ 7º dia □ 14º dia □ 21º dia ■ 28º dia

A Figura 5 (a, b e c) apresenta os Gráficos de Pareto, com os efeitos estimados das variáveis testadas (FOS e cultura probiótica) para o pH no 1º, 7º e 28º dias de armazenamento. Onde observa-se que no 1º dia de armazenamento (Figura 5-a), as variáveis (FOS e bifidobactéria) e sua interação foram significativas ($p < 0,05$), sendo que a interação teve um

efeito significativo negativo e a concentração de Bifidobactéria e FOS tiveram efeito significativo positivo em relação ao pH, indicando que nas formulações que apresentavam somente Bifidobactéria e/ou FOS, inicialmente há um aumento no pH, porém, quando as duas variáveis estão presentes nas formulações ocasiona um decréscimo do pH.

Para o 7º dia (Figura 5-b) nota-se que a variável FOS e a interação com a cultura probiótica apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) negativo sobre o pH, ou seja, indicando que o pH diminui com o aumento da concentração de FOS. A variável Bifidobactéria apresenta efeito significativo positivo, indicando que seu aumento proporciona valores de pH maiores. Para 14 e 21 dias de armazenamento (não apresentados) o comportamento foi similar ao 7º dia.

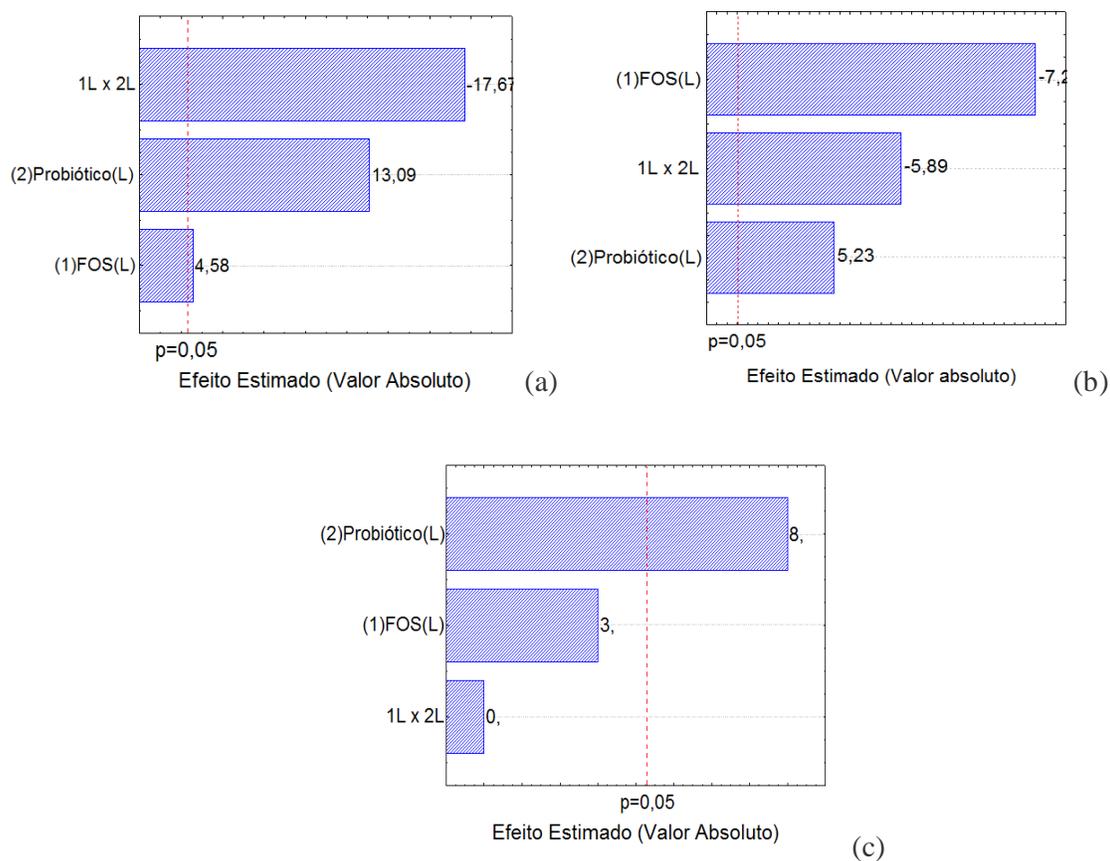


Figura 5. Gráfico de Pareto com o Efeito Estimado (Valor Absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental fatorial 2^2 , para análise de pH (a) 1º dia de armazenamento, (b) 7º dia de armazenamento e (c) 28º dia de armazenamento.

No 28º dia de armazenamento (Figura 5-c) observa-se que somente a variável probiótico apresentou efeito significativo positivo para o processo, que ao aumentar-se sua concentração nas formulações, obter-se-á valores de pH superiores e conseqüentemente produtos menos ácidos (Figura 6), demonstrando a importância desta variável para a formulação deste produto.

O mesmo menciona Oliveira (2008), que produtos obtidos com culturas probióticas, em geral apresentam uma acidificação menor, pois estas culturas caracterizam-se pela baixa capacidade de acidificação durante o armazenamento, podendo dessa forma, melhorar o sabor do produto final. E a adição de prebióticos como a inulina, contribui para o aumento da sobrevivência das bifidobactérias.

Da mesma forma que a inulina auxilia as bactérias, para que haja aumento de pH e produtos menos ácidos, esta por sua vez, quando é adicionada unicamente ao produto, promove redução dos valores de pH, resultando em uma maior pós-acidificação. As alterações, em maior ou menor grau, dependem do tipo e quantidade de sólido adicionado, sendo que a natureza do sólido aplicado irá determinar esta influência (DEBON, 2009; OLIVEIRA, 2008).

Huebner et al. (2008) simulando condições de processamento, verificaram em testes com vários prebióticos comerciais (FOS e Inulina), submetidos à altas temperaturas (85°C/30min.) e pH baixos, a redução significativa da atividade prebiótica testada. A análise indicou que a hidrólise nos açúcares tinha ocorrido especialmente a pH 4. Isto deixaria de oferecer estimulação seletiva, sendo muito importante esta descoberta para produção de alimentos ácidos que podem ser acrescidos de prebióticos e em seguida serem processados a temperatura elevada.

Segundo Thamer e Penna (2006); Preci (2011) o valor do pH é importante, uma vez que o iogurte com baixa acidez (pH inferiores a 4,0) proporciona maior separação do soro devido à redução da hidratação das proteínas e contração do coágulo, favorecendo a sinérese.

O declínio apresentado no pH e o aumento da acidez são resultados da pós-acidificação dos produtos e estão relacionados à continuidade do processo fermentativo pelas bactérias ácido-láticas durante o período de estocagem, com produção de ácido lático. A adição de probióticos em combinação com os prebióticos (produtos simbióticos) pode resultar em produtos menos ácidos (PIMENTEL, 2009).

Pimentel (2009) relata que a adição de inulina em iogurtes não influenciou os valores de pH, e que os valores de acidez em iogurtes adicionados de fruto-oligossacarídeos

apresentaram menor conteúdo de ácido lático do que o iogurte controle, provavelmente pela menor quantidade de lactose observada nos produtos adicionados de FOS.

Sendo assim, uma maior concentração de lactose provê o micro-organismo de maior quantidade de substrato a ser degradado em ácidos orgânicos, levando a um menor pH e a maiores valores de acidez titulável durante a estocagem (PIMENTEL, 2009).

A Figura 6 (a, b e c) apresenta os gráficos de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial 2^2 para a resposta em acidez nas formulações de iogurte.

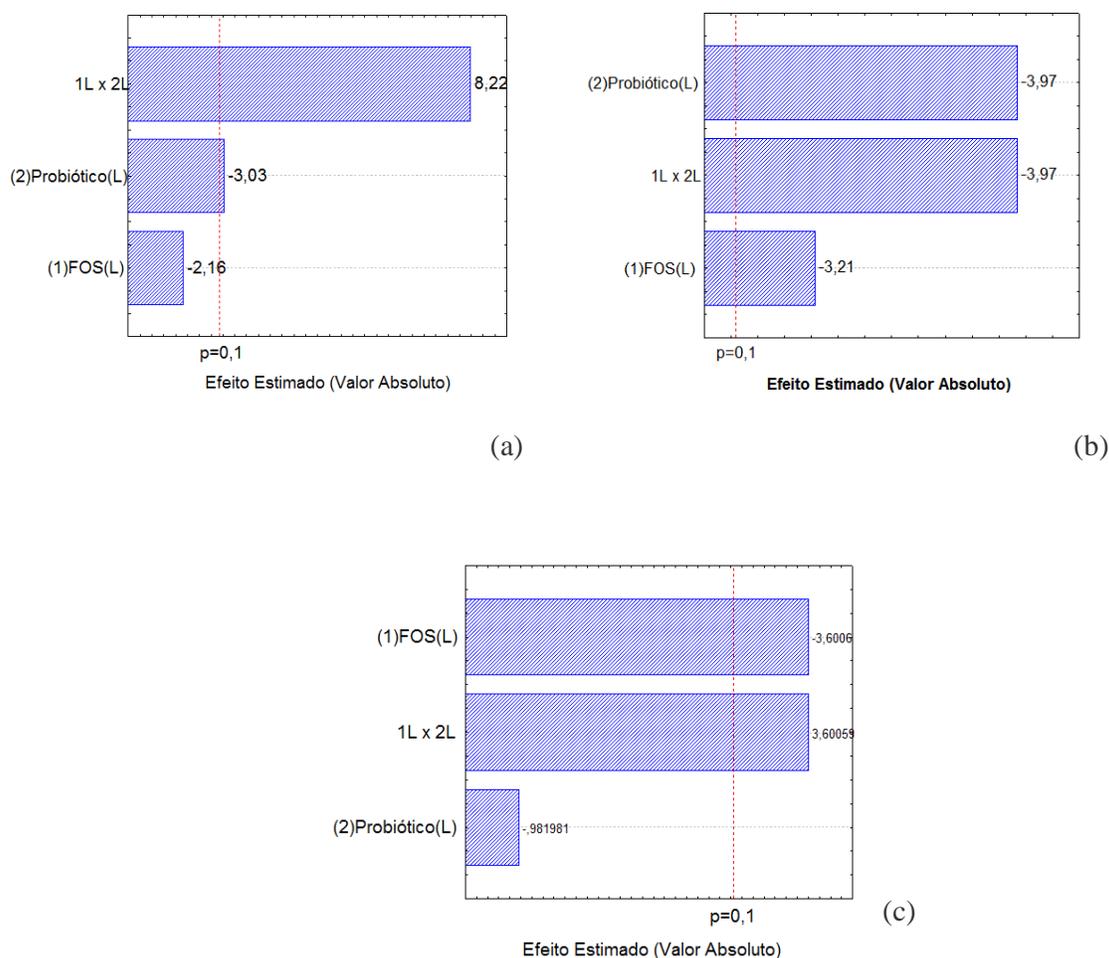


Figura 6. Gráfico de Pareto com o Efeito Estimado (Valor Absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental fatorial 2^2 , para análise de acidez (a) 1º dia de armazenamento (b) 21º dia de armazenamento (c) 28º dia de armazenamento.

Observa-se que na Figura 6-a no 1º dia de armazenamento que a variável Bifidobactéria e a interação com o FOS foram significativos ($p < 0,1$), sendo que para a interação das duas variáveis o efeito foi positivo e da bifidobactéria negativo, isto significa que ao diminuir a concentração do probiótico nas formulações de iogurte, há uma tendência de aumento na acidez dos produtos. No entanto, no 21º dia (Figura 6-b) de armazenamento, verifica-se que todas as variáveis e a interação foram significativas, sendo que para as variáveis probiótico e FOS os efeitos foram negativos, ou seja, ao aumentar a concentração tem-se uma diminuição na acidez. Aos 28º dia de armazenamento (Figura 6-c), a concentração isolada de FOS, também, influenciou negativamente na acidez.

Segundo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados (BRASIL, 2007), o iogurte produzido foi classificado como Leite Fermentado ou Cultivado; pois apresenta cultivos protossimbóticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, sendo que esta fermentação se realiza juntamente com o cultivo de *Bifidobacterium sp.*, que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final.

De acordo com a legislação vigente Brasil (2007), leite fermentado ou cultivado deve apresentar valores de acidez (g de ácido láctico/100g) de 0,6 a 2,0g. Ao observar o produto elaborado podemos notar valores mínimos de 0,80 % e valores máximos de 1,24 %, ou seja, encontra-se dentro da legislação para valores de acidez em leites fermentados.

Thamer e Penna (2006) verificaram em bebidas lácteas funcionais, que quanto maior o teor de sólidos totais, menor a acidez titulável. Além da acidez titulável, o teor de sólidos afeta o tempo de coagulação devido à ação tamponante dos outros constituintes, como proteínas, citratos, fosfatos e lactatos.

Sendo assim, os produtos obtidos com culturas probióticas, em geral, apresentam uma acidificação menor, pois tais culturas caracterizam-se pela baixa capacidade de acidificação durante a estocagem, podendo desta forma, melhorar o sabor do produto final (OLIVEIRA, 2008) e, com a adição na quantidade adequada de FOS, proporcionaria maior crescimento destas bactérias, auxiliando ainda mais na qualidade final deste produto.

5.1.2 Gordura

O teor médio de gordura foi de 3,5 %, o que o classifica como leite fermentado integral (BRASIL, 2007). Os iogurtes foram elaborados com leite padronizado semi-

desnatado (teor de gordura de 1 %) e a legislação determina para leites fermentados integrais uma matéria gorda láctea de 3,0 a 5,9 g/100g, já para leite fermentado parcialmente desnatado de 0,6 a 2,9 g/100g. Desta forma, o produto elaborado se apresenta com um conteúdo de gordura menor (dentro do limite mínimo) em relação aos demais iogurtes integrais, comercializados no mercado.

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 (SILVA, 2007).

5.1.3 Sinérese

A Tabela 3 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^2 (valores codificados e reais) com a resposta em sinérese para as formulações de iogurte nos diferentes dias de armazenamento refrigerado.

Tabela 3 - Matriz do planejamento fatorial 2^2 completo (valores codificados e reais) e resposta em sinérese no 1º, 7º, 14º, 21º e 28º dia de armazenamento refrigerado

Ensaio	Variáveis independentes*		Resposta**				
			Sinérese (%)				
	X ₁	X ₂	1	7	14	21	28
1	-1 (0)	-1 (0)	28,43 ^{ab} (1,000)	26,04 ^b (1,252)	25,43 ^b (0,995)	32,17 ^a (2,106)	32,81 ^a (0,264)
2	1 (3,0)	-1 (0)	33,39 ^a (0,001)	29,19 ^a (1,433)	29,20 ^a (0,333)	26,24 ^a (1,075)	35,49 ^a (0,001)
3	-1 (0)	1 (3,0)	25,65 ^b (1,000)	27,08 ^b (1,527)	24,97 ^b (1,358)	24,69 ^b (0,438)	33,71 ^a (1,146)
4	1 (3,0)	1 (3,0)	28,25 ^b (1,000)	28,29 ^b (1,000)	26,62 ^b (0,537)	33,80 ^a (1,000)	34,14 ^a (0,198)
5	0 (1,5)	0 (1,5)	31,44 ^b (0,481)	31,67 ^b (1,421)	31,18 ^b (0,440)	34,82 ^a (0,563)	34,99 ^a (0,341)

*X₁= Fruto-oligossacarídeos (%), X₂ = Cultura láctica probiótica (%); **média (desvio padrão) seguida de letras iguais nas linhas indicam não haver diferença significativa, entre os dias de armazenamento, à nível de 5% (Teste de Tukey).

Nota-se que os valores de sinérese (Tabela 3) aumentaram significativamente ($p < 0,05$) a partir do 21º dia de armazenamento. Para o Ensaio 2, com maior presença de FOS (3,0 %), a sinérese foi elevada do início ao fim do período (28 dias) de estocagem refrigerada. No

entanto, no Ensaio 3, a sinérese é menor quando comparada aos demais ensaios em todos os dias de armazenamentos analisados e somente aos 28 dias foi verificado um aumento significativo ($p < 0,05$) em seus valores. Possivelmente, os menores valores de sinérese estejam relacionados à produção de exopolissacarídeos (EPS) pelos probióticos. Essa produção de EPS atua como estabilizante em alimentos, contribuindo para a estrutura de gel dos iogurtes, prevenindo a quebra do gel e a sinérese (PIMENTEL, 2009). Isto poderia também ser devido à atividade das culturas iniciadoras do iogurte e à diminuição na pressão líquida da matriz protéica, causando a diminuição ou a estabilidade da sinérese (CUNHA et al., 2009).

Através do relatado, as causas que desencadeiam a sinérese ainda não são bem explicados, mas pode-se concordar que a sinérese aumentou com o tempo de armazenamento, isto pode ser associado com graves rearranjos na rede da caseína, que promove a expulsão do soro (RAMIREZ-SANTIAGO et al., 2010). Segundo Pimentel (2009), o aumento da sinérese ocorre também, devido ao decréscimo do pH durante a estocagem, o que provoca contração na matriz micelar de caseína, aumentando a liberação do soro.

Para Pimentel (2009) valores de sinérese abaixo de 39 % podem ser considerados satisfatórios. Neste caso, o iogurte elaborado no presente estudo (Tabela 3) apresentou um valor máximo de sinérese de 35,49 %, sendo assim um valor dentro do adequado. Muitos trabalhos relatados com adição de inulina em iogurtes apresentaram valores de sinérese entre 40 a 50 %, já iogurtes com adição de probióticos, apresentaram valores de 18 a 26,7 % (PIMENTEL, 2009).

No presente estudo, somente a adição de probiótico teve influencia significativa ($p < 0,05$) na redução da sinérese (Figura 7 a e b) no 1º e 14º dia de armazenamento refrigerado. O que foi também observado por Cunha et al. (2009) para a adição de cultura probiótica, o índice de sinérese tende a diminuir ou manter-se estável. Também nota-se que a variável FOS para ambos os dias de estocagem, apresentou efeito significativo positivo, neste caso a adição de FOS nas formulações indicou que maiores concentrações adicionadas resulta em maiores valores de sinérese nos iogurtes. Desta maneira, maior liberação de soro foi observada nas formulações adicionadas de FOS. Para o 7º, 21º e 28º dia de armazenamento (resultados não apresentados) o comportamento apresentado foi semelhante, com efeito significativo positivo do FOS e negativo do probiótico.

De acordo com Castro et al. (2009) o desenvolvimento de iogurtes probióticos contendo oligofrutose P95 (1,5 g/100mL), mostrou que o índice de sinérese não foi influenciado pela oligofrutose, nem a interação entre as variáveis foi significativa ($p < 0,05$).

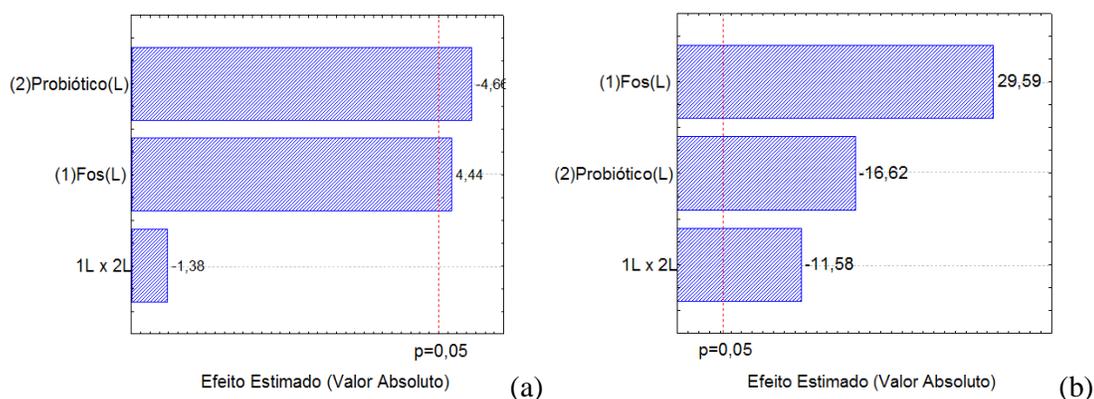


Figura 7. Gráfico de Pareto com o Efeito Estimado (Valor Absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental fatorial 2^2 , para análise de sinérese (a) 1º dia de armazenamento refrigerado (b) 14º dia de armazenamento refrigerado.

O iogurte elaborado apresentou uma concentração menor de gordura (3,5 %), como relatado anteriormente, sendo assim, a diminuição no teor de gordura contribuiu para redução da sinérese. Pimentel (2009), também observou que a diminuição no conteúdo de gordura provocou uma redução nos valores de sinérese, afirmando que ocorre um aumento na firmeza com a diminuição do conteúdo de gordura e atribuem isso a uma matriz protéica com menor quantidade de espaços, os quais seriam ocupados por glóbulos de gordura do leite, resultando em menores valores de sinérese.

5.1.4 Proteína

Na Tabela 4 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^2 (valores codificados e reais) com a resposta em proteína durante o período de armazenamento para as diferentes formulações de iogurte.

De acordo com a Tabela 4, nota-se que os valores de proteína para as formulações não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), nos dias de armazenamento avaliados. As adições de FOS e de Bifidobactéria não influenciaram para mudança no teor de proteína nos iogurtes no decorrer do tempo de armazenamento, respectivamente.

Segundo a legislação, os leites fermentados devem apresentar conteúdo de proteína de no mínimo 2,9 g/100g, a partir da legislação as diferentes formulações de iogurtes elaboradas estão de acordo com o determinado (BRASIL, 2007).

Tabela 4. Matriz do planejamento fatorial 2^2 completo (valores codificados e reais) e resposta em Proteína no 1º, 7º, 14º, 21º e 28º dia de armazenamento refrigerado

Ensaio	Variáveis independentes*		Resposta**				
			Proteína (g/100g)				
	X ₁	X ₂	1	7	14	21	28
1	-1 (0)	-1 (0)	3,38 ^a (0,445)	3,23 ^a (0,193)	3,19 ^a (0,322)	2,89 ^a (0,575)	3,33 ^a (0,679)
2	1 (3,0)	-1 (0)	3,27 ^a (0,306)	3,20 ^a (0,521)	3,30 ^a (0,237)	3,53 ^a (0,231)	3,67 ^a (0,153)
3	-1 (0)	1 (3,0)	3,50 ^a (0,381)	3,25 ^a (0,480)	3,37 ^a (0,244)	3,56 ^a (0,159)	3,55 ^a (0,176)
4	1 (3,0)	1 (3,0)	3,30 ^{ab} (0,244)	3,30 ^{ab} (0,254)	3,12 ^{ab} (0,031)	3,61 ^a (0,082)	3,69 ^a (0,186)
5	0 (1,5)	0 (1,5)	3,26 ^a (0,611)	3,04 ^a (0,152)	3,32 ^a (0,148)	3,53 ^a (0,181)	3,38 ^a (0,275)

*X₁= Fruto-oligossacarídeos (%), X₂ = Cultura láctica probiótica (%); **média (desvio padrão) seguida de letras iguais nas linhas indicam não haver diferença significativa, entre os dias de armazenamento, à nível de 5% (Teste de Tukey).

5.1.5 ° Brix

Na Tabela 5 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^2 (valores codificados e reais) com a resposta em ° Brix durante o período de armazenamento para as diferentes formulações de iogurte. Com relação ao teor de sólidos solúveis totais, expresso em °Brix (Tabela 5), verifica-se que quanto maior a porcentagem de FOS nas formulações (Ensaio 2, 4 e 5) maiores são os °Brix

Estes resultados podem ser melhor visualizados pelos gráficos de pareto apresentados na Figura 8 (a e b), no qual a variável FOS apresentou efeito significativo positivo ($p < 0,1$) para o teor de sólidos solúveis totais no 7º e 21º dia de armazenamento (4°C), respectivamente. Para os demais dias de armazenamento o comportamento apresentado foi semelhante. Os valores de sólidos solúveis totais (°Brix) variaram de 17 a 21,6.

Segundo Maziero et al. (2011) os sólidos solúveis, representam os compostos solúveis em água, tais como, açúcares, ácidos, vitaminas e algumas gomas que podem ser adicionadas aos produtos lácteos para conferir textura, como neste caso também o FOS, que auxiliou para aumento nestes valores.

Para Guggisberg et al. (2009) em seu trabalho com adição de várias concentrações de inulina em iogurtes, verificou que o aumento dos níveis de inulina em cada nível experimental fez com que aumentassem os valores de sólidos solúveis totais.

Tabela 5. Matriz do planejamento fatorial 2^2 completo (valores codificados e reais) e resposta em °Brix no 1°, 7°, 14°, 21° e 28° dia de armazenamento refrigerado

Ensaio	Variáveis independentes*		Respostas**				
			°Brix				
	X ₁	X ₂	1	7	14	21	28
1	-1 (0)	-1 (0)	17,00 ^b (1,000)	18,00 ^{ab} (0,030)	18,33 ^{ab} (0,577)	18,67 ^{ab} (0,577)	19,33 ^a (0,577)
2	1 (3,0)	-1 (0)	21,67 ^a (0,577)	19,67 ^a (1,155)	21,00 ^a (1,000)	20,33 ^a (0,577)	21,00 ^a (0,008)
3	-1 (0)	1 (3,0)	19,33 ^a (2,082)	18,00 ^a (0,020)	18,33 ^a (0,577)	19,67 ^a (0,577)	18,00 ^a (0,007)
4	1 (3,0)	1 (3,0)	20,02 ^{ab} (1,528)	20,33 ^{ab} (0,577)	21,33 ^a (0,577)	20,67 ^{ab} (0,577)	21,00 ^a (0,012)
5	0 (1,5)	0 (1,5)	20,00 ^a (1,000)	21,00 ^a (0,003)	21,00 ^a (1,000)	20,33 ^a (0,577)	20,00 ^a (1,000)

*X₁= Fruto-oligosacarídeos (%), X₂ = Cultura láctica probiótica (%); **média (desvio padrão) seguida de letras iguais nas linhas indicam não haver diferença significativa, entre os dias de armazenamento, à nível de 5% (Teste de Tukey).

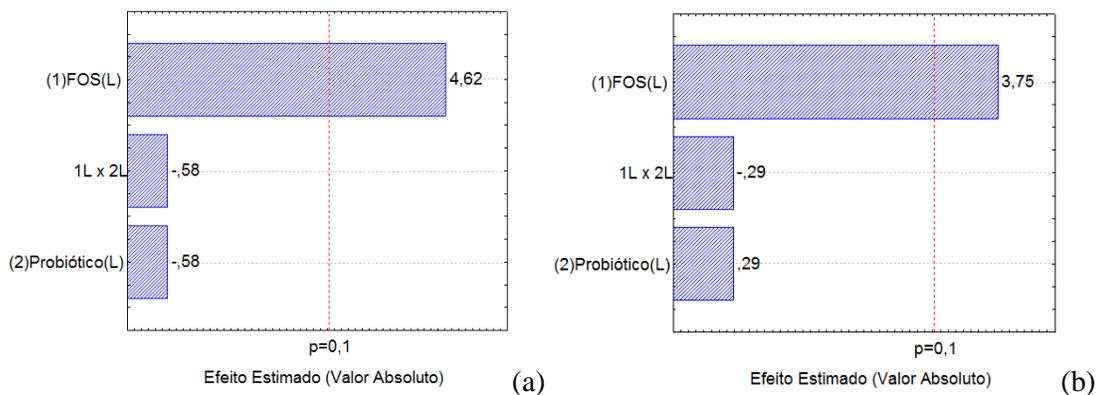


Figura 8. Gráfico de Pareto com o Efeito Estimado (Valor Absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental fatorial 2^2 , para análise de °Brix (a) 7° dia de armazenamento e (b) 21° dia de armazenamento refrigerado.

5.1.6 Cor objetiva

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados da cor objetiva referente a Luminosidade (L^*), das formulações de iogurte no período de 28 dias de armazenamento a 4°C.

Tabela 6. Matriz do planejamento fatorial 2² completo (valores codificados e reais) e resposta em análise de Cor para Luminosidade (*L) no 1º, 7º, 14º, 21º e 28º dia de armazenamento refrigerado

Ensaio	Variáveis independentes*		Respostas**				
			L*				
			1	7	14	21	28
	X ₁	X ₂					
1	-1 (0)	-1 (0)	68,64 ^{bA} (1,417)	70,46 ^{bcA} (1,480)	73,45 ^{acAB} (1,285)	74,62 ^{aA} (0,803)	74,12 ^{aA} (1,467)
2	1 (3,0)	-1 (0)	68,02 ^{bA} (1,528)	67,12 ^{bA} (1,040)	74,40 ^{aA} (0,350)	73,13 ^{abA} (1,251)	74,97 ^{aA} (2,470)
3	-1 (0)	1 (3,0)	70,56 ^{bcA} (0,874)	67,88 ^{cA} (0,435)	74,01 ^{aA} (0,660)	74,25 ^{aA} (0,010)	71,11 ^{bA} (0,100)
4	1 (3,0)	1 (3,0)	62,17 ^{bb} (1,824)	68,64 ^{aA} (1,798)	73,45 ^{aAB} (0,920)	73,23 ^{aA} (1,125)	73,46 ^{aA} (2,284)
5	0 (1,5)	0 (1,5)	62,22 ^{cB} (0,868)	65,77 ^{bb} (1,002)	71,44 ^{aB} (0,674)	72,98 ^{aA} (2,488)	74,62 ^{aA} (0,075)

*X₁= Fruto-oligossacarídeos (%), X₂ = Cultura láctica probiótica (%); **média (desvio padrão) seguida de letras iguais nas linhas (minúsculas) e nas colunas (maiúsculas) indicam não haver diferença significativa, à nível de 5% (Teste de Tukey).

De acordo com a Tabela 6, verifica-se que os valores de luminosidade (L*) aumentaram com o tempo de armazenamento para todas as amostras. Para as amostras no 1º dia, observa-se que maiores valores foram apresentados para os Ensaio 1 (iogurte controle), 2 (3 % de FOS) e 3 (3 % de Bifidobactéria), com luminosidade de 68,64, 68,02 e 71,53, respectivamente. Comportamento semelhante, também, foi observado no 7º e 14º dia. No entanto, no 21º e 28º dia de armazenamento, nenhuma das variáveis de estudo influenciaram na luminosidade (L*) do produto.

As amostras dos Ensaio 4 (3 % de FOS e Bifidobactéria) e 5 (1,5 % de FOS e Bifidobactéria), obtiveram valores de luminosidade menores até o 14º dia de armazenamento a 4°C. Uma redução nos valores de L* para estas amostras pode ser causada devido à incorporação de constituintes no produto como FOS (fibra), e outros constituintes presentes como: açúcar, gordura e proteína, que favorecem 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 (SILVA, 2007).

Segundo Vasconcelos (2010), os iogurtes podem ser considerados claros, pois na escala de 0 (preto) e 100 (branco) apresentaram valores acima de 50 (L* > 50).

Na Tabela 7 está apresentado os valores médios de cromaticidade (a*), nas diferentes formulações de iogurte, analisados durante 28 dias de armazenamento refrigerado.

A cromaticidade (a^*) reflete cores, desta forma, a^* maior que zero vai em direção ao vermelho, a^* menor que zero em direção ao verde, assim, os valores de a^* foram positivos e aumentaram significativamente ($p < 0,05$) com o tempo de armazenamento, em direção ao vermelho para todos os ensaios, o qual deve-se também a adição de corante rosa em pó nas amostras.

Tabela 7. Matriz do planejamento fatorial 2^2 completo (valores codificados e reais) e resposta em análise de Cor para Cromaticidade (a^*) no 1º, 7º, 14º, 21º e 28º dia de armazenamento refrigerado

Ensaio	Variáveis independentes*		Respostas**				
			a^*				
	X_1	X_2	1	7	14	21	28
1	-1 (0)	-1 (0)	14,77 ^{bA} (2,232)	17,39 ^{bA} (0,445)	21,75 ^{aA} (0,468)	22,88 ^{aA} (0,405)	23,48 ^{aA} (0,366)
2	1 (3,0)	-1 (0)	15,06 ^{cA} (0,195)	16,00 ^{cB} (0,420)	17,74 ^{bB} (0,091)	21,91 ^{aA} (0,590)	22,15 ^{aB} (0,583)
3	-1 (0)	1 (3,0)	15,93 ^{bA} (0,535)	15,79 ^{bB} (0,148)	15,88 ^{bC} (0,558)	18,82 ^{aB} (0,101)	16,43 ^{bCD} (0,329)
4	1 (3,0)	1 (3,0)	15,45 ^{bA} (0,465)	16,09 ^{bB} (0,520)	17,85 ^{aB} (0,315)	17,82 ^{aB} (0,229)	18,33 ^{aC} (0,521)
5	0 (1,5)	0 (1,5)	14,40 ^{bA} (0,211)	14,01 ^{bC} (0,026)	15,29 ^{aC} (0,161)	15,57 ^{aC} (0,365)	15,57 ^{aD} (0,203)

* X_1 = Fruto-oligossacarídeos (%), X_2 = Cultura láctica probiótica (%); **média seguida de letras iguais nas linhas (minúsculas) e nas colunas (maiúsculas) indicam não haver diferença significativa, à nível de 5% (Teste de Tukey).

Segundo Silva (2007) 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^* , como o observado no presente estudo, onde a mistura era composta por leite, açúcar e FOS, seguidos da adição do corante rosa em pó.

Observa-se que a partir do 7º dia de armazenamento, começa a ocorrer diferenças significativas entre as amostras. Para o Ensaio 1 (iogurte controle, sem adição de FOS e cultura probiótica), tem-se os valores superior para cromaticidade (a^*), diferindo a nível de 5 % das demais amostras nos períodos de armazenamento avaliados (7, 14, 21 e 28º dia). Já para Ensaio 2 (iogurte com 3 % de FOS) a partir do 21º dia também começou a apresentar valores elevados diferindo a nível de 5% para demais amostras (Ensaio 3, 4 e 5). Os Ensaio 3 (3 % de Bifidobactéria), 4 (3 % de FOS e Bifidobactéria) e 5 (1,5 % de FOS e

Bifidobactéria), apresentaram os valores mais baixos para cromaticidade a^* . Neste caso, pode-se afirmar que os iogurtes adicionados de FOS e cultura probiótica e formulação com adição somente de Bifidobactéria, tiveram com o aumento do tempo de armazenamento, tendência para cromaticidade (a^*) menor, podendo assim, estes componentes (FOS e bifidobactéria) interferirem para uma coloração de intensidade menor para o vermelho. Desta forma, a coloração não sofreu interferência pela queda no pH no decorrer do tempo, mas sim pela adição de cultura probiótica.

O teor de inulina empregado, bem como o menor teor de umidade, em decorrência do aumento de sólidos apresentado pelo produto prebiótico, assim como a temperatura empregada na etapa de fermentação, poderiam ser responsáveis pela diminuição da cor esverdeada e aumento da avermelhada (DEBON, 2009).

Na Tabela 8, são apresentados os valores médios para cromaticidade (b^*) nas diferentes formulações de iogurte, analisados durante 28 dias de armazenamento refrigerado.

Tabela 8. Matriz do planejamento fatorial 2^2 completo (valores codificados e reais) e resposta em análise de Cor para Cromaticidade (b^*) no 1º, 7º, 14º, 21º e 28º dia de armazenamento refrigerado

Ensaio	Variáveis independentes*		Respostas**				
			b^*				
			1	7	14	21	28
1	-1 (0)	-1 (0)	0,23 ^{aA} (0,032)	0,08 ^{bA} (0,038)	-1,31 ^{cC} (0,050)	-1,19 ^{cA} (0,032)	-1,43 ^{dA} (0,006)
2	1 (3,0)	-1 (0)	-0,12 ^{aB} (0,046)	-0,34 ^{bB} (0,026)	-0,89 ^{cAB} (0,098)	-1,55 ^{dB} (0,050)	-1,78 ^{eB} (0,108)
3	-1 (0)	1 (3,0)	-1,59 ^{bC} (0,240)	-0,69 ^{aC} (0,080)	-1,57 ^{bC} (0,047)	-1,41 ^{cBC} (0,042)	-2,40 ^{dC} (0,032)
4	1 (3,0)	1 (3,0)	-0,89 ^{bD} (0,421)	-0,54 ^{aC} (0,051)	-0,71 ^{abA} (0,122)	-1,29 ^{cAC} (0,108)	-2,25 ^{dC} (0,052)
5	0 (1,5)	0 (1,5)	-0,69 ^{bE} (0,261)	-0,36 ^{aB} (0,010)	-0,97 ^{cB} (0,012)	-1,39 ^{dBC} (0,010)	-1,70 ^{eB} (0,064)

* X_1 = Fruto-oligossacarídeos (%), X_2 = Cultura láctica probiótica (%);**média seguida de letras iguais nas linhas (minúsculas) e nas colunas (maiúsculas) indicam não haver diferença significativa, à nível de 5% (Teste de Tukey).

A cromaticidade (b^*) reflete desta forma, b^* maior que zero em direção ao amarelo e b^* menor que zero em direção ao azul. Desta forma a cromaticidade (b^*) (Tabela 8) diminuiu no decorrer do tempo de armazenamento para todas as amostras, atingindo pontuações

negativas (em direção a intensidade azul). A perda de coloração amarela, com geração de coloração azulada, foi devido perda da coloração do corante aplicado nos iogurtes.

Vários autores relatam que a cor dos leites fermentados é influenciada pela coloração dos ingredientes utilizados nas etapas de elaboração. Conforme verificado a adição do prebiótico, o qual apresenta coloração branca, em bebidas lácteas não influenciou nos parâmetros L^* e b^* (DEBON, 2009), porém diferentemente foi verificado neste estudo, onde FOS e a cultura probiótica influenciaram no parâmetro.

As amostras dos Ensaio 2 e 5 não diferem entre si a partir do 7º dia de armazenamento, já as amostras dos Ensaio 3 e 4 no 7º, 21º e 28º dia apresentam valores elevados e diferem ($p < 0,05$) das demais amostras em todos os dias de estocagem, com exceção do 14º dia, que obteve valor menor das demais amostras.

No decorrer dos dias de armazenamento não foi verificado a influencia da adição de FOS, quanto adição da cultura probiótica, observa-se que os valores de cromaticidade (b^*) foram menores onde havia concentrações superiores da mesma.

5.1.7 Quantificação dos açúcares e do Fruto-oligossacarídeo

5.1.7.1 Desenvolvimento e validação de metodologia de análise por CLAE

a) Caracterização do FOS comercial

Na Figura 9, está representado o cromatograma dos Padrões de FOS, expressando os picos dos componentes do padrão de FOS, que seguem a ordem a seguir: kestose (tr: 7.660), nistose (tr: 8.929) e frutossilnistose (tr: 10.437).

Na Figura 10, está demonstrado o cromatograma do FOS comercial (Fiber FOS®). Este cromatograma também expressa os picos da componentes do FOS, sendo kestose, nistose e frutossilnistose com tempo de retenção (tr) de 7.642, 8.914 e 10.437, respectivamente, sendo semelhante ao Padrão de FOS (Figura 9). No entanto, observa-se o aparecimento de outros componentes, alguns detectáveis como frutose (tr: 5.230) e glicose (tr: 6.174) e outros isômeros não detectáveis na amostra de FOS comercial (Fiber FOS®) (cromatogramas de frutose apêndice C e glicose apêndice B).

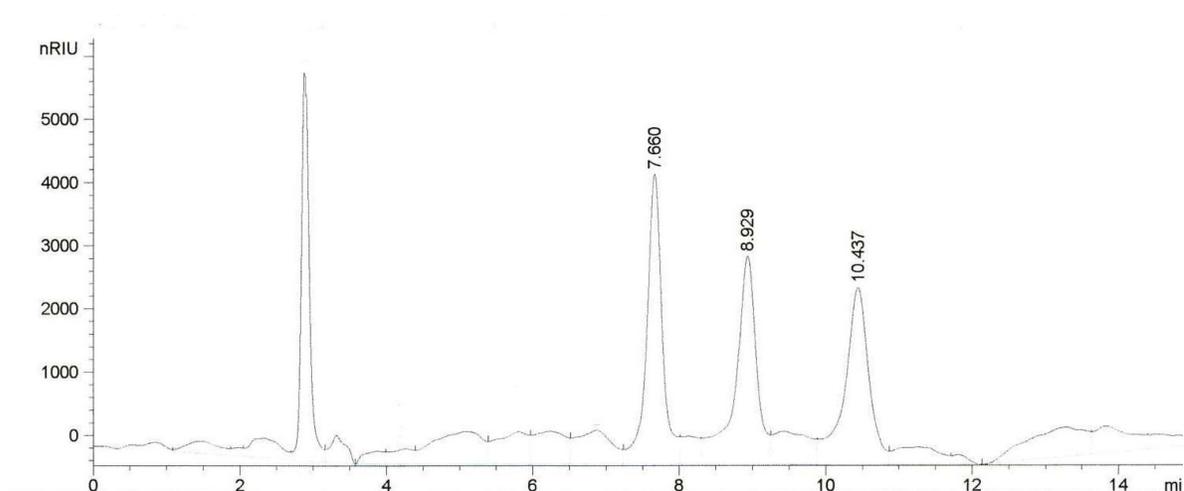


Figura 9. Cromatograma do fruto-oligossacarídeo (Padrão de FOS).

Ao analisar os picos dos FOS no cromatograma (Figura 10), observa-se bifurcação entre eles, mas pode-se verificar a presença dos frutooligossacarídeos, kestose, nistose e frutossilnistose, detectados nos Padrões de FOS e na amostra comercial Fiber FOS®, pela similaridade entre os valores encontrados.

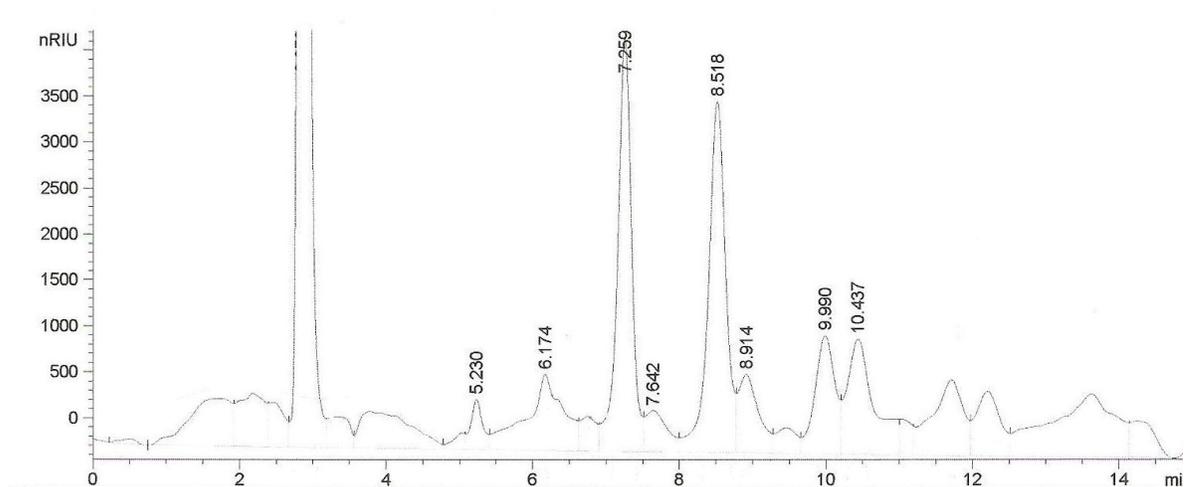


Figura 10. Cromatograma do fruto-oligossacarídeo (FOS comercial Fiber FOS®).

Os dados de caracterização da amostra de FOS comercial (Fiber FOS®) foram baseados nos cálculos de linearidade com a curva de calibração. Foram preparados padrões necessários para proceder aos cálculos (Tabela 9).

Tabela 9. Equação da reta e R obtidos para as diferentes curvas de calibração para os padrões de FOS e de açúcares nas condições cromatográficas

Curva de calibração			
Componente	Equação da reta	Lineariedade*	R ²
Kestose	$y = 63,163x - 2112,5$	100 - 10000 ⁽¹⁾	0,991
Nistose	$y = 53,131x - 2764,4$	100 - 10000 ⁽¹⁾	0,992
Frutosilnistose	$y = 58,118x - 5880,7$	100 - 10000 ⁽¹⁾	0,990
Frutose	$y = 34,911x + 35244$	500 - 10000 ⁽²⁾	0,989
Glicose	$y = 40,371x - 6698,1$	500 - 10000 ⁽²⁾	0,989
Sacarose	$y = 33,738x + 20565$	500 - 10000 ⁽²⁾	0,995
Lactose	$y = 38,7x + 6027$	500 - 5000 ⁽²⁾	0,998

* intervalo de concentração (ppm); (1) foi aplicado 7 concentrações diferentes neste intervalo, (2) foi aplicado 5 concentrações diferentes neste intervalo.

Através dos cálculos realizados, pode-se verificar que em 100 g de FOS comercial (Fiber FOS®) somente 56,1 % é de FOS puro, ou seja, o restante são outros açúcares e compostos. Deste total (56,1 %) 14,7 % de kestose, 23,8 % de nistose e 17,6 % de frutosilnistose. Destacando, que no FOS comercial (Fiber FOS®) há presença de frutose, glicose e outros isômeros, sendo que a frutose por sua vez, representa 8,0 % e a glicose 5,6 % da porção de 100 g do FOS.

b) Eliminação de interferentes da amostra de iogurte

Inicialmente, foram realizados vários ensaios visando a remoção de interferentes da amostra de iogurte. A Figura 11 apresenta o aspecto das amostras que foram submetidas à precipitação com água: acetonitrila (Ensaio 1) e com solução salina: acetato de chumbo (Ensaio 2).

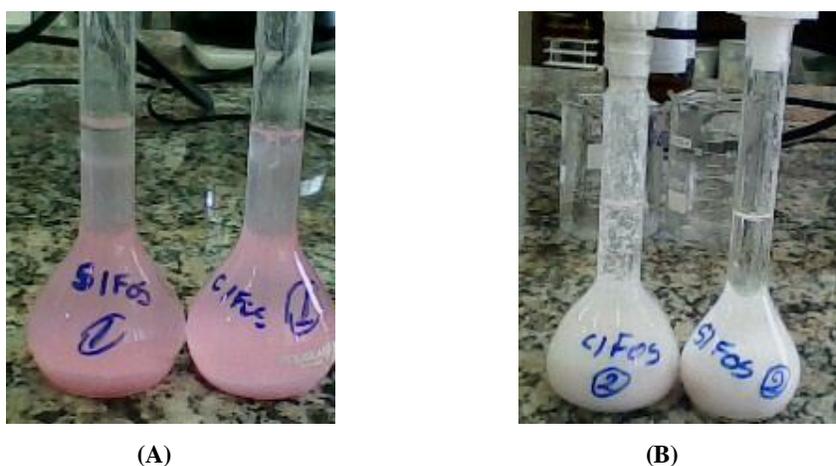


Figura 11. Aspecto dos ensaios de precipitação de proteína e gordura do iogurte: Ensaio 1 (A) e 2 (B), respectivamente.

Verifica-se na Figura 11, para os dois ensaios (Ensaio 1 e 2), que houve precipitação dos componentes (proteína, gordura, cor, etc) do iogurte, isto antes de se colocar na centrífuga, no entanto ao elevar a temperatura da coluna, os padrões sofreram alterações e conseqüentemente as amostras também, por isso somente pode se verificar nos cromatogramas um pequeno sinal do FOS da amostra do Ensaio 2. Neste caso, talvez alguns componentes do FOS podem ter sido arrastados juntamente com a precipitação.

Baseado nisto, um outro ensaio foi realizado (Ensaio 3) adicionando FOS no momento da análise e realizando o preparo da amostra nas condições dos Ensaios 1 e 2. No Ensaio 3, observou-se a presença de sinais do FOS nos cromatogramas utilizando o padrão FOS comercial (Fiber FOS®), desta forma, a metodologia do Ensaio 1 foi a escolhida por apresentar traços no cromatograma referente ao padrão do FOS comercial. Com base nestes resultados, a acetonitrila foi utilizada para precipitação das proteínas e gordura presente nas amostras de iogurte com e sem FOS.

Pode-ser observado na Figura 12, a precipitação da proteína e gordura no ensaio 5 utilizando como solvente a fase-móvel na proporção de 1:1 v/v (solução de FOS e água/fase-móvel) (Figura 12 A) e outro utilizando a acetonitrila na proporção de 1:1 v/v (solução de FOS e água/acetonitrila) (Figura 12 B).

A acetonitrila é um solvente de alta polaridade, que promove a precipitação da proteína, sendo que, isto depende muito da temperatura. Os solventes orgânicos, quando utilizados a temperaturas baixas, são bastante úteis na separação de misturas de proteínas. A temperaturas mais elevadas esses solventes podem levar à desnaturação por rompimento das pontes de hidrogênio e estabelecimento de interações apolares, importantes na manutenção da conformação protéica (SOUZA e NEVES, 2012), já para a precipitação de gordura, segundo

Curi et al. (2002) a utilização de acetonitrila como solvente, faz com que a gordura fique concentrada na parte inferior do tubo, favorecendo a solubilização e posterior análise.

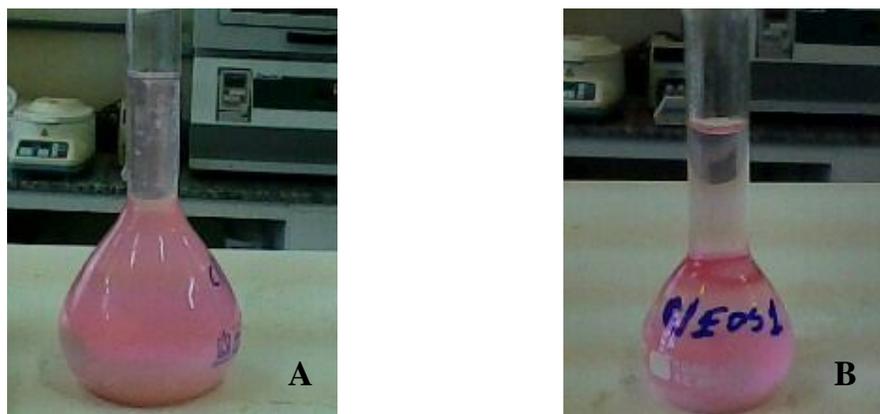


Figura 12. Metodologia para detecção do FOS na amostra de iogurte: Ensaio 5, com fase-móvel (A) e com acetonitrila (B), respectivamente.

c) Recuperação do FOS comercial

Os melhores resultados de recuperação da amostra, foram observados no Ensaio 7 (Tabela 10) com acetonitrila pura e solução de iogurte com FOS + água na quantidade de 1:1 v/v, e solução de iogurte com FOS + água e fase-móvel na quantidade de 1:4 v/v, com recuperação de 93,6 e 80,4 % de kestose, 117,6 e 108,8 % de nistose e 103,3 e 115,7 % de frutossilnistose, respectivamente. O Ensaio 6 com a fase-móvel (acetonitrila:água, 70:30 v/v) na quantidade de 1:4 v/v (solução de iogurte com FOS + água:acetonitrila e água), obteve recuperação de 71,8 % de kestose, 122,4 % de nistose e 129,6 % de frutossilnistose, e o ensaio 5 com acetonitrila pura e solução de iogurte com FOS + água na quantidade de 1:1 v/v, também obteve bons resultados de recuperação da amostra. Para os Ensaios 6 e 7, com acetonitrila na quantidade de 1:4 v/v (solução de iogurte com FOS + água:acetonitrila) apresentaram baixas recuperações. Os demais resultados dos ensaios apresentaram similaridade com os resultados da fase-móvel, das duas diferentes concentrações aplicadas.

Tabela 10. Resultados expressos em % de recuperação da amostra para as diferentes metodologias aplicadas para iogurte com FOS.

Ensaio	Recuperação (%)		
	Kestose	Nistose	Frutosilnistose
5 (solução de iogurte com FOS:fase móvel 1:1 v/v)	78,7	122,8	67,4
5 (solução de iogurte com FOS:acetoneitrila 1:1 v/v)	72	117,6	109
6 (solução de iogurte com FOS:fase móvel 1:4 v/v)	71,8	122,4	129,6
6 (solução de iogurte com FOS:acetoneitrila 1:4 v/v)	37,1	59,5	98,7
7 (solução de iogurte com FOS:fase móvel 1:1 v/v)	69,8	120,6	119
7 (solução de iogurte com FOS:acetoneitrila 1:1 v/v)	93,6	117,6	103,3
7 (solução de iogurte com FOS:fase móvel 1:4 v/v)	80,4	108,8	115,7
7 (solução de iogurte com FOS:acetoneitrila 1:4 v/v)	21	19,9	91,8

Fonte: o autor.

Segundo Mendes (2011), considera-se aceitável o método aplicado quando os valores de análise de recuperação for 100 ± 20 %, desta forma se cumpre o critério de aceitação. Com isto, e visto que os resultados foram aceitáveis, procedeu-se à validação do método para aplicação e determinação de FOS na amostra de iogurte. Por apresentar melhor separação e identificação dos picos, a metodologia do Ensaio 5 (solução de iogurte com FOS + água:acetoneitrila (1:1, v/v)), conforme Apêndices F e G, (Figuras com validação e cromatogramas), foi selecionado, por apresentar maior recuperação do composto majoritário (~24 % de nistose) e também da frutosilnistose, determinados na caracterização do FOS. O Ensaio 7, também utilizando (1:1, v/v) apresentou recuperação aceitável para a amostra, porém esta não foi nos demais ensaios selecionada.

5.1.6.2 Açúcares das formulações de iogurte

a) Lactose

Durante o armazenamento para as amostras de iogurte observa-se uma diminuição nas quantidades de lactose, sendo que inicialmente o teor de lactose das formulações era de aproximadamente 4,06g/100 mL. A amostra que obteve maior consumo de lactose aos 28 dias de armazenamento foi a do Ensaio 4, com cerca de 26,04 %, seguida da amostra dos Ensaios 2, 5, 3 e 1, com 21,80, 15,30, 13, 35 e 5,71 % de redução, respectivamente.

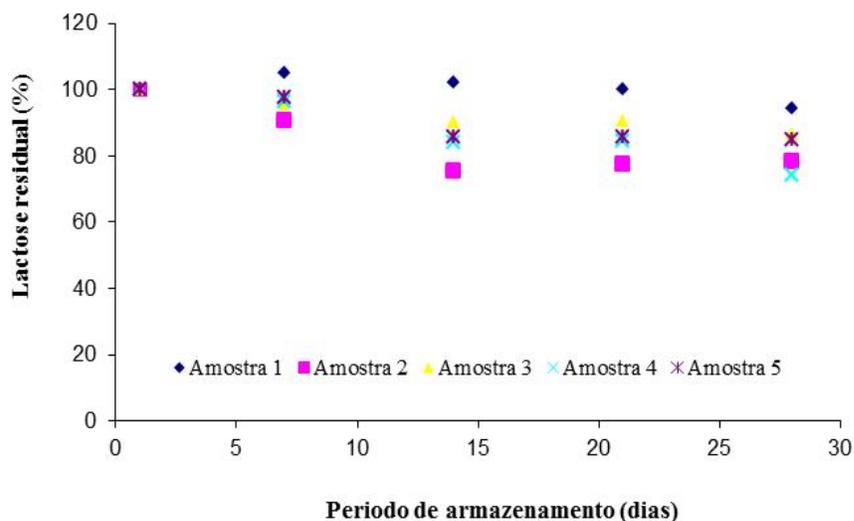


Figura 13. Lactose Residual (%) das formulações de iogurte em função do tempo de armazenamento.

Para Silva (2007), a lactose é fonte de energia para os micro-organismos do iogurte. A porcentagem de lactose consumida em média no final do período de armazenamento sob refrigeração das amostras de iogurtes elaborados pelo autor (valor médio do teor de lactose correspondente ao 28º dia de análise) 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. Assim, o autor refere que algumas variedades de bifidobactérias, fermentam a lactose, produzindo ácido láctico.

Além disso, houve um maior consumo de lactose durante o período de estocagem refrigerada. O consumo de lactose durante a fermentação e armazenamento de iogurtes varia entre 10 e 30 % (BECKER, 2009).

Desta forma, o iogurte elaborado justifica os argumentos dos autores, pois o maior consumo de lactose (Figura 13) foi na amostra onde continha maior quantidade de bactérias lácticas, ou seja, maior quantidade de bifidobactérias (3 %), juntamente com o FOS. O mesmo comportamento se observa na amostra do Ensaio 2, que apesar de não conter bifidobactéria contém o FOS. Sendo assim, a adição do FOS nos iogurtes permitiu um consumo maior de lactose pelas bifidobactérias.

Mas segundo Becker (2009), as bifidobactérias fazem diminuir o teor de lactose em aproximadamente 20 a 25 % devido à sua utilização pelos micro-organismos. Assim, a amostra do Ensaio 4 contendo menos teor de lactose, possibilita um meio de consumo para as pessoas intolerantes a lactose.

A intolerância à lactose é um termo usado para descrever a incapacidade de digerir a lactose devido à deficiência do sistema digestório (BECKER, 2009), 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. As bifidobactérias produzem β -galactosidase, a qual hidrolisa a lactose, melhorando a intolerância a esse açúcar (SILVA, 2007).

b) Sacarose

A concentração de sacarose das amostras de iogurte está representada, pela perda de área dos picos dos cromatogramas, em função do tempo de armazenamento (Figura 14). Todas as amostras apresentaram redução no teor de sacarose.

A sacarose expressa à adição de açúcar nas formulações de iogurte. Apesar de a quantidade adicionada ser igual para todas as formulações, o comportamento em relação aos dias se tornou diferente para todas as amostras de iogurte.

A amostra que obteve uma maior queda no teor de sacarose foi a amostra do Ensaio 2 ou seja, do 1º dia até o 28º dia de armazenamento seu consumo foi de 54,4 %. Ao considerar-se que a concentração inicial adicionada nos iogurtes de sacarose foi de 11 % (indicado na Figura como 100 %), logo o teor de sacarose restante na amostra do Ensaio 2 foi uma concentração de 5,9 % até 28 dias de armazenamento.

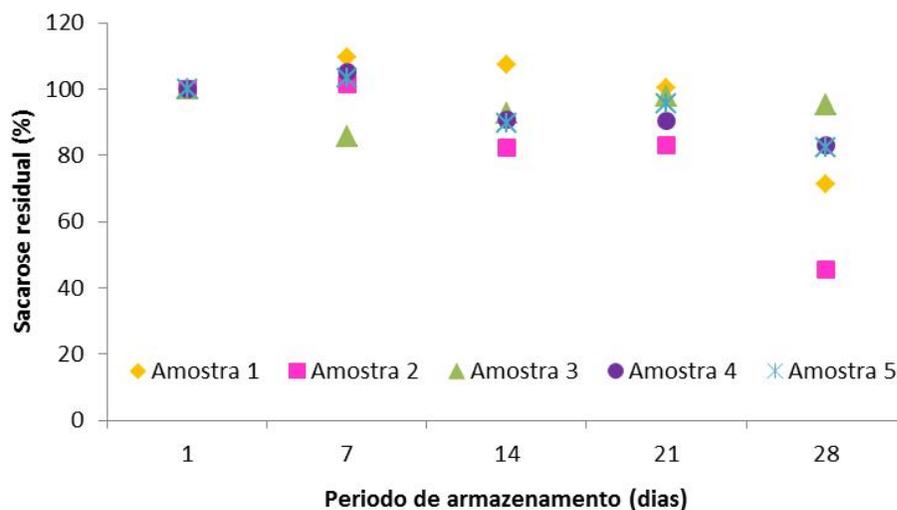


Figura 14. Concentração (%) de sacarose nas amostras de iogurte em função do tempo de armazenamento.

Para a amostra do Ensaio 1 observa-se um consumo de 28,7 %, seguida da amostra do Ensaio 5 (22,12 %), 4 (17,1 %) e 3 (4,9 %), respectivamente.

Ressalta-se que há um menor consumo de sacarose na amostra do Ensaio 3, esta por sua vez, contém, além das bactérias lácticas tradicionais, as bifidobactérias, que proporcionaram um menor consumo de sacarose, resultado semelhante se observa também nas amostras dos Ensaios 4 e 5. Desta forma, constata-se que as bactérias probióticas não utilizaram preferencialmente a sacarose na fermentação. De acordo com Becker (2009), as bifidobactérias de origem humana são capazes de utilizar a glicose, a galactose, a lactose e a frutose como fontes de carbono.

c) Glicose

Ao analisar a Figura 15, observa-se comportamentos distintos entre as formulações de iogurte, em relação ao teor de glicose com o decorrer do período de armazenamento. Nota-se que a amostra que obteve maior elevação no teor de glicose foi a do Ensaio 2, que inicialmente (1º dia) apresentava 6,15 %, e aos 28 dias de armazenamento um teor de 29,69 % de glicose. Em função de conter FOS (3 %) nesta formulação, há também a presença de glicose em maior quantidade (5,6 %), que faz parte da caracterização do FOS. Além disso, por não apresentar adição de Bifidobactéria, o FOS pode ter sido convertido, em uma boa parte, em glicose. E também, possivelmente, esta elevação no teor de glicose foi por conter somente as bactérias tradicionais do iogurte e estas, não utilizam o FOS como substrato.

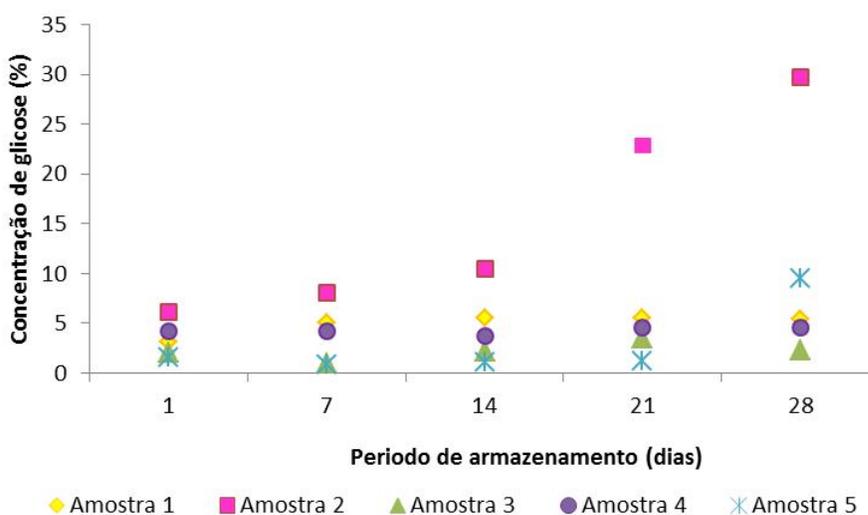


Figura 15. Concentração (%) de glicose nas amostras de iogurte em função do tempo de armazenamento.

Desta forma, as amostras que contém FOS juntamente com bifidobactéria (Ensaio 4 e 5), apresentaram menores valores de glicose. A amostra do Ensaio 4 no 1º dia obteve o valor de 4,22 %, chegando aos 28 dias com 4,62 %, ou seja, houve o consumo de glicose pelas bactérias probióticas desde o início do processo fermentativo, pois o valor detectado na caracterização do FOS, nos permitiu chegar a uma concentração de 5,6 % de glicose, sendo assim, o consumo de glicose desta amostra iniciou ainda durante o processamento do iogurte. Além disto, a quantidade de cultura probiótica adicionada (3 %) favoreceu, para este resultado, maior consumo de lactose e glicose, fonte de substrato para as bifidobactérias.

Em relação a amostra do Ensaio 5, a concentração de glicose no 1º dia era de 1,55 % e aos 28º dias apresentava teor de 9,49 %, havendo um acréscimo no teor de glicose desta amostra. Pode-se citar que houve consumo de glicose durante a incubação do iogurte, e por conter menos bifidobactéria (1,5 %), houve menor consumo e maior conversão do FOS em glicose, pelo aumento do período de armazenamento, nesta amostra. Já a amostra do Ensaio 3 iniciou com valores de glicose de 1,55 % (1º dia), e ao final do armazenamento (28º dia) o teor era de 2,33 %, por não conter FOS nesta amostra, observa-se valores menores de glicose com uma pequena elevação no final do tempo de estocagem. Valores muito inferiores no início, detectam o consumo de substrato (glicose) pelas bifidobactérias durante o processamento do iogurte, comportamento semelhante as amostras dos Ensaio 4 e 5.

A formulação controle (Ensaio 1) no 1º dia obteve uma concentração de 3,17 % e aos 28 dias 4,62 % de glicose. Não houve consumo de glicose pelas bactérias tradicionais, durante o período de processamento e de estocagem. O teor de glicose inicial do iogurte tradicional e semelhante ao obtido por Borges et al. (2010), onde encontrou para a glicose em iogurtes tradicionais (amostras comerciais) valores médios de 2,7g/100g.

d) Frutose

A Figura 16 está demonstrado a quantificação de frutose na amostra do Ensaio 2 em função do tempo de armazenamento. A mesma foi conduzida pela perda de área dos picos dos cromatogramas. Ressalta-se que a concentração só foi possível ser quantificada na amostra do Ensaio 2, pois nas demais amostras não era detectável cromatograficamente a concentração de frutose.

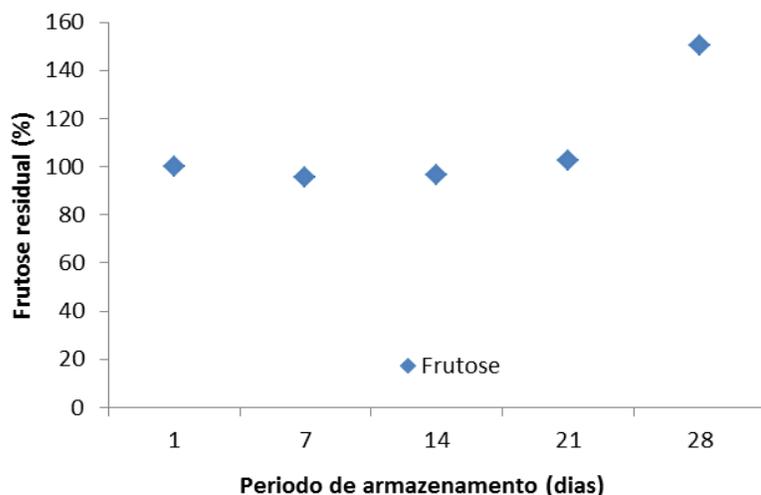


Figura 16. Frutose (% de área) na amostra de iogurte do Ensaio 2 em função do período de armazenamento.

A amostra do Ensaio 2 (3 % de FOS) apresenta inicialmente 0,6 % de frutose, o qual corresponde a 100 % no primeiro dia de armazenamento. No 28º dia de armazenamento, verifica-se um acréscimo na concentração de frutose, para 7,1 %. Este aumento pode estar vinculado a hidrólise do FOS em frutose, o qual é favorecido em condições muito ácidas ou em condições prolongadas de tempo/temperatura (SILVA, 2010). Sabe-se que prolongando o tempo de armazenamento dos iogurtes, tem-se condições ácidas, com conseqüente abaixamento do pH, devido produção de ácido láctico em maior quantidade, isto possibilitou o aumento da frutose. Nesta amostra não há adição de bifidobactéria, outro motivo para que não haja consumo do FOS pelas bactérias tradicionais do iogurte, e este seja convertido em frutose.

Borges et al. (2010) encontraram valores de frutose em torno de 0,3-0,9g/100g em amostras comerciais de iogurte tradicional (amostras de iogurtes comerciais, sem qualquer tipo de fibra ou mesmo FOS).

Segundo Silva (2007) os prebióticos não somente proporcionam aumento no número de bactérias benéficas no intestino grosso de humanos, mas aumentam a atividade das bifidobactérias, através do fornecimento de substrato fermentável.

e) Fruto-oligosacarídeo

Na Figura 17 está demonstrado a quantificação dos componentes do FOS (kestose, nistose, frutossilnistose) na amostra de iogurte do Ensaio 2, pela perda de área dos picos dos cromatogramas, em função do período de armazenamento.

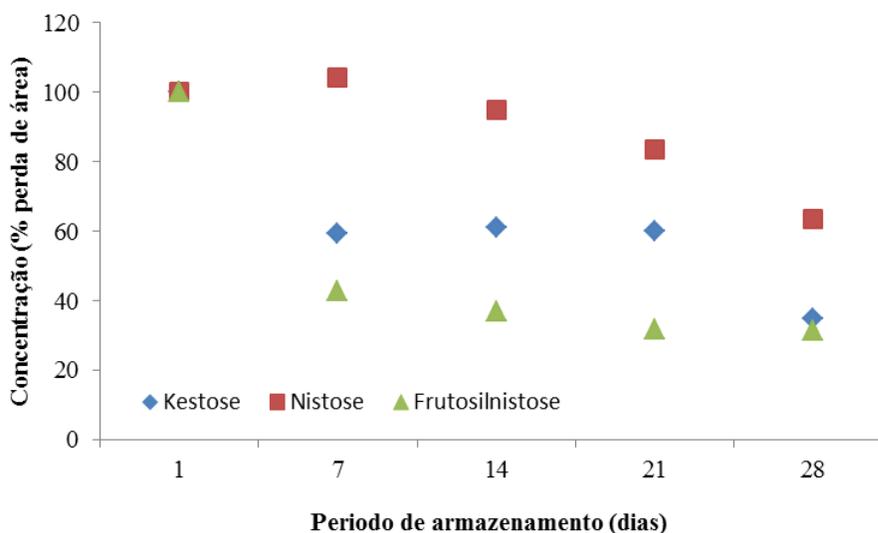


Figura 17. Teor de kestose, nistose e frutossilnistose em amostra de iogurte (Ensaio 2) em função do período de armazenamento.

Ao avaliar o comportamento dos FOS para amostra do Ensaio 2, verifica-se um declínio da kestose, nistose e frutossilnistose, com o decorrer do período de armazenamento do iogurte. Observa-se maior declínio para a frutossilnistose, a partir do 7º dia de armazenamento. Para a kestose, houve um declínio aos 7 dias, permanecendo praticamente constante até o 21º dia, com declínio aos 28 dias. Já para a nistose, esta permaneceu constante até o 7º dia de armazenamento, com declínio gradativo até 28º dia de armazenamento, porém menos acentuado que os demais constituintes do FOS.

O FOS comercial apresenta uma concentração de 56,1 g de FOS para cada 100 g de produto comercial (14,7 % de kestose, 23,8 % de nistose e 17,6 % de frutossilnistose). Como foi adicionado 3 % de FOS nesta amostra (Ensaio 2), isto corresponde um total de 1,7 g de FOS em 100 g de iogurte, distribuído em 0,44 % de kestose, 0,71 % de nistose e 0,53 % de frutossilnistose.

Aos 21 e 28 dias a amostra apresentavam 1,07 g e 0,84g de FOS por 100 g de iogurte, com 0,27 % e 0,14 % de kestose, 0,6 % e 0,5 % de nistose, e 0,2 % de frutossilnistose (para

ambos os dias), respectivamente, ou seja, houve uma diminuição aproximadamente de praticamente 65 % para a kestose, 36,6 % para a nistose e 68,5 % para frutossilnistose aos 28 dias de armazenamento. Desta forma, como já relatado anteriormente, pode ter ocorrido à hidrólise dos FOS e formação de frutose, já que nesta amostra não consta adição de bifidobactéria.

A Figura 18 apresenta os teores de kestose, nistose, frutossilnistose para a amostra de iogurte do Ensaio 4, pela perda de área dos picos dos cromatogramas, em função do período de armazenamento.

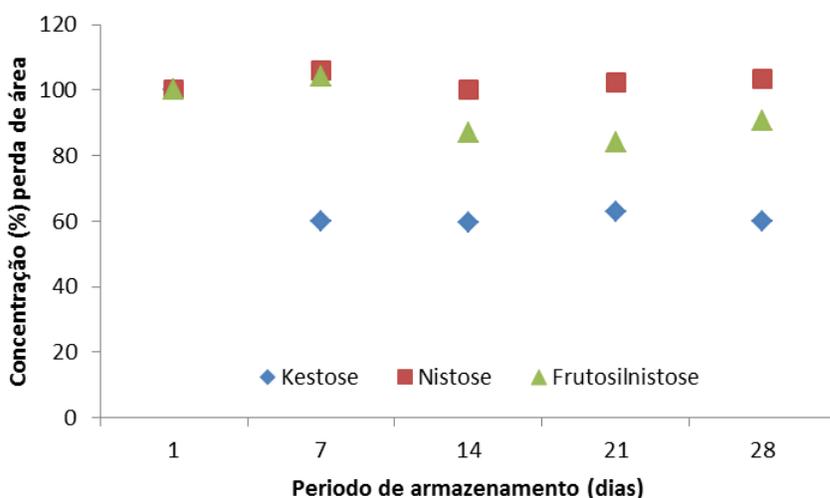


Figura 18. Teor de kestose, nistose e frutossilnistose em amostra de iogurte (Ensaio 4) em função do período de armazenamento.

Ao analisar o comportamento da amostra de iogurte do Ensaio 4 (Figura 18) em relação aos componentes do FOS, se observa uma menor perda quando comparado aos da amostra do Ensaio 2 (Figura 17). A kestose obteve maior declínio (40 %) até o 7º dia, após manteve-se constante até o 28º dia de armazenamento. A nistose e frutossilnistose até o 14º dia tiveram comportamentos semelhantes, após este período os valores de frutossilnistose decaíram cerca de 9,3 %.

Para a amostra do Ensaio 4, se observa menor perda dos FOS em decorrência do tempo, aos 21 e 28 dias, restaram e 0,3 % de kestose, 0,7 % de nistose, e 0,5 % de frutossilnistose, respectivamente, ou seja, um total de e 1,5 g de FOS por 100 g de iogurte aos 21 e 28 dias de armazenamento, respectivamente.

O iogurte do Ensaio 4, com 1,5g de FOS por 100 g de produto aos 28 dias de armazenamento, se situa dentro da faixa aceitável para alimentos funcionais. Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2008), para um alimento ter alegação da propriedade funcional por adição de FOS é necessário que o mesmo tenha, no mínimo (alimento líquido) de 1,5 g de FOS por porção diária de consumo, neste caso a porção de 100 g de iogurte.

Para o iogurte do Ensaio 5 (Figura 19), adicionado de 1,5 % de FOS, não apresentou características de alimento funcional. Pois, aos 21 e 28 dias apresentou 1,32 g e 0,26 g de FOS por 100 g de iogurte (0,24 % e 0,1 % de kestose, 0,55 % e 0,1 % de nistose, 0,53 % e 0,06 % de frutossilnistose), respectivamente.

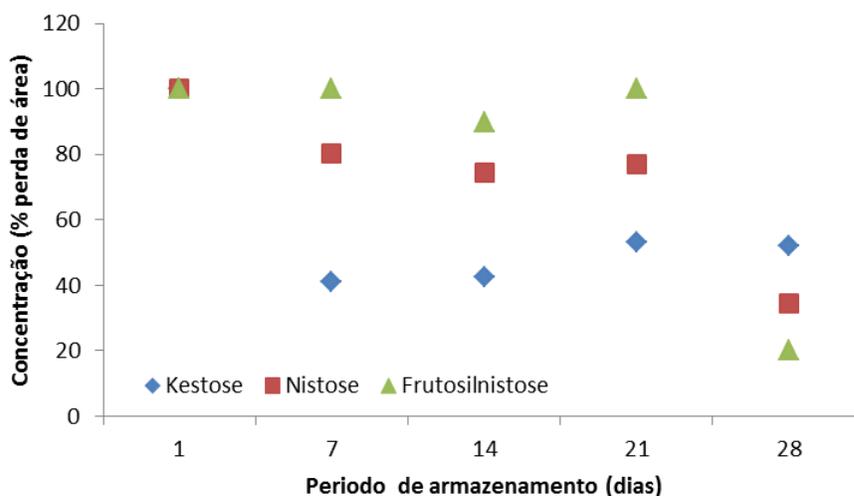


Figura 19. Teor de kestose, nistose e frutossilnistose em amostra de iogurte (Ensaio 5) em função do período de armazenamento.

De maneira geral, a amostra 2 por não conter bifidobactéria, pode ter ocasionado mais hidrólise e conversão do FOS em frutose em relação ao aumento do tempo de armazenamento. Para a amostra 4 que continha maiores quantidades de bifidobactéria e de FOS, pode até o final de sua vida útil, manter a quantidade mínima exigida na legislação para ser um produto funcional, pela adição de FOS, desta forma não podemos classificar como simbiótico no final do processo, pois não foi possível atingir a recomendação de produto probiótico devido pouca adição de cultura probiótica no iogurte, mas no entanto, com a utilização do FOS tornou a bifidobactéria mais resistente ao longo do tempo.

Na amostra 5, como houve pouca adição de FOS e Bifidobactéria não foi possível manter-se como produto funcional, pois a quantidade de FOS reduziu muito ao longo do tempo.

5.2 CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS

5.2.1 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 (ROCHA, 2008). Esta característica reológica é de grande importância no desenvolvimento de novos produtos, pois determinam a consistência e a textura dos mesmos e influenciam sua aceitabilidade pelos consumidores (STAFFOLO et al., 2004). Atributos reológicos são utilizados para determinar as propriedades texturais e são algumas das propriedades mais importantes de iogurte (GUGGISBERG et al., 2009).

A Figura 20 (a, b, c, d, e) demonstra que a viscosidade para as amostras de iogurtes (22 °C), diminuiu com o aumento da taxa de cisalhamento (s^{-1}), indicando comportamento de fluido não newtoniano.

A diminuição da viscosidade, com o aumento da taxa de cisalhamento, indica que o fluido apresenta características pseudoplásticas diminuindo a sensação de gomosidade durante a mastigação (DEBON, 2009; SILVA, 2007; VASCONCELOS, 2010). Debon (2009), relata que o aumento da taxa de cisalhamento e a diminuição da viscosidade ocorrem devido à quebra das estruturas das macromoléculas em solução, em decorrência do cisalhamento. Neste caso, a taxa de cisalhamento de aproximadamente $23,8 s^{-1}$ para todas as amostras até o 28º dia de armazenamento, demonstrou grande deformação na viscosidade, apresentando uma queda brusca neste parâmetro, com exceção da amostra do Ensaio 5 que por apresentar viscosidade inicial e final menor em comparação com as demais amostras, sofreu menos deformação.

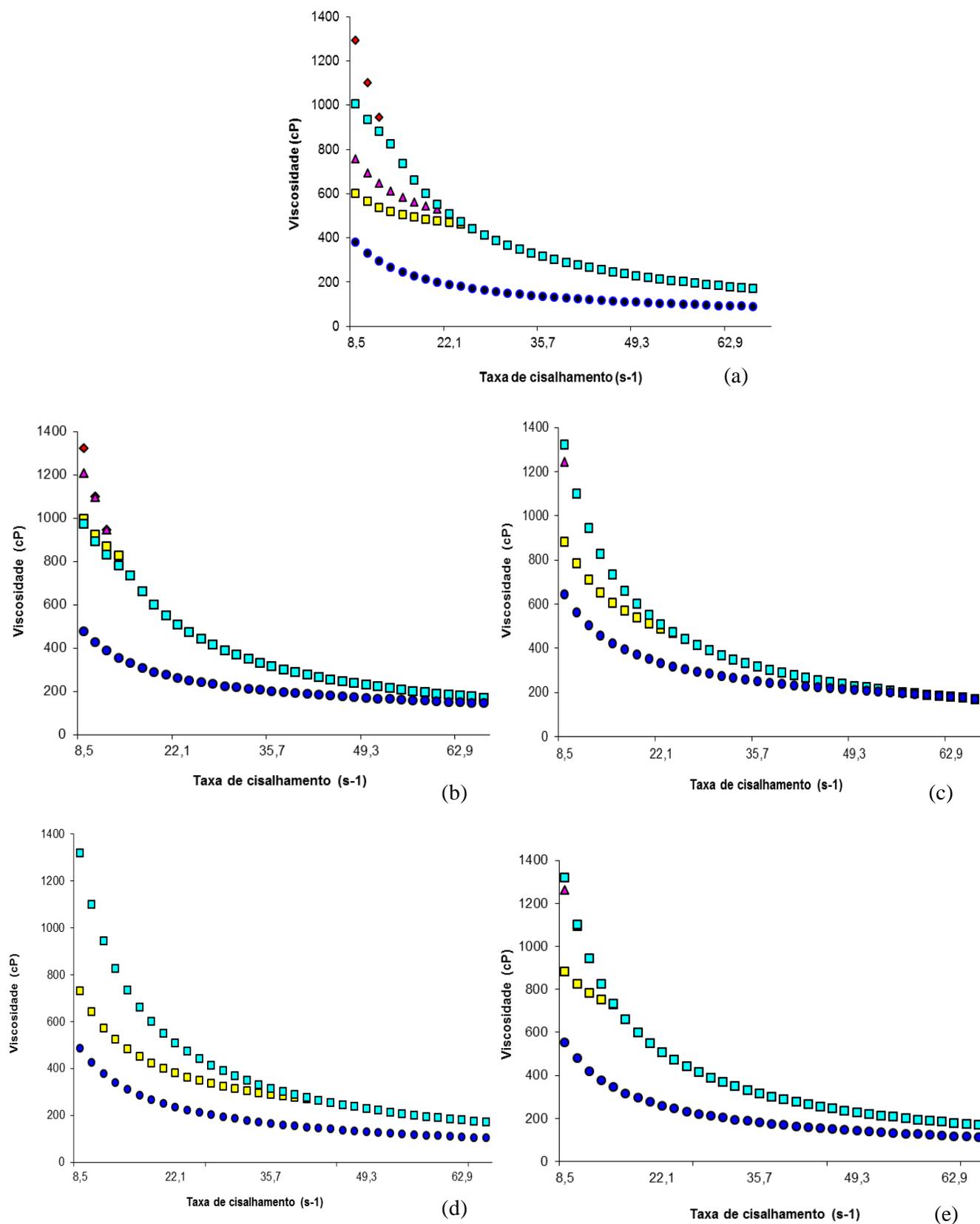


Figura 20. Variação da viscosidade nas amostras de iogurte com o tempo de armazenamento (a) 1º dia, (b) 7º dia, (c) 14º dia, (d) 21º dia e (e) 28º dia de armazenamento a 4°C, respectivamente.

O iogurte é considerado um material semi-sólido e sofre deformação irreversível após força exercida. Durante o cisalhamento há intensa quebra da estrutura, o que reflete na diminuição da tensão requerida com o aumento da taxa de deformação, devido à quebra das ligações que estabilizam a rede protéica (GAUCHE, 2007).

Ao analisar a amostra controle (Ensaio 1), nota-se que esta iniciou com uma viscosidade inicial (Figura 20-a) de 1293,9 cP, com uma taxa de cisalhamento de $8,5 \text{ s}^{-1}$ e após os demais dias teve um pequeno aumento e se manteve com valores de 1319,7 cP, até o 28º dia de estocagem. Neste caso, verifica-se que a viscosidade apresentou valores maiores do que o iogurte com adição de FOS, no 1º e no 7º dia de armazenamento, e nos dias seguintes obteve valores semelhantes às amostras que continham FOS (Ensaio 2 e 4). Já para a amostra do Ensaio 2, observa-se que seus valores aumentaram consideravelmente com o tempo de armazenamento, sendo que no 1º dia (Figura 20-a) a viscosidade era de 757,6 cP, chegando no 21º dia (Figura 20-d) com 1319,7 cP, com um pequeno decréscimo no 28º dia (Figura 20-e) para 1261,5 cP.

Em relação ao comportamento da viscosidade da amostra do Ensaio 4, verifica-se que até o 7º dia de armazenamento (Figura 20 a e b) a viscosidade dos iogurtes adicionados de FOS apresentaram uma viscosidade inicial menor que a amostra controle. No entanto, após este período, houve um incremento de aproximadamente 310 cP, indicando ser o iogurte do Ensaio 4, o mais viscoso e com comportamento semelhante ao do Ensaio 2. Porém, o iogurte menos viscoso é o do Ensaio 5, esta por sua vez apresentou viscosidade inicial de 380,9 cP (Figura 20-a) no 1º dia, atingindo 550,7 cP (Figura 20-e) no 28º dia de armazenamento refrigerado, com uma taxa de cisalhamento de $8,5 \text{ s}^{-1}$.

Desta forma, observa-se que a viscosidade do iogurte foi pouco influenciada pela adição de cultura probiótica (Ensaio 3), com viscosidade variando de 600,5 cP a 995,2 cP, mas sim fortemente pela presença do FOS. Isto pode ser explicado pelo acréscimo de fibras (FOS), que contribuem para o aumento dos sólidos totais no produto, que sendo substâncias altamente higroscópicas, agem como estabilizante devido a sua capacidade de ligar a água e formar uma rede mais coesa semelhante a um gel (VASCONCELOS, 2010), modificando a viscosidade do produto.

O mesmo comportamento em relação a viscosidade com adição de frutooligossacarídeos foi verificado por outros autores. Debon (2009) observou que o aumento do tempo de armazenamento fez com que a viscosidade aumentasse em presença da inulina (fibra solúvel) contribuindo para a modificação das propriedades físicas dos alimentos,

devido a sua capacidade em reter água, auxiliando na formação de géis viscosos. Silveira (2009) observou uma elevação da viscosidade com o aumento da quantidade de extrato de yacon, rico em frutooligossacarídeos do tipo inulina. Tal fato se deve provavelmente à ação desses FOS quando interagem com a água, formando microcristais, interagindo entre si, elevando a viscosidade da mistura. Guggisberg et al., (2009), também observou que a viscosidade aumentou com a elevação da concentração de inulina. Os valores da tensão de escoamento geralmente aumentam com o aumento de sólidos totais, ou seja, com concentrações maiores de inulina. Oliveira (2008) observou que o acréscimo de inulina em sorvetes aumenta significativamente sua viscosidade devido às interações da fibra solúvel com a parte aquosa do produto. Sua funcionalidade está baseada em seu efeito sobre soluções aquosas a vários níveis de sólidos, sendo que à medida que a concentração de inulina aumenta a viscosidade aumenta gradativamente.

Como comentado anteriormente, apesar do FOS ser uma fibra solúvel capaz de interagir com a parte aquosa do iogurte, isto vai depender da concentração aplicada deste ingrediente ao produto, pois ela não é capaz de formar gel após o aquecimento e/ou resfriamento (VASCONCELOS, 2010). Isto sugere que a adição de 1,5 % de FOS no iogurte (Ensaio 5) não proporcionou aumento do gel e muito menos na viscosidade, propriedade importante que também definiu a aceitação dos produtos (Tabela 12).

5.3 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

5.3.1 Contagem de bactérias lácticas totais

Na Tabela 11, consta a contagem de bactérias lácticas totais no decorrer dos diferentes tempos de armazenamento. Observa-se que a amostra do Ensaio 1 (iogurte controle) houve aumento significativo ($p < 0,05$), com o tempo de estocagem, para contagem de bactérias tradicionais (*Streptococcus salivarius* subesp. *Thermophilus* e *Lactococcus delbrueckii* subesp. *Bulgaricus*) de $3,23 \log_{10}$ UFC/mL para $5,14 \log_{10}$ UFC/mL, cerca de dois ciclos logarítmicos.

Segundo Pimentel (2009), em seu trabalho foi verificado aumento na viabilidade de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*, devido estas culturas suportarem valores de pH mais baixos entre 3,5 a 3,8. Com a fermentação longa, o grau de velocidade de crescimento de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* declina enquanto *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* continua a reduzir o pH pela produção de quantidades excessivas de ácido láctico, portanto a redução na contagem de *L. delbrueckii* subsp. *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 (MAZOCHI, 2009).

Tabela 11. Matriz do planejamento fatorial 2^2 completo (valores codificados e reais) e resposta para contagem de bactérias lácticas (\log_{10} UFC/mL) no 1º, 7º, 14º, 21º e 28º dia de armazenamento refrigerado

Ensaio	Variáveis independentes*		Resposta**				
			Bactérias lácticas totais				
			(\log_{10} UFC/mL)				
X ₁	X ₂	1	7	14	21	28	
1	-1 (0)	-1 (0)	3,23 ^b (0,001)	3,30 ^b (0,010)	4,71 ^a (0,072)	4,85 ^a (0,011)	5,14 ^a (0,002)
2	1 (3,0)	-1 (0)	6,08 ^a (0,005)	5,00 ^a (0,050)	4,20 ^a (0,001)	4,74 ^a (0,030)	5,53 ^a (0,069)
3	-1 (0)	1 (3,0)	8,31 ^a (0,281)	7,30 ^b (0,074)	7,70 ^{ab} (0,156)	7,55 ^b (0,073)	7,55 ^b (0,222)
4	1 (3,0)	1 (3,0)	8,49 ^a (0,004)	8,03 ^b (0,053)	8,04 ^b (0,003)	8,18 ^{bc} (0,040)	8,37 ^{ac} (0,103)
5	0 (1,5)	0 (1,5)	8,12 ^a (0,148)	7,58 ^b (0,014)	7,51 ^b (0,055)	7,47 ^b (0,028)	7,41 ^b (0,035)

*X₁= Fruto-oligosacarídeos (%), X₂= Cultura láctica probiótica (%); **média seguida de letras iguais nas linhas indicam não haver diferença significativa, entre os dias de armazenamento, à nível de 5% (Teste de Tukey).

De acordo com a Tabela 11, pode-se verificar que a adição de FOS proporcionou maiores contagens de bactérias lácticas totais do início até o final da vida útil, ou seja, pode-se relacionar o efeito estimulante das fibras sobre probióticos, onde se obteve contagens superiores de espécies probióticas em presença de FOS (prebióticos), como no caso dos Ensaio 4 e 5. Estes resultados podem ser melhor visualizados pelos gráficos de pareto da Figura 21, os quais apresentam os efeitos estimados das variáveis estudadas no 1 e 28º dia de armazenamento.

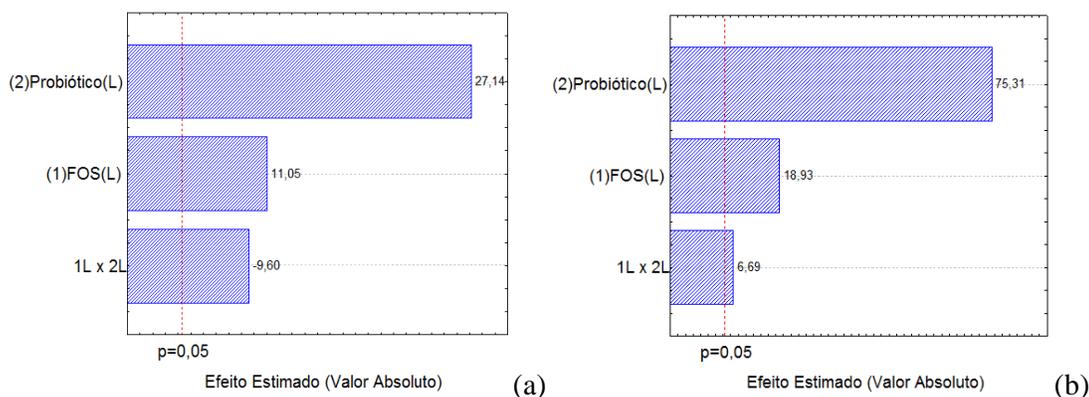


Figura 21. Gráfico de Pareto com o Efeito Estimado (Valor Absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental fatorial 2^2 , para contagem de bactérias lácticas totais (a) 1º dia e (b) 28º dia de armazenamento refrigerado.

O mesmo foi relatado em diversos estudos, Paseephol e Sherkat (2009), ao adicionar inulina em pó, a qual foi benéfica para o crescimento e a sobrevivência durante o armazenamento de bactérias lácticas, constataram que com a adição de inulina o declínio é mais lento para a contagem de bactérias. Castro et al. (2009), também verificaram que a adição de oligofrutose em iogurtes proporcionou melhora na viabilidade de bactérias probióticas. Para Donkor et al. (2007) a adição de prebióticos fornece nutrientes adicionais, e seletivamente estimulam o crescimento de probióticos, tais como *Bifidobacterium* no intestino humano. Oliveira et al. (2011) em seu estudo verificou que a adição de inulina melhora a contagem de bactérias lácticas mas na presença de *Bifidobacterium* o efeito da adição da inulina é mais benéfico e mostra aumento significativo na população de Bifidobactéria, evidenciando claro efeito bifidogênico, pela adição deste prebiótico.

Além disso, os prebióticos podem exercer um efeito protetor sobre as bactérias probióticas, melhorando a sua sobrevivência e atividade durante a armazenagem do produto, bem como sobre a sua passagem através das partes superiores do trato gastrointestinal (CASTRO, 2009). Segundo estudos de Oliveira et al. (2011), a ausência de inulina, após 7 dias, fez com que as contagens de todas as bactérias diminuíssem 2 % (como média) em comparação com o 1º dia, no entanto esta diminuição não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na presença de inulina. Espírito Santo et al. (2012) afirmam que a adição de fibras de frutas e subprodutos também aumenta a viabilidade da cultura probiótica. Sendo que após períodos de armazenamento de 14 dias é evidente que a suplementação de fibras favorece a sua viabilidade.

Segundo regulamento Técnico para leites fermentados do tipo fermentado ou cultivado, a contagem de bactérias lácticas totais deve estar na faixa de 10^6 UFC/g no produto final durante seu prazo de validade (BRASIL, 2007). Desta forma, os experimentos 3, 4 e 5 estão dentro dos padrões que a legislação determina. Porém, as amostras referentes aos Ensaio 1 (iogurte controle) e 2 (3 % de FOS) cuja contagem foi menor que 10^5 UFC/g, não se enquadrando nos parâmetros estipulados pela legislação.

Porém, a legislação brasileira considera um alimento probiótico aquele que contém uma quantidade mínima viável do probiótico na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do consumo, conforme indicação do fabricante, isto equivale ao consumo de 100 g do produto contendo no mínimo 10^6 UFC/mL de micro-organismos probióticos (BRASIL, 2008). Desta forma o produto elaborado não atingiu a recomendação mínima viável de probiótico, sendo que o produto apresentou contagem da cultura probiótica na faixa de 10^5 a 10^6 UFC/mL, devido à cultura probiótica estar determinada junto com a cultura láctica tradicional do iogurte.

Sabe-se que manter a contagem de bactérias probióticas em toda vida útil, dentro do que é recomendado em produtos lácteos fermentados, não é tarefa fácil, pois sua sobrevivência depende de uma variedade de fatores como a interação entre as espécies presentes, condições de cultura, acidez final, oxigênio dissolvido, nível de inoculação, temperatura de estocagem, entre outros fatores (MAZOCHI, 2009).

Pimentel (2009), afirma que uma maior contagem de bactérias tradicionais diminui a viabilidade de culturas probióticas, sendo que o peróxido de hidrogênio produzido pelo *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* é o principal fator relacionado com a redução na viabilidade de micro-organismos probióticos durante estocagem refrigerada.

Becker (2009) indica que o pH final do iogurte também afeta a viabilidade da *Bifidobacterium*. A combinação de baixo pH e acréscimo da acidez poderia resultar em aumento de ácido não dissociado, o qual é mais danoso aos micro-organismos e conduzindo a um rápido decréscimo da população de bifidobactérias durante a vida-de-prateleira do produto. Deste modo, Silva (2007) cita que o crescimento de *Bifidobacterium* sp., é retardado a pH abaixo de 5,0.

A Figura 22 apresenta a morfologia das colônias de bactérias lácticas totais. Na figura estão presentes colônias da espécie *Bifidobacterium* e das culturas tradicionais do iogurte (*Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* e *Lactococcus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*). Acredita-se que as colônias de *Bifidobacterium* apresentaram coloração

amarelada com formato fino e alongado e as bactérias tradicionais apresentaram coloração amarela e forma circular.

As bifidobactérias são bastonetes, gram-positivos, anaeróbios, no entanto, algumas são tolerantes ao oxigênio e algumas possuem formato de Y. As bactérias lácticas tradicionais na fabricação de iogurtes, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* são cocos unidos, geralmente em cadeias curtas e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* são bastonetes unidos em cadeias longas (BERNAL, 2004).



Figura 22. Visualização do crescimento das colônias nas placas de petri de bactérias lácticas totais.

5.4 CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS

A Tabela 12 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^2 (valores codificados e reais) com a resposta em aceitação geral das formulações de iogurte nos diferentes períodos de armazenamento refrigerado. Verifica-se que as amostras diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) no decorrer dos períodos de armazenamento. No 21º de armazenamento as amostras 3 (iogurte com 3 % de Bifidobactéria) e 5 (iogurte com 1,5 % de FOS e Bifidobactéria) apresentaram menores pontuações hedônicas, de 6,59 e 6,50 (gostei ligeiramente), respectivamente e diferiram das demais formulações.

Resultados semelhantes foram encontrados por Zacarchenco e Massaguer-Roig (2006) para leites fermentados adicionados ou não de probióticos. As diferenças sensoriais foram significativamente ($P < 0,05$) percebidas conforme o tempo de armazenamento aumentou.

Tabela 12. Matriz do planejamento fatorial 2^2 completo (valores codificados e reais) e resposta em aceitação geral para as formulações no 1º, 7º, 14º e 21º dia de armazenamento refrigerado

Ensaio	Variáveis Independentes*		Resposta**			
			Aceitação geral			
			1	7	14	21
1	X ₁ -1 (0)	X ₂ -1 (0)	7,50 ^{aA} (0,007)	7,40 ^{bA} (0,001)	7,13 ^{cA} (0,001)	7,17 ^{cA} (0,005)
2	1 (3,0)	-1 (0)	7,53 ^{aA} (0,001)	7,36 ^{bA} (0,005)	7,17 ^{cA} (0,001)	7,18 ^{cA} (0,002)
3	-1 (0)	1 (3,0)	7,13 ^{aA} (0,002)	7,57 ^{bA} (0,001)	6,57 ^{cA} (0,010)	6,59 ^{cB} (0,013)
4	1 (3,0)	1 (3,0)	7,71 ^{aA} (0,007)	7,53 ^{abA} (0,003)	7,38 ^{bA} (0,001)	7,41 ^{bA} (0,03)
5	0 (1,5)	0 (1,5)	7,13 ^{aA} (0,002)	7,27 ^{bA} (0,001)	6,83 ^{cA} (0,005)	6,50 ^{dB} (0,006)

*X₁= Fruto-oligossacarídeos (%), X₂ = Cultura láctica probiótica (%); **média seguida de letras iguais nas linhas (minúsculas) e nas colunas (maiúsculas) indicam não haver diferença significativa, à nível de 5% (Teste de Tukey).

Isto reflete o aumento da acidez nos produtos com o decorrer do período de armazenamento, resultando em uma menor aceitação, fato este mencionado por Silveira, (2009) que uma acidez láctica superior a 1,2 % pode resultar em produtos com sabor ácido desagradável, comprometendo sua aceitação. Fato este verificado no presente estudo. Para a amostra do Ensaio 1 (Tabela 2) aos 21 dias de armazenamento e para as demais formulações aos 28 dias de armazenamento a acidez atingiu valores próximos ou superiores a 1,2 %.

Os efeitos sensoriais relacionados com a presença de probióticos em leites fermentados, segundo Zacarchenco e Massaguer-Roig (2006) também não diferiram significativamente entre si e nem do leite fermentado padrão. Os resultado sugerem que é possível melhorar a aceitabilidade de produtos fermentados contendo probióticos.

A Figura 23 (a e b) apresenta os gráficos de Pareto com os Efeitos Estimados (Valor Absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial 2^2 para aceitação geral das formulações de iogurte, no 1º e 21º dia de armazenamento refrigerado. A aceitação geral dos

iogurtes foi fortemente influenciada pela adição de FOS, sendo que esta variável apresentou efeito significativo positivo, bem como a interação com a cultura probiótica. Ao contrário, o aumento da concentração da cultura probiótica, proporcionou uma diminuição na aceitação dos produtos. Desta forma, a adição isolada de Bifidobactéria nas formulações alterou a aceitação geral, mas em presença do FOS influenciou positivamente na aceitação do produto.

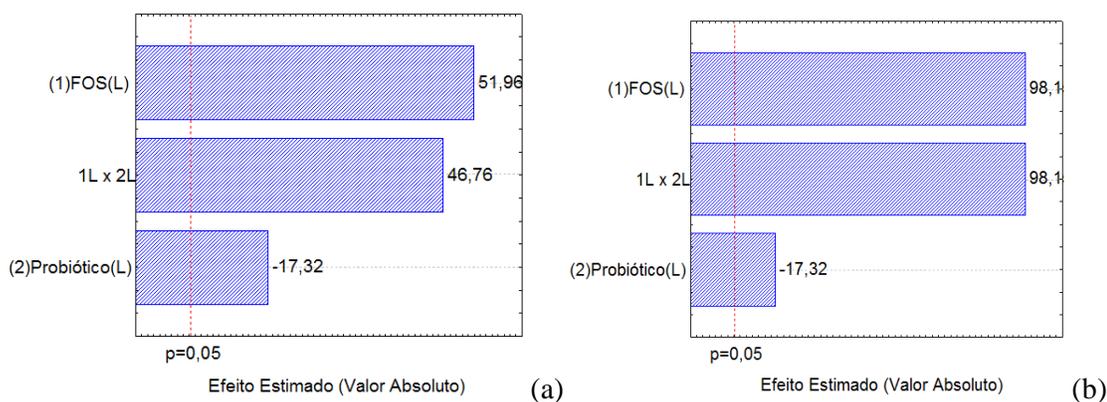


Figura 23. Gráfico de Pareto com o Efeito Estimado (Valor Absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental fatorial 2², para aceitação geral (a) 1^o dia de armazenamento e (b) 21^o dia de armazenamento refrigerado.

A Figura 24 mostra os histogramas de frequência para a aceitação das formulações de iogurte no 1^o, 7^o, 14^o e 21^o dia de armazenamento refrigerado. Os resultados demonstram graficamente a avaliação sensorial para o atributo avaliado nas diferentes formulações, em relação às pontuações com valores máximos (9) para “gostei muitíssimo” e valores mínimos (1) para “desgostei muitíssimo”.

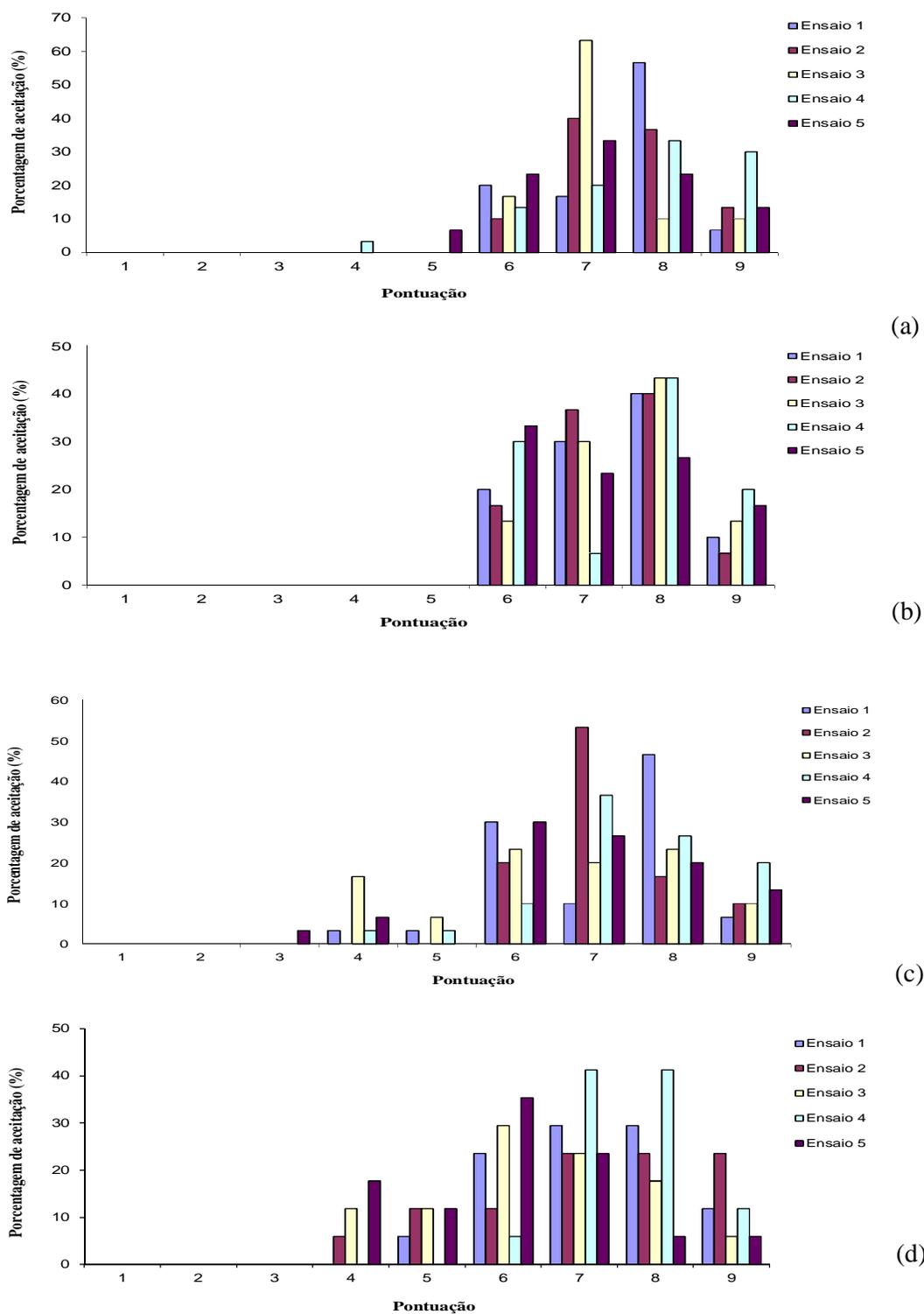


Figura 24. Histograma de frequência para o atributo aceitação geral no 1º (a), 7º (b), 14º (c) e 21º dia (d) de armazenamento refrigerado, respectivamente.

A adição de FOS contribuiu para melhorar a aceitação de iogurtes semi-desnatados contendo ou não Bifidobactéria, sendo muito comentado entre os provadores que as formulações que continham FOS apresentavam-se mais viscosas em comparação com as demais, as quais influenciaram na aceitação do produto e isto é comprovado nas características reológicas do produto (Figura 20).

A estabilidade do iogurte foi avaliada pela aceitação geral com o tempo de armazenamento, resultando em diminuição das pontuações para todas as amostras com 21 dias de conservação sob refrigeração. No entanto, somente as formulações dos Ensaios 3 e 5 apresentaram pontuações significativamente inferiores as demais, com aceitação geral de 88,2 % (Índice de aceitação - I.A., 73,20 %) e 82,3 % (I.A., 67,32 %), respectivamente. Isto pode ser explicado, pelo fato que as bifidobactérias são altas produtoras de ácido acético (BERNAL, 2004), o que proporciona ao produto do Ensaio 3 (3 % de bifidobactéria) um sabor desagradável. Para a formulação do Ensaio 5, foi constatado um aumento da sinérese (~35 % - Tabela 3) aos 21 dias de armazenamento, influenciando no aspecto do produto e conseqüentemente na aceitação do mesmo. As demais formulações permaneceram com propriedades sensoriais aceitáveis ao longo do período de estocagem, sendo que aos 21 dias, as formulações dos Ensaios 1, 2 e 4 apresentaram aceitação geral de 100 % e 94,1 % (I.A., 79,74 %) e 100 % (I.A., 82,35 %), respectivamente. Leva-se em consideração, também, o fato da não adição de conservante no produto.

Pimentel (2009) observou que houve uma melhor aceitação de iogurtes adicionados de FOS em relação aos iogurtes controle, sendo que o prebiótico promoveu a aparência e a textura dos produtos, tornando-os mais cremosos. Quando a inulina esteve presente na formulação contendo probiótico à aceitação foi semelhante a da formulação padrão, fazendo com que houvesse uma melhor aceitação do produto simbiótico.

Neste caso, quando se comparam os dados reológicos com os dados sensoriais nota-se que a viscosidade aumenta para concentrações de inulina maiores, mas que a leveza e sabor cremoso mostram um ótimo em torno de 3 % de inulina, a qual atua como um espessante (KIP et al., 2006). Resultados, semelhantes foram obtidos no presente estudo (Figura 20), com a presença de 3 % de fruto-oligossacarídeos.

Kempka et al. (2008) obtiveram para bebida láctea desenvolvida com culturas probióticas, aceitação das formulações pelos provadores até o 21º dia de estocagem, com o produto armazenado a 4°C, apresentando um tempo de vida útil significativo para o produto desenvolvido.

6. CONCLUSÃO

Através da elaboração das formulações de iogurtes pode-se determinar a estabilidade e os efeitos da adição de prebiótico (fruto-oligossacarídeo) e probiótico (*Bifidobacterium*) sobre uma amostra controle.

As formulações de iogurte com adição de cultura probiótica, apresentaram valores de pH superiores e produtos menos ácidos, teve influencia significativa ($p < 0,05$) na redução da sinérese no 1º e 14º dia de armazenamento refrigerado demonstrando a importância desta variável para a formulação deste produto. A adição de FOS nas formulações indicou que maior concentração adicionada resulta em maiores valores de sinérese nos iogurtes. Desta maneira, maior liberação de soro foi observada nas formulações adicionadas de FOS.

A adição de FOS e de Bifidobactéria não influenciou para mudança no teor de proteína nos iogurtes no decorrer do tempo de armazenamento. E pode-se verificar que quanto maior a porcentagem de FOS nas formulações (Ensaio 2, 4 e 5) maior são os °Brix.

Em relação aos dados da cor objetiva, os valores de luminosidade (L^*) aumentaram com o tempo de armazenamento, para todas as amostras. Os valores de a^* foram positivos e aumentaram significativamente ($p < 0,05$) com o tempo de armazenamento, em direção ao vermelho para todos os ensaios, o qual deve-se também a adição de corante rosa em pó nas amostras. Cromaticidade (b^*) diminuiu no decorrer do tempo de armazenamento para todas as amostras, atingindo pontuações negativas (em direção a intensidade azul).

Através da análise de caracterização do Fruto-oligossacarídeo, pode-se verificar que em 100 g de FOS comercial (Fiber FOS®) obtém-se somente 56,1 % de FOS puro, ou seja, o restante são outros açúcares e compostos. Destacando, que no FOS comercial (Fiber FOS®) há presença de frutose, glicose e outros isômeros, sendo que a frutose por sua vez, representa 8,0 % e a glicose 5,6 % da porção de 100 g do FOS.

A presença de açúcares nas formulações de iogurtes demonstrou que, durante o armazenamento as amostras dos Ensaios realizados, diminuíram suas quantidades de lactose, sendo que inicialmente o teor de lactose das formulações era de aproximadamente 4,06g/100 mL. E a amostra que obteve maior consumo de lactose aos 28 dias de armazenamento foi a do Ensaio 4, cerca de 26,04 %,

A amostra que obteve uma maior queda no teor de sacarose foi a amostra do Ensaio 2, ou seja, do 1º dia até o 28º dia de armazenamento seu consumo foi de 54,4 %. E as amostras

que contém FOS juntamente com bifidobactéria (Ensaio 4 e 5), apresentaram menores valores de glicose.

Referente à quantificação de FOS nas amostras, no Ensaio 4, se observa menos perda dos FOS em decorrência do tempo, sendo assim aos 21 e 28 dias, restaram 0,3 % de kestose, 0,7 % de nistose, e 0,5 % de frutossilnístose, respectivamente, ou seja, um total de e 1,5 g de FOS por 100 g de iogurte aos 21 e 28 dias de armazenamento, respectivamente.

A viscosidade para as amostras de iogurtes (22°C) diminuiu com o aumento da taxa de cisalhamento (s^{-1}), indicando comportamento de fluido não newtoniano. Desta forma, observa-se que a viscosidade do iogurte foi pouco influenciada pela adição de cultura probiótica (Ensaio 3), com viscosidade variando de 600,5 cP a 995,2 cP, mas muito influenciada pela presença do FOS.

Em relação a contagem microbiológica se observa que a amostra do Ensaio 1 (iogurte controle) houve aumento significativo ($p < 0,05$), com o tempo de estocagem, para contagem de bactérias tradicionais (*Streptococcus salivarius* subesp. *Thermophilus* e *Lactococcus delbrueckii* subesp. *Bulgaricus*) de 3,23 \log_{10} UFC/mL para 5,14 \log_{10} UFC/mL, cerca de dois ciclos logarítmicos. Foi verificado que a adição de FOS proporcionou maiores contagens de bactérias lácticas totais do início até o final da vida útil, ou seja, pode-se relacionar o efeito estimulante das fibras sobre probióticos, onde se obteve contagens superiores de espécies probióticas em presença de FOS (prebióticos), como no caso dos Ensaios 4 e 5. Mas mesmo assim, o produto elaborado não atingiu a recomendação mínima viável de probiótico, sendo que o produto apresentou contagem da cultura probiótica na faixa de 10^5 a 10^6 UFC/mL.

A aceitação geral dos iogurtes foi influenciada pela adição de FOS, mas o aumento da concentração da cultura probiótica, fez diminuir a aceitação dos produtos. Desta forma, a adição isolada de Bifidobactéria nas formulações alterou a aceitação geral, mas em presença do FOS influenciou positivamente na aceitação do produto.

A estabilidade do iogurte foi avaliada pela aceitação geral com o tempo de armazenamento, resultando em diminuição das pontuações para todas as amostras com 21 dias de conservação sob refrigeração, mas que apesar disto, somente as formulações dos Ensaios 3 e 5 apresentaram pontuações significativamente inferiores,

De maneira geral, a amostra 2 por não conter Bifidobactéria, pode ter ocasionado maior hidrólise e conversão do FOS em frutose em relação ao aumento do tempo de armazenamento.

A amostra 4 que continha maiores quantidades de bifidobactéria e de FOS, pode até o final de sua vida útil, manter a quantidade mínima exigida na legislação para ser um produto funcional. Desta forma, não se classifica como produto simbiótico até o final de sua vida útil, pois não foi possível atingir a recomendação de produto probiótico devido pouca adição de cultura probiótica no iogurte, mas, no entanto, com a utilização do FOS tornou a Bifidobactéria mais resistente ao longo do tempo, sendo o ensaio 4, a formulação que permaneceu com propriedades sensoriais aceitáveis ao longo do período de estocagem, não diferindo da amostra controle e obtendo também maiores valores no teor da viscosidade.

Na amostra 5, como houve pouca adição de FOS e Bifidobactéria não foi possível manter o produto funcional, pois a quantidade de FOS reduziu muito ao longo do tempo.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Aplicar concentrações maiores de cultura probiótica, para garantir a funcionalidade do produto até o final de sua vida útil;
- Analisar e testar outros métodos de contagem microbiológica específica para crescimento de culturas probióticas;
- Elaborar formulações de iogurtes com diversas marcas e tipos de Fruto-oligossacarídeos;
- Testar concentrações maiores de Fruto-oligossacarídeo para garantir a quantidade recomendada no produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C. P. de M. **Efeito do fator de concentração nas características de iogurte com baixo teor de lactose obtido por ultrafiltração**. 2008. 58f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, SP.

AOAC. THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Selectos Métodos Oficiais y Prácticas Recomendadas de la AOCS**, Illinois, 1997.

BASTIANI, M. I. D. **Iogurte adicionado de concentrado protéico de soro de leite e farinha de linhaça: desenvolvimento, qualidade nutricional e sensorial**. 2009. 97f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

BECKER, L. V. **Iogurte probiótico com teor reduzido de lactose adicionado de óleo de linhaça**. 2009. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

BERNAL, O. L. M. **Desenvolvimento de uma bebida fermentada a partir de extrato hidrossolúvel de soja, contendo agentes probióticos e prebióticos**. 2004. 132f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, 2004.

BEZERRA, J. R. M. V. et al. **Introdução à tecnologia de leite e derivados**. Ed. Unicentro, Guarapuava, 2011. 192p.

BORGES, T. et al. Quanta lactose há no meu iogurte? **Acta Pediátrica Portuguesa** Sociedade Portuguesa de Pediatria, Universidade do Porto, Porto, v. 41, n. 2, p. 75-78, 2010.

BRANDÃO, S. C. C.; FONTES, A. C. L. **Tendências na fabricação de lácteos light e diet**. Disponível em: <<http://www.fepale.org/lechesalud/documentos/5SebastiaoBrandao.pdf>>. Acesso 18 de outubro de 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999. **Regulamento de procedimentos para registro de alimentos com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem**, Brasília, DF, 1999. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/1999.htm>>. Acesso em: 20 out. 2011.

_____. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Resolução n° 5, de 13 de novembro de 2000. Oficializar os “Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados”. **Diário Oficial da União**, de 27 de novembro de 2000, seção 1, página 9, Brasília, DF.

_____. ANVISA. **Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional ou de Saúde**, Resolução RDC n° 2, 7 de janeiro de 2002. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02_02rdc.htm>. Acesso em: 25 out. 2010.

_____. ANVISA. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos - IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Atualizado em 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 21 mar. 2012.

_____. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. Instrução Normativa n° 46, de 23 de outubro de 2007.

BROEKAERT, I. J.; WALKER, W. A. Probiotics and Chronic Disease. **J. Clin. Gastroenterol**, Munich, Germany, v. 40, n. 3, p. 270-274, Mar. 2006.

CASTRO, F. P. de. et al. Influence of different content of cheese whey and oligofructose on the properties of fermented lactic beverages: Study using response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, Florianópolis, SC, Brazil, v. 42, p. 993-997, 2009.

COSTA, N. M. B; ROSA, C. de O. B. Alimentos Funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos. Ed. Rubio. Rio de Janeiro, RJ, 2010.

CUNHA, T. M. et al. A influência do uso de soro de queijo e bactérias probióticas nas propriedades de bebidas lácteas fermentadas. **Braz. J. Food Technol.**, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Florianópolis, SC, Brasil, v. 12, n. 1, p. 23-33, jan./mar. 2009.

CURI, R. et al. **Entendendo a Gordura**: os ácidos graxos. Ed. Manole. Barueri, SP, 2002.

DALLA CORTE, F. F. **Desenvolvimento de frozen yogurt com propriedades funcionais**. 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

DEBON J. **Emprego da microfiltração tangencial na obtenção de leite fermentado prebiótico**. 2009. 122 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Área de

concentração: Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos. Universidade Federal de Florianópolis, Florianópolis, SC.

DONKOR, O. N. et al. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, Austrália, v. 17, p. 657-665, 2007.

EGEA, M. B. **Desenvolvimento de produto funcional: maçã desidratada contendo frutooligosacarídeos**. 2010. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

ESPÍRITO SANTO, A. P. do. et al. Fibers from fruit by-products enhance probiotic viability and fatty acid profile and increase CLA content in yoghurts. **International Journal of Food Microbiology**, Genoa, Italy, n. 154, p. 135–144, 2012.

EWASCHUK, J. B.; DIELEMAN, L. A. Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastroenterology**, China, v. 12, n. 37, p. 5941-5950, Oct. 2006.

FOSCHIERA, J. L. **Indústria de laticínios: Industrialização do leite – Análises – Produção de derivados**. Ed. Suliani, Porto Alegre, Dez. 2004.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos** São Paulo; Editora Atheneu, p.187, 2005.

GAUCHE, C. **Polimerização de proteínas do soro de leite por transglutaminase e propriedades físicas de iogurte elaborado após tratamento enzimático**. 2007. 120f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

GONZALEZ, N. J. et al. Sensory characteristics of peach-flavored yogurt drinks containing prebiotics and synbiotics. **LWT - Food Science and Technology**, USA, p. 1-6, 2010.

GRAY, J. **Fibra alimentar: definição e análise, fisiologia e saúde**. ILSI (International Life Sciences Institute) Europe, Brussels, Belgium, 2006.

GUGGISBERG, D. et al. Rheological, microstructural and sensory characterization of low-fat and whole milk set yoghurt as influenced by inulin addition. **International Dairy Journal**, Berne, Switzerland, v. 19, p. 107-115, 2009.

HUEBNER J. et al. Effect of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics. **International Dairy Journal**, Nebraska-Lincoln, USA, v. 18, p. 287-293, 2008.

KEMPKA, A. P. et al. Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego utilizando substratos alternativos e cultura probiótica. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, SP, v. 28, p. 170-177, dez. 2008.

KIP, P. et al. Inulins improve sensoric and textural properties of low-fat yoghurts. **International Dairy Journal**, The Netherlands, v. 16, p. 1098-1103, 2006.

KROLOW, A. C. R. RIBEIRO, M. E. R. Obtenção de leite com qualidade e elaboração de derivados. **Embrapa Clima Temperado**, Pelotas, RS, jul. 2006. 66p.

MANZANO, G. P. P. **Aspectos sensoriais e físico-químicos de “iogurtes” de soja com espessantes/estabilizantes à base de fécula de inhame (*Dioscorea alata*), amido modificado e gelatina.** 2007. 76 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição, área de Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, UNESP - Campus de Araraquara, Araraquara, SP

MAZIERO, M. T. et al. Propriedades sensoriais e físico-químicas de leites Fermentados comerciais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Ponta Grossa, Paraná, Brasil. v. 05, n. 01, p. 274-281, 2011.

MAZOCHI, V. **Produção de iogurte probiótico com leite de cabra adicionado de *bifidobacterium spp.*** 2009. 107 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Centro Universitário de Belo Horizonte, Belo Horizonte.

MENDES, A. R. Implementação e validação de uma metodologia para análise de fibra alimentar. 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Química Forense) - Departamento de Química FCTUC, Universidade de Coimbra.

NOGUEIRA, C. Funcionais e nutracêuticos: uma breve introdução. **Revista Funcionais & Nutracêuticos**. Editora Insumos, São Paulo, n. 0, ed. 16, p. 20-25, 2007.

OLIVEIRA, M. N. de. et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 38, n. 1, jan./mar., 2002.

OLIVEIRA, L. B. de. **Efeito da goma acácia e inulina na viabilidade de bactérias probióticas e nas características físico-químicas de leite fermentado simbiótico**. 2008. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, SP.

OLIVEIRA, A. F. de. **Fundamentos de nutrição para Tecnólogos em Alimentos**. Curso de Tecnologia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, PR, 2010

OLIVEIRA, R. P. de S. et al. Effect of inulin as a prebiotic to improve growth and counts of a probiotic cocktail in fermented skim milk. **LWT - Food Science and Technology**, Genova, Italy, v. 44, p. 520-523, 2011.

PASEEPHOL, T.; SHERKAT, F. Probiotic stability of yoghurts containing Jerusalem artichoke inulins during refrigerated storage. **Journal of functional foods**, Australia, n. 1, p. 311-318, 2009.

PEREIRA, D. I. A., GIBSON, G. R. Effects of Consumption of Probiotics and Prebiotics on Serum Lipid Levels in Humans. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Bruxelles, Belgium, v. 37, n. 4, p. 259-281, 2002.

PIMENTEL, T. C. **Iogurte probiótico com inulina como substituto de gordura**. 2009. 179 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

PRECI, D. et al. Desenvolvimento de iogurte light com extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) e adição de probióticos. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 22, n. 1, p. 27-38, jan./mar. 2011.

RAMIREZ-SANTIAGO, C. et al. Enrichment of stirred yogurt with soluble dietary fiber from *Pachyrhizus erosus* L. Urban: Effect on syneresis, microstructure and rheological properties. **Journal of Food Engineering**, México, 2010.

RICHETTI, A. et al. **Validação de metodologia para determinação de Frutooligosacarídeos**. Resumo apresentado no 9º SLACA – Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. Unicamp, Campinas, SP, 2011.

ROCHA, L. A. C. **Qualidade do leite de búfala e desenvolvimento de bebida láctea com diferentes níveis de iogurte e soro de queijo**. 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, Brasil.

RUSSELL, D. A. et al. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Ireland, n. 149, p. 88-105, 2011.

ROSSI, R. Alimentos funcionais: nova tendência na prevenção e tratamento de doenças. **Revista Funcionais & Nutraceuticos**. Editora Insumos, São Paulo, n. 1, ed. 17, p. 42-43, 2007.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, v. 42, n. 1, jan./mar., 2006.

SILVA, P. H. F. da. et al. **Físico-Química do leite e derivados**. Métodos Analíticos, 1997.

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

SILVA, I. M. da. **Suco de caju contendo oligossacarídeos prebióticos**. 2010. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SILVEIRA, N. D. P. **O emprego da metodologia de superfície de resposta no desenvolvimento de um novo produto simbiótico, fermentado com *Enterococcus faecium* crl 183 e *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416, à base de extratos aquosos de soja e de yacon (*Smallanthus sonchifolius*)**. 2009. 122 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição, área de Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP - Campus de Araraquara, Araraquara, SP.

SILVEIRA, K. C. da. **Bebida a base de flocos de abóbora com inulina: características prebióticas e aceitabilidade**. 2006. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde, Recife.

SOUZA, K. A. de F. D. de; NEVES, V. A. **Experimentos de Bioquímica**. Disponível em: <<http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/menu.htm>>. Acesso 19 de março de 2012. Araraquara, SP.

STAFFOLO, M. D. et al. Influence of dietary fiber addition on sensory and rheological properties of yogurt. **International Dairy Journal**, Argentina, v. 14, p. 263-268, 2004.

STEFE, C. de A. et al. Probioticos, prebioticos e simbioticos – Artigo de revisão. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 3, n. 1, p. 16-33, jan./jun. 2008.

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

TORRES D. et al. Ingredientes para alimentos funcionais - uma área de futuro? - **Dossier de segurança alimentar**, 2008. Disponível em: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/7853/1/EQ_08_Ingredientes_Biotempo%5B1%5D.pdf>. Acesso em novembro de 2010.

VASCONCELOS, C. M. **Caracterização físico-química e sensorial de iogurte “light” com farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*)**. 2010. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

WANG, Y. Prebiotics: Present and future in food science and technology. Review. **Food Research International**, China, v. 42, p. 8-12, 2009.

ZACARCHENCO, P. B.; MASSAGUER-ROIG, S. Properties of *Streptococcus thermophilus* fermented milk containing variable concentrations of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, Campinas, SP, Brasil, v. 37, p. 338-344, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Ficha para avaliação sensorial das amostras de iogurte

ANÁLISE SENSORIAL DE IOGURTE

Nome: _____

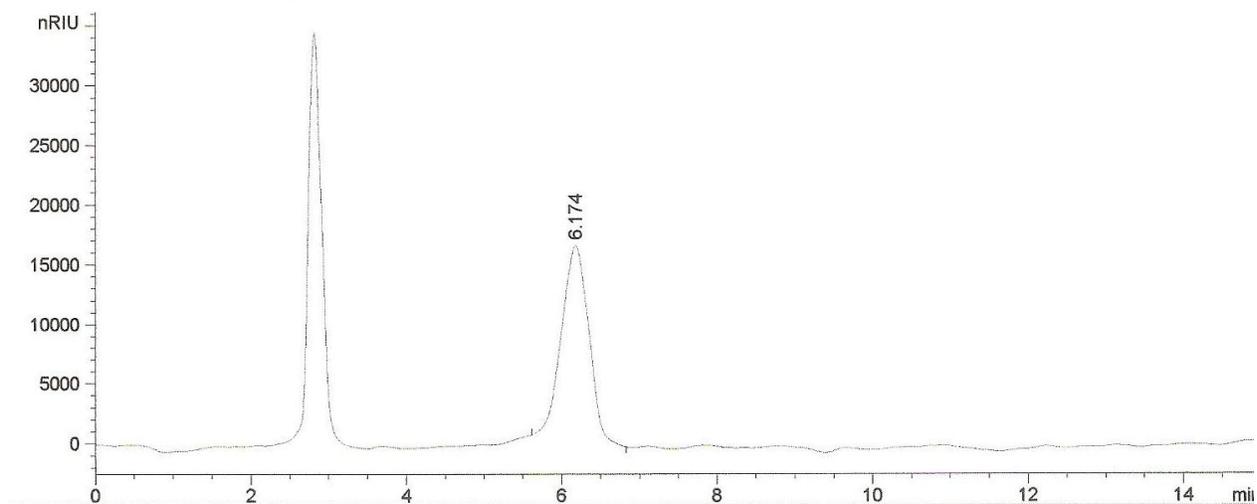
Provedor: _____

Você está recebendo 5 amostras de iogurte. Por favor, avalie cada uma das amostras codificadas e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou de cada uma, considerando cada um dos atributos solicitados.

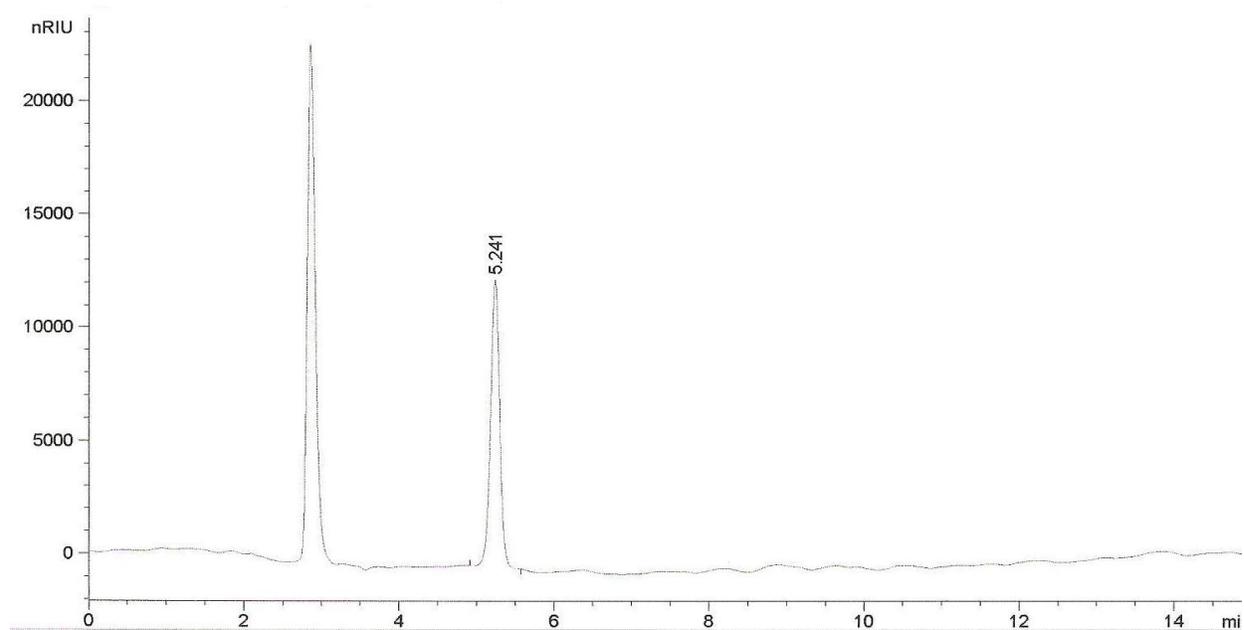
.....
Gostei extremamente				
Gostei muito				
Gostei regularmente				
Gostei ligeiramente				
Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente
Desgostei ligeiramente				
Desgostei regularmente				
Desgostei muito				
Desgostei extremamente				

Comentários: _____

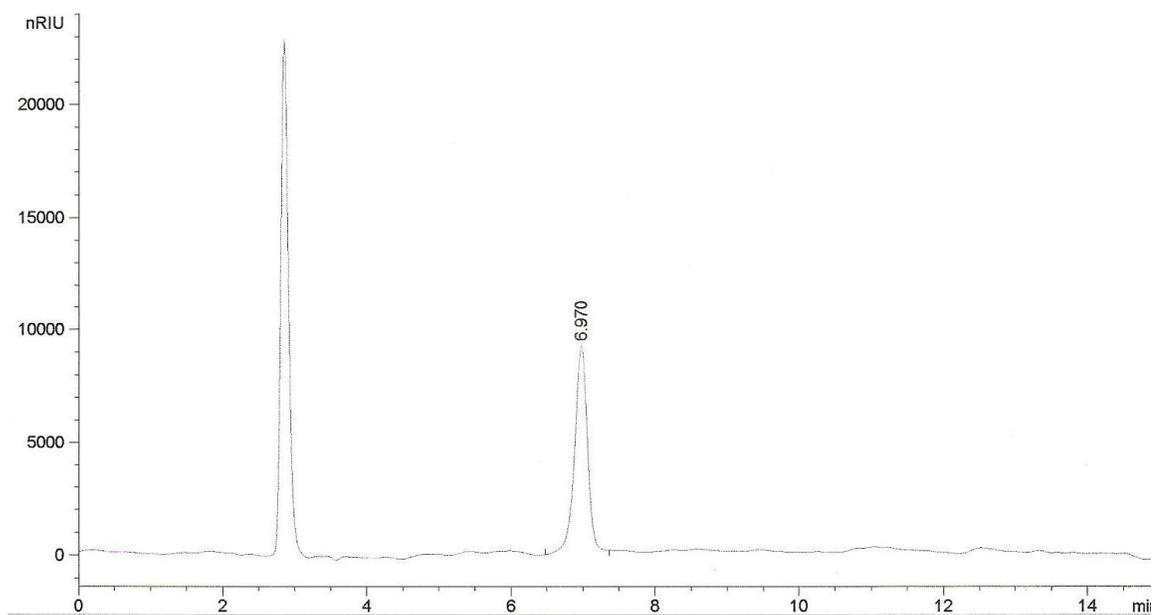
APÊNDICE B - Cromatograma Padrão de glicose



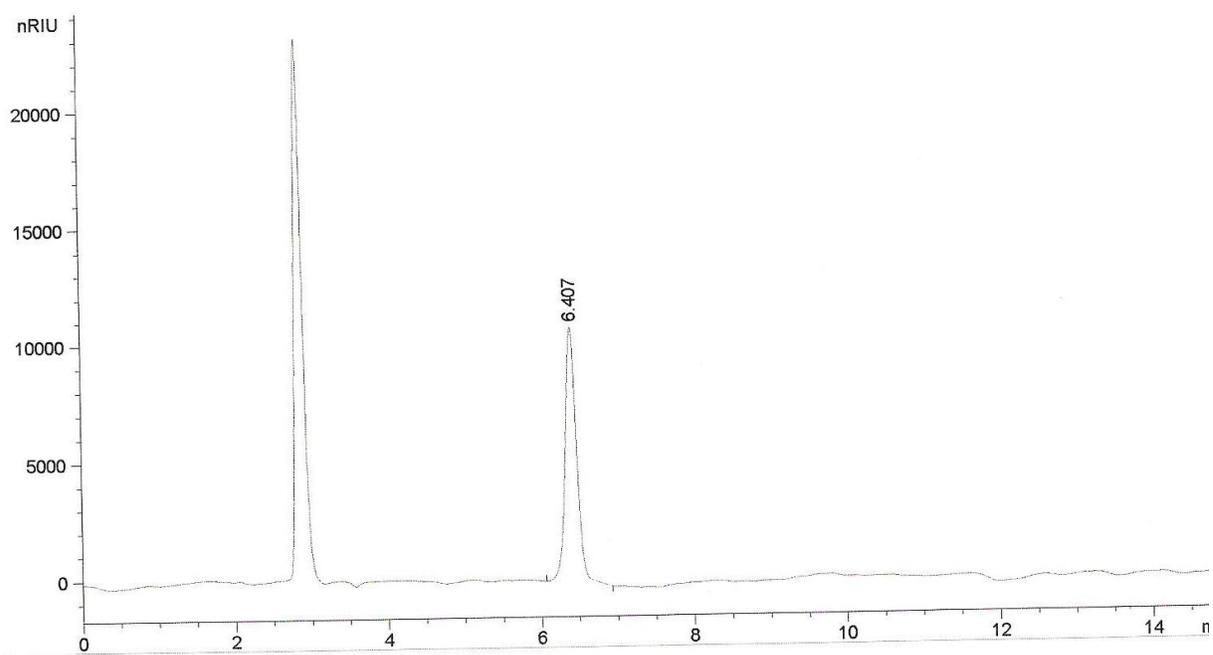
APÊNDICE C - Cromatograma Padrão de frutose



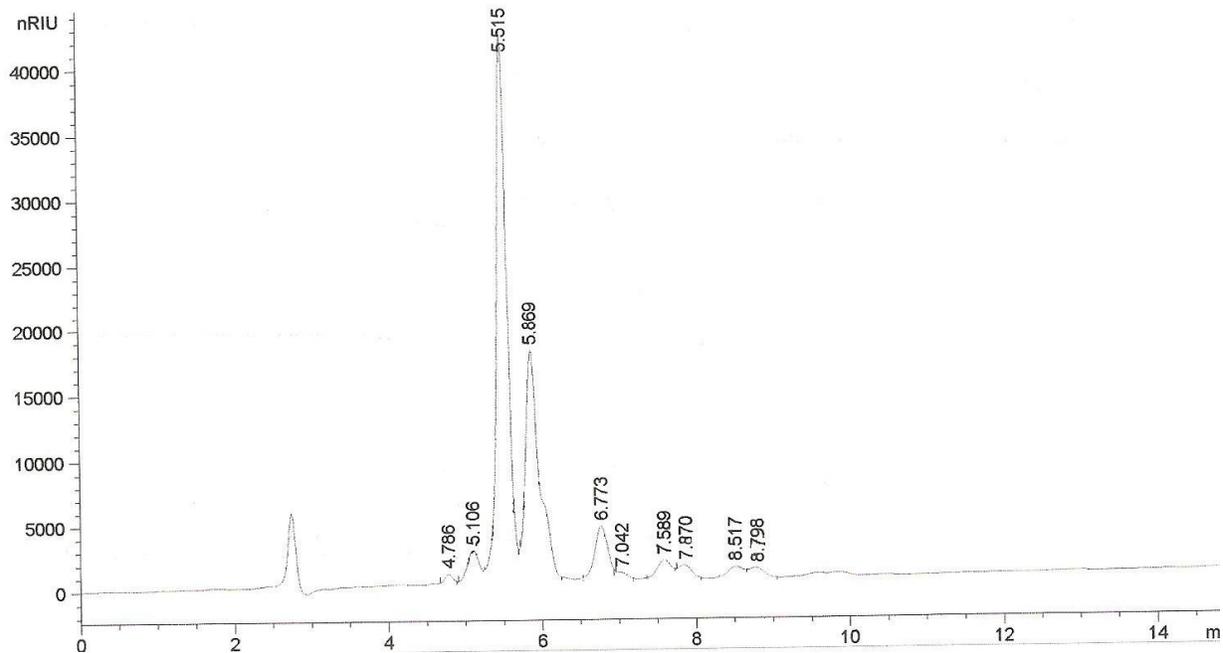
APÊNDICE D - Cromatograma Padrão de lactose



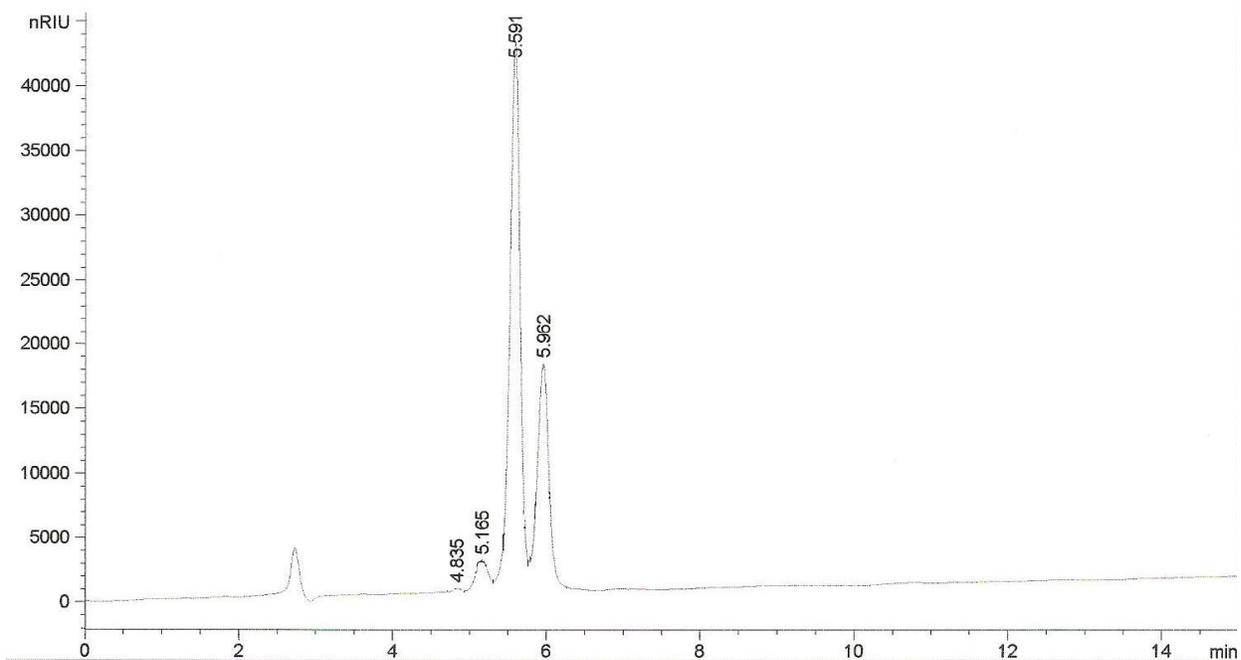
APÊNDICE E - Cromatograma Padrão de sacarose



APÊNDICE F – Cromatograma que expressa a Metodologia 5 (1:1 v/v - solução de iogurte com FOS e água /acetonitrila) – amostra de iogurte com FOS



APÊNDICE G – Cromatograma que expressa a Metodologia 5 (1:1 v/v - solução de iogurte e água /acetonitrila) – amostra de iogurte sem FOS



ANEXOS

ANEXO A - Ficha técnica da cultura láctica probiótica utilizada nos iogurtes

 FD-DVS BB-12[®] - Probio-Tec[™] Información de Producto							
Descripción	<p>Cultivo láctico Termófilo</p> <p>Cultivo que contiene una cepa definida de <i>Bifidobacterium</i>. BB-12 tiene una larga historia de uso seguro. Existe una extensa documentación clínica sobre los posibles beneficios para la salud del BB-12 disponible bajo requerimiento. También están disponibles certificados de identificación, seguridad y origen.</p> <p>BB-12 es suministrado en forma de producto granulado liofilizado. BB-12 es una marca registrada de Chr. Hansen.</p>						
Aplicación	<p>El cultivo es principalmente utilizado en la producción de productos lácteos probióticos (yogur, queso y productos dulces) además de otros productos alimenticios. BB-12 puede ser utilizado como una cepa simple en productos donde no se requiere una fermentación. Normalmente se utiliza en combinación con otras cepas probióticas y/o <i>Streptococcus thermophilus</i> o cultivos de yogur.</p>						
Envasado	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tamaño de envase</th> <th>Número de producto</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>5 x 25g. sobre</td> <td>100084</td> </tr> <tr> <td>10x 250g sobre</td> <td>100234</td> </tr> </tbody> </table>	Tamaño de envase	Número de producto	5 x 25g. sobre	100084	10x 250g sobre	100234
Tamaño de envase	Número de producto						
5 x 25g. sobre	100084						
10x 250g sobre	100234						
Disponibilidad	<p>BB-12 está también disponible en forma de producto congelado además de incluido en cultivos DVS con otras cepas.</p>						
Almacenamiento y caducidad:	<p>Los cultivos liofilizados deben ser almacenados a -18°C (0°F) o menos. Si los cultivos se almacenan a esta temperatura o inferior, la caducidad es de como mínimo 24 meses. Si los cultivos se almacenan a +5°C (41°F) la caducidad es de como mínimo 6 semanas.</p>						
Modo de empleo	<p>Sacar los cultivos del congelador justo antes de su utilización. NO DESCONGELAR. Limpiar la parte superior del sobre con cloro. Abrir el sobre y añadir los gránulos liofilizados directamente al producto pasteurizado mientras se agita lentamente. Agitar la mezcla durante 10-15 minutos hasta distribuir totalmente.</p>						
Dosis	<p>BB-12 es anaeróbico (ligeramente tolerante al ácido) y crece lentamente en leche. Convierte la lactosa en ácido láctico L+.</p> <p>Se recomienda que BB-12 sea inoculado de acuerdo con el recuento de células deseado en el producto final. Esto está influenciado por la caducidad, el pH y la acidez del producto, además del tiempo de fermentación y temperatura aplicada. BB-12 es muy estable y tiene una alta resistencia frente a los ácidos en los productos lácteos fermentados.</p>						

BSu/BB-12-FD-PI/Nov. 2001 /1:2

FD-DVS BB-12[®] -
Probio-Tec[™]
 Product Information

CHR. HANSEN

Las mezclas Chr. Hansen que contienen BB-12 en la gama Probio-Tec han sido todos compuestos para proporcionar un alto recuento de células en el producto final cuando se aplica de acuerdo con nuestras recomendaciones.

Temperatura de incubación:

La temperatura óptima de incubación para BB-12 es 37-40°C (99-104°F). Las Bifidobacterias normalmente no son capaces de crecer en leche en un proceso lácteo normal. BB-12, sin embargo, tiene la característica única de ser moderadamente tolerante al oxígeno, por lo que crecerá en leche a temperaturas entre 30 -43°C (83 - 109°F).

La formación de ácido será muy lenta comparada con los cultivos acidificantes normales.

Certificado Kosher BB-12 es un cultivo con aprobación Kosher (Círculo K D) para ser utilizado durante todo el año, excepto en Pascua Judía.

Servicio Técnico

Las instalaciones de Chr. Hansen distribuidas por todo el mundo y el personal de nuestro centro de tecnología aplicada están a su disposición para proporcionarle ayuda e instrucciones.

Referencias

Referencias y métodos de análisis están disponibles bajo solicitud.

La información anteriormente mencionada se ofrece exclusivamente a título informativo. Chr. Hansen declina toda responsabilidad por las pérdidas o daños que pudieran derivarse de la aplicación en la práctica de la información facilitada.

EN-BB-12-FD-PI-1101

ANEXO B - Ficha técnica da cultura láctica tradicional utilizada nos iogurtes



L C Bolonha Ingredientes Alimentícios Ltda
 R. Gustavo Nass, 302 - Jd. Contorno
 Colombo/PR - Cep: 83.402-710
 www.lcbolonha.com.br - bolonha@lcbolonha.com.br

Fermento DVS YF L812

Descrição: Cultura láctica termofílica, liofilizada para iogurte. O cultivo contém uma mescla de cepas de *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* e *Lactococcus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*.

Apresentação:	Envelope	Código
	50U	667296
	200U	677350
	500U	677650

Especificações: A temperatura para incubação é de 35 - 45°C. Para maiores informações favor contatar departamento técnico da LC Bolonha.

Conservação e validade: Produto liofilizado. O produto deve ser mantido sob congelamento à temperatura mínima de -18°C. Nestas condições o produto mantém suas especificações por um período de 24 meses.

Aplicação: Na elaboração de iogurtes e bebidas lácteas fermentadas. A cultura confere ao produto final:

- muito alta viscosidade;
- sabor muito suave;
- baixa pós-acidificação.

Dosagem:

- 1 envelope de 50U para 500 litros
- 1 envelope de 200U para 2.000 litros
- 1 envelope de 500U para 5.000 litros

Legislação: AUP/DOI/DIPOA nº 3126/2003.

As informações contidas no documento e as recomendações aqui efetuadas, são feitas com base nas informações do fabricante. Nenhuma garantia quanto a aplicabilidade e precisão de tais informações é fornecida. Assim, recomendamos aos clientes, que antes de utilizarem qualquer produto em escala industrial, realizem testes preliminares para determinar se o produto é adequado às suas necessidades. Nossa equipe técnica estará a disposição para ajudá-los.

ANEXO C - Ficha técnica do Fruto-oligossacarídeo (FOS) FiberFOS® comercial utilizado nos iogurtes

Produtos :: :: FiberFOS®



Atua Beneficamente sobre a Flora Intestinal

O FiberFOS é um produto a base de frutooligossacarídeo, uma Fibra Dietética Solúvel Prebiótica, extraída da raiz da chicória, que possui mecanismo de ação seletivo, alimentando somente as bactérias benéficas, especialmente as bifidobactérias. Não é digerido pelas enzimas digestivas e nem absorvido ou excretado pelo organismo. Atua como regulador da flora intestinal, agindo nos quadros de constipação e de diarreia.

Informação de Composição

Composição

Frutooligossacarídeos 6 gramas

Finalidade de Uso

O FiberFOS é uma "fonte" de fibra solúvel.

Contribui para uma flora intestinal saudável.

Seu uso deve estar associado a uma dieta equilibrada e hábitos de vida saudáveis.

Ingestão Diária Recomendada

Adultos: 1 a 2 sachês ao dia

Crianças até 2 anos: ½ a 1 sachê ao dia

Crianças acima de 2 anos: 1 a 2 sachês ao dia

Modo de usar:

Misturar o conteúdo de um sachê ou colher medidora (6g) ao alimento a ser ingerido ou diluído em sua bebida favorita, preferencialmente em jejum.

Informação Nutricional

Porção de 6g de FOS - 1 sachê

	Quant por porção	% VD*
Valor Energético	9,5Kcal ou 40Kj	0,5%
Carboidratos	0,3g	0,1%
Proteínas	0g	0%
Gordura Totais	0g	0%
Gorduras Saturadas	0g	0%
Gorduras Trans	0g	0%
Fibra Alimentar (Frutooligossacarídeo)	5,5g	22%
Sódio	0mg	0%

*% Valores Diários com base em uma dieta de 2000 kcal ou 8400 kj. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas. **VD não estabelecida.

Apresentação

Caixa contendo 10 ou 30 sachês de 6g. Pote de 250g.

Validade

O FiberFOS® é válido por 2 anos a partir de sua data de fabricação.

Conservação

Conservar em local seco e fresco, com temperatura abaixo de 30° C.

**Advertência**

O sachê deve ser consumido assim que aberto.
Consumir somente a quantidade indicada na embalagem do produto.
Podem ocorrer efeitos laxativos sempre que a porção diária for superior a 30g.
O consumo deve estar acompanhado da ingestão de líquidos.

Registro ANVISA (clique e consulte)

<< voltar

Copyright © 2010, SKL Functional Nutrition